



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas

**PAPEL DO RECEPTOR CANABINÓIDE CB2 E SUA RELAÇÃO
COM A nNOS NO REPARO ENDOTELIAL
E REMODELAMENTO VASCULAR**

Gianne Paul Campos

Belo Horizonte
Junho de 2019

043

Campos, Gianne Paul.

Papel do receptor canabinóide CB2 e sua relação com a nNOS no reparo endotelial e remodelamento vascular [manuscrito] / Gianne Paul Campos. - 2019.

82 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia - Teses. 2. Farmacologia - Teses. 3. Doenças Vasculares. 4. Receptor CB2 de Canabinoide. 5. Óxido Nítrico Sintase Tipo III. I. Capettini, Luciano dos Santos Aggum. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que **GIANNE PAUL CAMPOS** defendeu no dia 13 de junho de 2019 perante a banca examinadora homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais assim constituída: **Profa. Dra. Daniella Bonaventura**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Stêfany Bruno de Assis Cau**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Romulo Leite**, FARMACIA/UFOP, **Prof. Dr. Luciano de Figueiredo Borges**, DCB/UNIFESP, e **Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador, a Tese de Doutorado intitulada "**PAPEL DO RECEPTOR CANABINÓIDE CB2 E SUA RELAÇÃO COM A NNOS NO REPARO ENDOTELIAL E REMODELAMENTO VASCULAR**". Saliento que a senhora **GIANNE PAUL CAMPOS** estará apta a gozar dos direitos que o referido título lhe concede somente após a obtenção do certificado de conclusão do Doutorado. Esse certificado será emitido pelo Programa após a entrega pelo estudante da versão final da tese atendendo as exigências da banca examinadora no prazo de 60 dias.

Belo Horizonte, 13 de junho de 2019.


Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes

Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas:
 Fisiologia e Farmacologia

BANCA EXAMINADORA:

PROFA. DRA. DANIELLA BONAVENTURA, ICB/UFMG
PROF. DR. STÉFANY BRUNO DE ASSIS CAU, ICB/UFMG
PROF. DR. ROMULO LEITE, FARMACIA/UFOP
PROF. DR. LUCIANO DE FIGUEIREDO BORGES, DCB/UNIFESP
PROF. DR. LUCIANO DOS SANTOS AGGUM CAPETTINI, ICB/UFMG - ORIENTADOR

"PAPEL DO RECEPTOR CANABINÓIDE CB2 E SUA RELAÇÃO COM A NNOS NO REPARO ENDOTELIAL E REMODELAMENTO VASCULAR"

GIANNE PAUL CAMPOS

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 13 de junho de 2019, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROFA. DRA. DANIELLA BONAVENTURA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. STÉFANY BRUNO DE ASSIS CAU
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. ROMULO LEITE
FARMACIA/UFOP



PROF. DR. LUCIANO DE FIGUEIREDO BORGES
DCB/UNIFESP



PROF. DR. LUCIANO DOS SANTOS AGGUM CAPETTINI
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 13 de junho de 2019

Gianne Paul Campos

**PAPEL DO RECEPTOR CANABINÓIDE CB2 E SUA RELAÇÃO
COM A nNOS NO REPARO ENDOTELIAL
E REMODELAMENTO VASCULAR**

Trabalho de doutorado apresentado para título de doutora pelo programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia da UFMG.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini

Departamento de Farmacologia - ICB
Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia

Belo Horizonte

Junho de 2019

À minha mãe,
estendendo a todas as mulheres fortes
e inteligentes que me inspiraram.

"You cannot hope to build a better world without improving the individuals. To that end each of us must work for his own improvement, and at the same time share a general responsibility for all humanity, our particular duty being to aid those to whom we think we can be most useful."

Marie Curie

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem o apoio de muitos que me acompanharam nos últimos 4 anos. Alguns serão listados aqui, a todos os que estiveram comigo, obrigada!

À UFMG, ao programa de pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia agradeço pela formação, bem como às agências de fomento que possibilitaram este trabalho: CNPq, FAPEMIG e CAPES, meu desejo que continuem e persistam em trabalhar em prol da ciência.

À querida professora Regina Turchetti, por tantas conversas e ensinamentos sobre ser professora, meu respeito e admiração.

Aos laboratórios parceiros como LABIN com os colegas queridos da bioquímica, professor Jader Cruz e toda sua colaboração, LABODE no papel da professora Gerluz, seus orientandos e o querido técnico Chico. Ao laboratório de Citometria de fluxo na pessoa da técnica Daniela, ao laboratório multiusuários do CAPI e seus colaboradores, pelo auxílio em microscopia. Ao Rinaldo, técnico bioterista. Aos demais laboratórios e parceiros-amigos do Departamento de Farmacologia, aos melhores professores, obrigada!

Aos membros que compõem esta banca de defesa de tese, obrigada pelo tempo dispensado em contribuir para melhorias neste trabalho, meu carinho e gratidão.

Ao meu laboratório de Biologia Vascular, a todos que passaram e aos que permaneceram. Aos queridos Edenil, Gustavo, Olga, Enes, Thaís, Alejandra, Wesley, Mayra, Melissa, Aline Copola, Íria, Fernando, Ildernandes e Daniel Pimenta pelas trocas, conversas, apoio.

Agradecimento especial à Juliana Navia Pelaez, grande mulher, amiga, parceira de trabalho, agradeço infinitamente por ter você e ser sua amiga.

Ao meu orientador, mentor, amigo Luciano Capettini, incansável, genial, sábio, o melhor orientador que eu poderia ter, agradeço de todo meu coração, por todos esses anos de ensinamentos diversos (afinal ele sempre sabe tudo de tudo!), por este trabalho que concluímos aqui, eu agradeço. Admiração, carinho e respeito só crescem a cada dia por você, obrigada!

À minha família, mãe, pai, Luciana, Hugo e Caio, meu amor incondicional!

Lista de figuras

A. Figuras que compõem o texto:

Figura 1	Mecanismos patofisiológicos do remodelamento arterial.....	17
Figura 2	Tipos de remodelamento vascular.....	18
Figura 3	Representação esquemática ilustrando a formação de NO.....	20

B. Figuras que compõem os resultados:

Figura 1	Remodelamento vascular em carótidas de animais C57bl/6J.....	37
Figura 2	Efeito da cirurgia de oclusão sobre o remodelamento ao longo do tempo....	38
Figura 3	Efeito do tratamento com agonista CB2 sobre o remodelamento vascular.....	39
Figura 4	Efeito do tratamento com agonista JWH015 sobre a expressão de colágeno.	41
Figura 5	Efeito do tratamento com agonista JWH015 sobre a expressão de colágeno.	41
Figura 6	Efeito do tratamento com agonista JWH015 sobre a expressão de MMP-8...	42
Figura 7	Efeito do tratamento com agonista JWH015 sobre a expressão de α -actina...	43
Figura 8	Efeito do tratamento com agonista JWH015 sobre a expressão de VWF.....	44
Figura 9	Marcação de nitrotirosina nas carótidas.....	45
Figura 10	Detecção de NO em cortes de carótidas após 14 dias de cirurgia.....	46
Figura 11	Detecção de superóxido em cortes de carótidas após 14 dias de cirurgia.....	46
Figura 12	Detecção de superóxido em cortes de carótidas após 14 dias de cirurgia.....	47
Figura 13	Expressão da nNOS em carótida de animais tratados com o agonista CB2....	48
Figura 14	Expressão do receptor CB2 em carótidas tratadas com o agonista CB2.....	49

Figura 15	Expressão do receptor CB2 nas células endoteliais EA.hy926.....	51
Figura 16	Expressão da nNOS em células endoteliais EA.hy926.....	51
Figura 17	Medidas de NO em células endoteliais EA.hy926 por citometria de fluxo....	53
Figura 18	Medida de superóxido na célula endotelial pelo marcador DHE.....	54
Figura 19	Expressão das isoformas constitutivas da NOS.....	55
Figura 20	Análise de fosforilação do sítio de ativação resíduo serina 1177 da eNOS....	56
Figura 21	Análise de fosforilação do sítio de inativação resíduo serina 852 da nNOS...	57
Figura 22	Análise de fosforilação do sítio de ativação resíduo serina 1412 da nNOS....	57
Figura 23	Produção de nitrito e nitrato na presença e ausência de fluxo oscilatório.....	59
Figura 24	Produção de nitrito e nitrato na presença e ausência de fluxo oscilatório.....	60
Figura 25	Produção de nitrito e nitrato na presença e ausência de fluxo oscilatório.....	60
Figura 26	Produção de nitrito e nitrato na presença e ausência de fluxo oscilatório.....	61
Figura 27	Produção de nitrito e nitrato na presença e ausência de fluxo oscilatório.....	61
Figura 28	Avaliação do efeito do JWH015 sobre o fechamento de fenda endotelial.....	62
Figura 29	Ensaio de migração endotelial.....	63
Figura 30	Participação da nNOS na produção de NO e H ₂ O ₂ induzidos pelo JWH015.	64
Figura 31	Efeito do agonista CB2 e da nNOS sobre a proliferação endotelial.....	65

Lista de abreviaturas e siglas

2-AG	Araquidonoilglicerol
AEA	Anandamida
BH ₄	Tetraidrobiopterina
CB1	Receptor canabinóide tipo 1
CB2	Receptor canabinóide tipo 2
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial ou NOS3
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível ou NOS2
JW	JWH015 - agonista seletivo receptor CB2
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinases ativadas por mitógeno
MMP	Metaloproteinase de matriz
NF-κB	Factor de transcrição nuclear kappa B
NNOS	Óxido nítrico sintase neuronal ou NOS1
NO	Óxido nítrico
NP	N-propil L-arginina
OSS	<i>Shear stress</i> oscilatório
PGI ₂	Prostaciclina
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PKA	Proteína Quinase dependente de AMPc
PP1	Proteína fosfatase 1
REP	Repouso
RhoA	Proteína sinalizadora da família Rho GTPase
TRIM	1-(2- trifluoromethylphenyl) imidazole
vWF	Fator de von Willebrand
Δ9-THC	Δ -9-tetrahydrocannabinol

Resumo

Estudos com modelos celulares, animais e humanos demonstram de maneira consistente que as atuais terapias cirúrgicas e anti-proliferativas retardam, mas não evitam, a hiperplasia das camadas média e íntima arteriais, independentemente de um quadro de dislipidemia associado. Por outro lado, apesar do inquestionável sucesso da atual terapia hipocolesterolemizante, vários estudos sugerem que o sistema endocanabinóide pode representar um importante alvo de atuação terapêutica em doenças fibro-proliferativas vasculares. Desta forma, testamos a hipótese de que a ativação dos receptores canabinóides tipo 2 (CB2) poderia modular a enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e prevenir o dano causado em modelo de oclusão de carótidas em camundongos C57BL6J. A artéria carótida foi ocluída sob tratamento local com agonista CB2 – JWH015. A carótida foi avaliada por técnicas histológicas e também por microscopia de fluorescência (imunofluorescência e sondas fluorescentes sensíveis ao NO e radicais superóxido). Células endoteliais humanas também foram expostas a tratamento com mesmo agonista. Neste modelo foram avaliadas a expressão proteica (eNOS, nNOS, marcadores de proliferação e receptores CB2), a produção de NO e superóxido e migração celular. Os resultados encontrados demonstram que o agonista CB2 previne a formação neoíntima no modelo estudado, com redução na densidade de células endoteliais, colágeno, metaloproteinase de matriz e radicais superóxido. Nas células endoteliais, o tratamento com JWH015 aumenta a expressão da nNOS e a produção de NO. A inibição da nNOS leva à diminuição de superóxido, indicando que esta isoforma possa estar desacoplada. Sob *shear stress* oscilatório (OSS), observamos que tanto o estímulo com JWH015 quanto com a inibição da nNOS levam a uma diminuição na produção de NO, que parece ser provocada pela ativação da via PI3K/AKT. Sobre a cicatrização endotelial (ensaio de fenda), encontramos que o tratamento com agonista do receptor CB2 reduziu o tempo para fechamento da fenda em repouso. Por outro lado, a inibição da enzima nNOS retardou este processo. Concluímos ainda que, para que o receptor CB2 seja utilizado como um alvo farmacológico para prevenção da formação neoíntima, mais ensaios precisam ser desenvolvidos em modelos biológicos.

Abstract

Studies with cell, animal, and human models consistently demonstrate that current surgical and antiproliferative therapies delay, but do not prevent, hyperplasia of the media and intima arterial layers, regardless of associated dyslipidemia. On the other hand, despite the unquestionable success of current hypocholesterolemic therapy, several studies suggest that the endocannabinoid system may represent an important target for therapeutic action in vascular fibroproliferative diseases. Thus, we tested the hypothesis that the activation of the cannabinoid type 2 (CB2) receptors could modulate the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) enzyme and prevent the damage caused in a carotid occlusion model in C57BL6J mice. The carotid artery was occluded under local treatment with CB2-JWH015 agonist. The carotid was evaluated by histological techniques and also by fluorescence microscopy (immunofluorescence and NO-sensitive fluorescent probes and superoxide radicals). Human endothelial cells were also exposed to treatment with the same agonist. In this model, protein expression (eNOS, nNOS, proliferation markers and CB2 receptors), NO and superoxide production and cell migration were evaluated. The results showed that the CB2 agonist prevents neointima formation in the model studied, with reduction in the density of endothelial cells, collagen, matrix metalloproteinase and superoxide radicals. In endothelial cells, treatment with JWH015 increases nNOS expression and NO production. Inhibition of nNOS leads to a decrease in superoxide, indicating that this isoform may be uncoupled. Under oscillatory shear stress (OSS), we observed that both the JWH015 stimulus and the nNOS inhibition lead to a decrease in NO production, which appears to be triggered by the activation of the PI3K / AKT pathway. On endothelial healing (slit assay), we found that CB2 receptor agonist treatment reduced the time to closure of the slit at rest. On the other hand, inhibition of the nNOS enzyme delayed this process. We conclude that for the CB2 receptor to be used as a pharmacological target for the prevention of neointima formation, more trials need to be developed in biological models.

Sumário

Agradecimentos.....	4
Lista de Figuras.....	5
Lista de abreviaturas e siglas.....	7
Resumo.....	8
Abstract.....	9
1 Introdução e justificativa.....	13
2 Revisão da literatura.....	14
2.1 Remodelamento vascular.....	15
2.1.1 Participação do endotélio no remodelamento vascular.....	15
2.1.2 A biomecânica envolvida no remodelamento vascular.....	18
2.1.3 Remodelamento vascular e óxido nítrico.....	19
2.2 Estresse de cisalhamento e NO.....	21
2.3 Canabinóides e NO: nova possibilidade terapêutica no remodelamento vascular.	21
3 Objetivos.....	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4 Materiais e Métodos.....	28
4.1 Experimentos com modelo animal.....	28
4.1.1 Modelo animal.....	28
4.1.2 Procedimentos cirúrgicos.....	28
4.1.3 Tratamento dos animais.....	28
4.1.4 Coleta de tecidos.....	29
4.1.5 Ensaios morfométricos.....	29
4.1.6 Imunofluorescência em cortes de carótidas.....	29
4.1.7 Determinação da produção de radicais superóxido e NO <i>in situ</i> em cortes de	

carótidas.....	30
4.1.8 Determinação do conteúdo de colágeno pela coloração dos cortes de carótida com picrossirius red.....	31
4.2 Experimentos com modelo celular.....	31
4.2.1 Linhagem celular.....	31
4.2.2 Exposição das células endoteliais aos tratamentos.....	31
4.2.3 Ensaio de viabilidade celular.....	32
4.2.4 Exposição das células ao fluxo oscilatório.....	32
4.2.5 Inferência da produção de NO pelo método de Griess.....	32
4.2.6 Medidas da produção endotelial de NO, superóxido e H ₂ O ₂	33
4.2.7 Análise da expressão proteica por Western blot.....	33
4.2.8 Imunofluorescência.....	35
4.2.9 Ensaio de fenda.....	35
4.2.10 Avaliação da proliferação celular por citometria de fluxo.....	35
4.3 Análises estatísticas.....	36
5 Resultados.....	37
5.1 Caracterização do modelo de remodelamento vascular.....	37
5.2 Efeito da modulação do receptor CB2 sobre o remodelamento vascular.....	38
5.3 Produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio durante o remodelamento vascular e sua modulação pelo agonista CB2 - JWH015.....	44
5.4 Efeito do tratamento com JWH015 sobre a expressão da nNOS e do receptor CB2.....	47
5.5 Modulação da expressão do receptor CB2 e da nNOS pelo JWH015 em linhagem de células endoteliais.....	50
5.6 Produção de NO e radicais superóxido pelas células endoteliais expostas ou não ao <i>shear stress</i> oscilatório.....	52
5.7 Expressão da eNOS e nNOS, total e fosforilada, pelas células endoteliais frente aos diferentes estímulos.....	54
5.8 Possível mecanismo envolvido na produção de NO.....	58
5.9 Proliferação endotelial por ensaio de fenda.....	62

5.10	Ensaio de proliferação endotelial por citometria de fluxo.....	64
6	Discussão.....	66
6.1	O modelo de remodelamento vascular em camundongo: participação do receptor CB2 e da nNOS.....	66
6.2	O papel da célula endotelial frente ao remodelamento: envolvimento do receptor CB2 e da nNOS.....	70
6.3	O mecanismo envolvido na produção de NO.....	71
6.4	A proliferação endotelial mediante tratamento co agonista CB2.....	74
7	Considerações finais.....	74
8	Referências bibliográficas.....	75

1. Introdução e justificativa

Estudos com modelos celulares, animais e humanos demonstram de maneira consistente que as atuais terapias cirúrgicas e anti-proliferativas retardam, mas não evitam a hiperplasia das camadas média e íntima arteriais, independentemente de um quadro de dislipidemia associado (Bult 2000, Garas, Huber et al. 2001, Hynes, Kennedy et al. 2014). Além do dano mecânico causado por intervenções cirúrgicas vasculares, o remodelamento vascular patológico pode ocorrer naturalmente em resposta a estímulos imunológicos, bioquímicos e hemodinâmicos. A reação das artérias ao dano vascular tem se tornado objeto de interesse de pesquisa por conta de seu potencial na etiologia da aterosclerose e porque a re-estenose é considerada a maior causa de morte em humanos (Gibbons and Dzau 1994, Byrne, Joner et al. 2015).

Apesar do inquestionável sucesso da atual terapia hipocolesterolemizante, vários estudos sugerem que o sistema endocanabinoide pode representar um importante alvo de atuação terapêutica em doenças fibro-proliferativas vasculares (Steffens, Veillard et al. 2005, Cunha, Romão et al. 2011, Capettini, Savergnini et al. 2012, Montecucco, Di Marzo et al. 2012, Ramirez, Hasko et al. 2012). Desta forma, nós temos a hipótese de que a ativação dos receptores canabinoídes tipo 2 (CB2) pode restaurar, ou prevenir o dano à função e integridade endotelial, reduzir a inflamação local e a migração e proliferação de células musculares lisas vasculares. Dados do nosso grupo e de outros pesquisadores sugerem que a disfunção da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) parece ser um evento-chave na aterosclerose e no remodelamento vascular (Tsutsui 2004, Capettini, Cortes et al. 2011). Assim, este estudo se destina a investigar a possibilidade de que parte dos efeitos benéficos da ativação de receptores CB2 envolva a modulação da nNOS.

2. Revisão da literatura

A dislipidemia tem como consequências sérias doenças como aterosclerose, coronariopatias, acidente vascular cerebral isquêmico e doença vascular periférica. Estudos sugerem que a incidência destas patologias ainda pode aumentar devido à epidemia da obesidade e à maior expectativa de vida da população mundial. Apesar da introdução das estatinas no mercado há aproximadamente 30 anos, a aterosclerose continua sendo líder em causa de mortes (Hazzard 1988, Rabaneda Vallecillos 1990, Benjamin, Virani et al. 2018).

A aterosclerose, processo crônico e progressivo, é classicamente caracterizada por uma resposta inflamatória e fibroproliferativa em artérias de média e larga condutância. Dentre os vários fatores de risco, tem-se que a hipercolesterolemia, a hipertensão arterial, o diabetes, o tabagismo, além das reações imunológicas e a suscetibilidade genética individual, atuam isoladamente ou em conjunto para a manifestação do fenótipo patológico vascular na doença (Ludewig, Zinkernagel et al. 2002, Ballantyne 2007, Benjamin, Virani et al. 2018).

O início do processo se dá por uma disfunção endotelial que é caracterizada, além de outros fatores, por uma redução na produção de óxido nítrico (NO) (Weber and Noels 2011). Desde que o NO foi descoberto nos anos 80 como um importante fator relaxante derivado do endotélio, tem se tornado evidente que o NO não é somente a principal molécula sinalizadora cardiovascular, mas que mudanças na sua biodisponibilidade são cruciais no desenvolvimento da disfunção endotelial com consequente quadro de aterosclerose (Rapoport and Murad 1983, Mudau, Genis et al. 2012).

Apesar das várias estratégias comprovadamente eficazes para redução de algumas complicações e/ou progressão da doença aterosclerótica, as complicações vasculares tardias ainda são importantes causas de morbidade e mortalidade. Os tratamentos farmacológicos com aspirina ou inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase (estatinas), bem como mudanças no estilo de vida (controle dietético e práticas de atividades físicas) são medidas comumente adotadas em caráter preventivo das complicações da aterosclerose. Uma vez instalada a placa aterosclerótica, as medidas terapêuticas mais efetivas são os procedimentos cirúrgicos que incluem os enxertos

vasculares (*bypass* cardíaco e infra-inguinal), endarterectomias e angioplastia arterial transluminal com balão, com ou sem o implante intra-arterial de um *stent*. Contudo, apesar do inquestionável sucesso clínico da atual terapia farmacológica e destes procedimentos cirúrgicos, o espessamento das paredes dos enxertos venosos e a re-estenose pós-angioplastia arterial levam mais de 50% dos pacientes submetidos a estes procedimentos a uma re-intervenção cirúrgica em até 10 anos. Acredita-se que a etiologia central para os espessamentos e oclusão venosos e arteriais, bem como para a re-estenose pós-angioplastia, é a formação e proliferação de uma camada neointima, que resulta na aceleração da formação de placa aterosclerótica com subsequente trombose e re-oclusão vascular (Harrison, Freiman et al. 1987, Gomez 2000, Davignon 2004, Landmesser, Hornig et al. 2004, Weber and Noels 2011, Goel, Guo et al. 2012, Ichimoto, Fujimoto et al. 2012, Rafieian-Kopaei, Setorki et al. 2014). Dentre as artérias afetadas no processo de remodelamento vascular encontra-se a artéria carótida, importante via de condução do sangue à região cerebral, que constantemente é alvo de intervenções cirúrgicas por conta de complicações decorrentes de aterosclerose.

2.1 Remodelamento vascular

2.1.1 Participação do endotélio no remodelamento vascular

Os vasos sanguíneos são classicamente formados por uma camada denominada íntima, composta por células endoteliais; no entorno destas encontra-se a camada média de células musculares lisas e em seguida a camada adventícia, com predomínio de fibroblastos. Os vasos sanguíneos são capazes de perceber mudanças sutis em seu meio e, assim, gerar uma complexa comunicação intercelular entre estas camadas que será capaz de alterar tanto a estrutura quanto a função do vaso. A alteração na estrutura é conhecida como remodelamento vascular, um processo ativo que envolve mudanças em pelo menos quatro processos celulares: crescimento, morte, migração e produção ou degradação de matriz extracelular. O remodelamento é um processo adaptativo que ocorre de mudanças em longo

prazo nas condições hemodinâmicas, mas ele pode contribuir de modo efetivo para o acometimento de doenças vasculares (Gibbons and Dzau 1994).

A arquitetura do vaso é constantemente alterada em resposta ao dano vascular. Uma das alterações é a formação de camada neointima como resposta de reparo ao dano, que envolve: migração e proliferação celular, produção de matriz e infiltrado de células inflamatórias. O espectro de forças que atuam sobre o endotélio vai desde forças mecânicas ou substâncias vasoativas até mediadores inflamatórios (Langille and O'Donnell 1986).

O aumento do lúmen vascular está relacionado com aumento do fluxo sanguíneo. De modo contrário, uma diminuição no fluxo sanguíneo na artéria leva a uma diminuição estrutural no diâmetro vascular que é dependente de endotélio. Assim, em situações onde há alterações no fluxo, ocorre o estresse de cisalhamento na parede vascular no qual a força de tração induzida pelo fluxo sanguíneo leva ao remodelamento em resposta a este fluxo, a fim de manter um nível constante de estresse (Kamiya and Togawa 1980).

Apesar de muito se estudar as proliferações neointimas como tentativa de explicar ou ainda retardar os processos de oclusão dos enxertos venosos, este fenômeno permanece como alvo importante de pesquisa em artérias carótidas e na circulação cerebral (Morishita, Tsutsui et al. 2002, Tsutsui 2004, Furuno, Morishita et al. 2011). Estudos recentes demonstram que pacientes com estreitamento do lúmen da artéria carótida apresentam elevado risco para lesões isquêmicas cerebrais (Montecucco, Quercioli et al. 2012, Copin, da Silva et al. 2013, Carbone, Camillo Teixeira et al. 2014). Entretanto, os mecanismos celulares e moleculares que correlacionam hiperplasia e/ou formações neoíntimas de carótidas e as lesões isquêmicas cerebrais não são bem conhecidos.

As células musculares lisas e os fibroblastos constituem os principais tipos celulares encontrados nos estágios iniciais das formações neoíntimas em carótidas. Contudo, as células endoteliais apresentam papel imprescindível no controle da ativação e proliferação destas células. As células endoteliais sabidamente apresentam importante papel no controle não só do tônus vascular, mas também do status oxidativo e inflamatório vascular (Montecucco, Lenglet et al. 2010, Artom, Montecucco et al. 2014, Lenglet, Quercioli et al. 2014). Estes papéis são desempenhados graças à liberação de vários mediadores pelas células endoteliais com ação direta sobre as próprias células e sobre outros componentes do sistema vascular como células musculares lisas e fibroblastos. Além disso, o endotélio

controla ainda a migração e ativação de células inflamatórias como monócitos e neutrófilos. Acredita-se que este papel modulatório das células endoteliais sobre a fisiopatologia vascular deva-se a liberação de mediadores como o óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (PGI₂). Estas moléculas, principalmente o NO, inibem a adesão e o recrutamento de células inflamatórias, a proliferação e migração de células musculares lisas vasculares, expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), síntese de proteoglicanos, liberação do ativador de plasminogênio tecidual e metabolismo do colesterol pelas células endoteliais. Nos locais de lesão, onde há descontinuidade da camada protetora endotelial, as células endoteliais se proliferam e migram para cobrir a área de lesão. Caso este processo seja ineficiente ou se a nova camada endotelial encontrar-se disfuncional, há formações de pequenos trombos associados a células inflamatórias secretoras de citocinas, quimiocinas, radicais livres, eicosanoides e uma variedade de outros fatores que atuam como quimiotáticos para células musculares lisas. Assim, áreas com lesão endotelial são altamente susceptíveis à formação neoíntima caracterizada inicialmente por alto conteúdo de células musculares lisas e fibroblastos, reduzindo o lúmen arterial (Figura 1) (Furchgott, Cherry et al. 1984, Radomski, Palmer et al. 1987, Landmesser and Drexler 2005, Mudau, Genis et al. 2012).

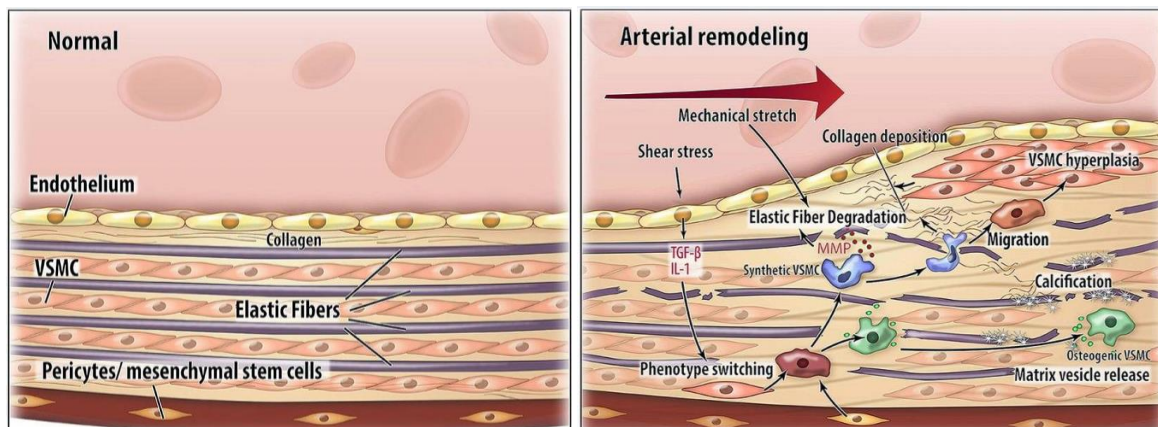


Figura 1: Mecanismos patofisiológicos do remodelamento arterial. No quadro a esquerda, uma visão esquemática de artéria normal. À direita, remodelamento arterial caracterizado na parede vascular através de estímulo mecânico, evidenciando degradação da lâmina elástica, calcificação da matriz extracelular, depósito de colágeno, proliferação e migração de célula muscular lisa (van Varik, Rennenberg et al. 2012).

2.1.2 A biomecânica envolvida no remodelamento vascular

Doenças, danos mecânicos à parede vascular ou mesmo o processo de envelhecimento leva a um remodelamento arterial em resposta a estes fatores. Embora seja considerado um evento natural do decorrer da idade, o remodelamento arterial primário pode estar associado a mudanças hemodinâmicas que levam a adaptação mecânica do vaso (Nichols 2005). Macroscopicamente, diversos tipos de remodelamento vascular podem ocorrer, a depender do tipo de leito vascular envolvido no processo. A figura 2 ilustra os principais tipos de remodelamento arterial que podem acarretar em espessamento ou adelgaçamento da parede vascular, com acometimento do diâmetro do lúmen (Mulvany, Baumbach et al. 1996).

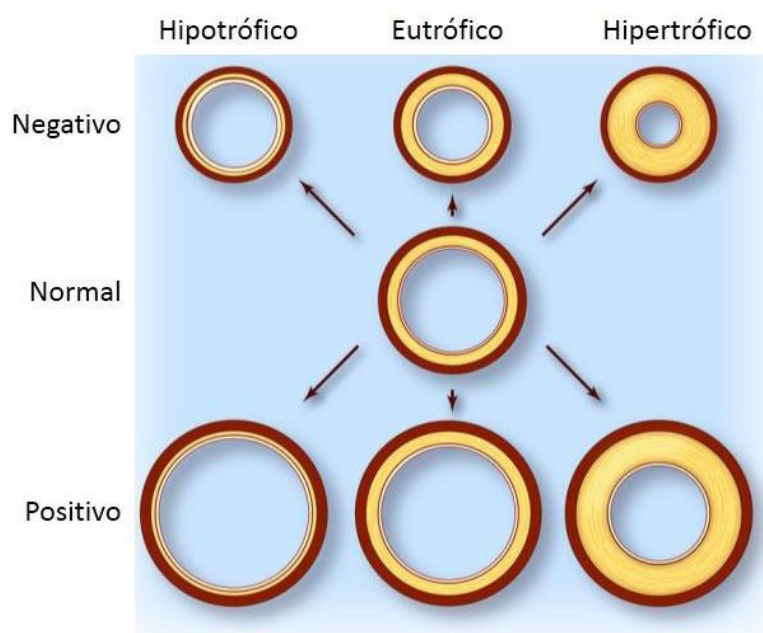


Figura 2: Tipos de remodelamento vascular. Adaptado de Mulvany, 1996 (Mulvany, Baumbach et al. 1996).

Sinais mecânicos fazem parte do desenvolvimento tecidual e homeostase, os quais podem influenciar o comportamento celular por induzir mudanças estruturais ou transduccionais (Fernandez-Sanchez, Brunet et al. 2015). Neste ínterim, as células endoteliais são capazes de perceber pequenas variações na direção, magnitude e

regularidade do estresse de cisalhamento induzido pelo fluxo sanguíneo. Em um adulto, quando um vaso experimenta um maior ou menor fluxo sanguíneo, suas células endoteliais começam um programa para aumentar ou diminuir o diâmetro, respectivamente. Estes mecanismos adaptativos são críticos para um bom funcionamento do sistema cardiovascular, mas os mecanismos por trás destes efeitos ainda não são bem compreendidos (Dolan, Kolega et al. 2013).

Quando o estresse de cisalhamento é do tipo laminar e constante é considerado ateroprotetor, enquanto estresse de cisalhamento não laminar ou turbulento produz diferentes efeitos. Estes dados se justificam pelo fato de que áreas vasculares expostas a um fluxo não-laminar são geralmente as mesmas da localização de placa aterosclerótica e regiões de hiperplasia da íntima (Zarins, Giddens et al. 1983, Ballermann, Dardik et al. 1998, Malek, Alper et al. 1999).

2.1.3 Remodelamento vascular e óxido nítrico

Nas células de mamíferos, três isoformas de óxido nítrico sintase (NOS) são capazes de produzir óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina e oxigênio. São elas: as isoformas neuronal (NOS1 ou nNOS), induzível (NOS2 ou iNOS) e endotelial (NOS3 ou eNOS). O produto, NO, atua no controle do tônus vascular, sendo um dos responsáveis pelo relaxamento (Ignarro, Byrns et al. 1987, Loscalzo 2013). O domínio redutase apresenta sítios de ligação para NADPH, FMN e FAD. Um elétron é transferido do NADPH, via FMN e FAD para o grupo heme, onde o oxigênio é reduzido. O grupo heme também recebe um segundo elétron da tetrahidrobiotperina (BH4) no domínio oxidase, resultando em produção de oxigênio e oxidação da BH4. A BH4 oxidada pode ser reciclada de volta para a forma reduzida ao receber outro elétron do domínio redutase da NOS. Para esta redução, a NOS hidroxila e oxida a L-arginina produzindo L-citrulina e NO (Figura 3) (Forstermann and Sessa 2012).

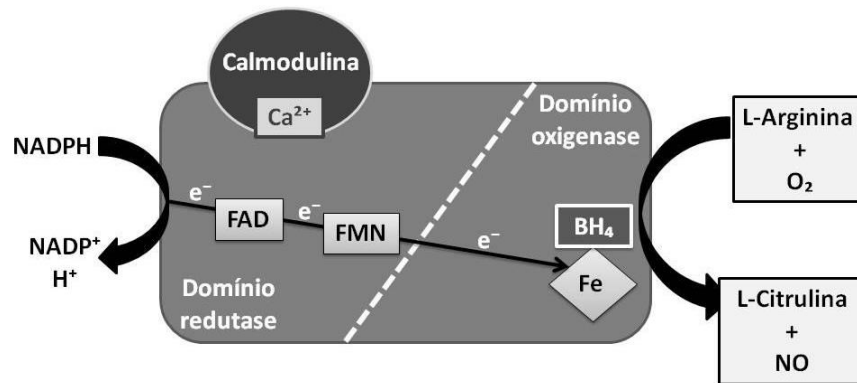


Figura 3: Representação esquemática ilustrando a formação de NO e L-citrulina a partir de L-arginina e O₂, utilizando como cofatores: ferro (Fe), BH₄, íons Ca²⁺, além de transferência de elétrons em uma reação envolvendo NADPH, FAD e FMN entre os domínios redutase e oxigenase.

A regulação da atividade das NOS se dá de forma complexa e de múltiplas maneiras. A associação com o complexo Ca²⁺/calmodulina acelera o fluxo de elétrons a partir do NADH para o grupo heme, aumentando a conversão da L-arginina em L-citrulina e NO. Nas isoformas constitutivas (eNOS e nNOS), a afinidade da ligação à calmodulina é aumentada por elevação de cálcio no citosol, enquanto a afinidade desta ligação já é alta na isoformas induzida (iNOS), mesmo em baixas concentrações de cálcio, devido a diferenças estruturais. Sendo assim, eNOS e nNOS são ativadas pelo aumento de cálcio citosólico, enquanto iNOS é constitutivamente ativa uma vez que é expressa. Adicionalmente, as atividades da eNOS e nNOS podem ser reguladas por fosforilação, de modo positivo ou negativo, ativando ou inibindo a enzima (Forstermann and Sessa 2012).

A redução na condução sanguínea pela artéria resulta em mudanças no local que envolvem dois principais aspectos: fluxo sanguíneo e tensão de oxigênio, resultando em mudanças na força hemodinâmica (Carmeliet 2000). O aumento do fluxo laminar resulta em estímulo de vias de sinalização celular, tais como RhoA, PI3K e PKA, que levam a ativação da via do NO. Os trabalhos comumente apontam uma ativação da eNOS pelo aumento do fluxo sanguíneo. Pouco se sabe sobre a ativação da nNOS pelas alterações de fluxo. Uma resposta inicial é gerada aumentando a produção de NO para facilitar a dilatação vascular e, assim, garantir a perfusão e trocas gasosas teciduais. Adicionalmente o estresse de cisalhamento aumenta a expressão de eNOS via ativação de quinases como a ERK1/2, o que pode reforçar a resposta. Finalmente, a produção de NO também pode contribuir para o

remodelamento ao induzir a proliferação de células endoteliais (Yu, Yu et al. 2005, Dai and Faber 2010).

O aumento de espécies reativas de oxigênio também pode regular a atividade da NOS, por esta ser dependente de fluxo de elétrons e a oxidação e redução de substratos. Uma perturbação neste fluxo de elétrons causa desacoplamento da NOS e produção de elevados níveis de radicais superóxido ao invés de NO. A reação instantânea dos dois leva à produção de peroxinitrito, que reduz a biodisponibilidade de BH₄ (Forstermann and Munzel 2006), além de oxidar a alça de ligação ao zinco, diminuindo a estabilidade de dímero da NOS. Desta forma, a transferência de elétrons entre os monômeros ocorre de forma irregular, dificultando a produção de NO e aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio como os radicais superóxido (Zou, Shi et al. 2002).

2.2 Estresse de cisalhamento e NO

As células endoteliais estão constantemente expostas ao estresse de cisalhamento hemodinâmico. O nível de estresse que estas células enfrentam varia de região para região vascular. Em áreas de alto estresse de cisalhamento, as células endoteliais estão alongadas, alinhadas e protegidas de inflamação. Em áreas de estresse de cisalhamento baixo ou oscilatório, as células endoteliais estão orientadas de modo randomizado e suscetíveis à inflamação (Caro, Fitz-Gerald et al. 1971, Cheng, Tempel et al. 2006).

Em decorrência do distúrbio hemodinâmico, o endotélio não conseguiria produzir NO de modo satisfatório, o que também estaria contribuindo para o processo de remodelamento vascular (Rudic and Sessa 1999). Como já sabido, o NO exerce importantes efeitos sobre o remodelamento vascular. É um gás, potente vasodilatador, que possui ações hemodinâmicas, exercendo efeitos em muitos tipos celulares, inibindo aderência de plaquetas e leucócitos ao endotélio, prevenindo proliferação e migração de células musculares lisas, influenciando a síntese e degradação da matriz extracelular e regulando expressão de vários genes (Forstermann 1986, Radomski, Palmer et al. 1987, Kubes, Suzuki et al. 1991, Forstermann, Closs et al. 1994, Fleming and Busse 1999).

Em situações de alto estresse de cisalhamento, as células endoteliais são estimuladas a aumentar a produção de NO. Tal fato foi observado por Kuchan e Frangos (1994), que expuseram células endoteliais a um fluxo laminar previamente definido, o que resultou em aumento da produção de NO. Esta produção começou aumentada em um pico e depois seguiu sustentada durante todo o processo de exposição ao fluxo, sendo que não houve ativação de iNOS (Kuchan and Frangos 1994). Este aumento na produção de NO pode ser consequência de um aumento na expressão da eNOS demonstrado em experimentos com célula endotelial humana da linhagem HUVEC e células endoteliais bovinas (BAEC) (Ranjan, Xiao et al. 1995, Uematsu, Ohara et al. 1995).

2.3 Canabinóides e NO: nova possibilidade terapêutica no remodelamento vascular

O reconhecimento de que o sistema endocanabinóide desempenha um papel proeminente na homeostase e resposta a patologias sugere um benefício terapêutico para fármacos baseados em endocanabinóides em várias desordens (Klein 2005, Di Marzo and Petrosino 2007, Turcotte, Chouinard et al. 2015).

O sistema endocanabinóide tem sido apontado como um novo alvo terapêutico para uma grande variedade de doenças inflamatórias e lesões teciduais no sistema cardiovascular. A relativamente recente descoberta de que um dos principais constituintes ativos das plantas do gênero *Cannabis*, o Δ -9-tetrahidrocanabinol (Δ 9-THC), foi capaz de inibir a progressão da placa aterosclerótica em camundongos (Baker, Gustafson et al. 2010) despertou o interesse de vários grupos sobre o possível papel dos canabinóides na inflamação, aterosclerose, nas restenoses vasculares, isquemia cerebral, infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca (Baker, Gustafson et al. 2010, Gyles, Carlberg et al. 2010, Lundman, Forsberg et al. 2010, Shah, Suri et al. 2010, Wen, Gustafson et al. 2010, Lin, Gustafson et al. 2011, Montecucco, Di Marzo et al. 2012).

Os canabinóides atuam principalmente via ativação de dois tipos de receptores acoplados à proteína $G_{(i/o)}$ – receptores CB1 e CB2 (Gustafson and Weiss 2010). Classicamente os receptores CB1 são encontrados em neurônios do sistema nervoso central

e periférico enquanto os receptores CB2 são detectados principalmente nas células do sistema imune (Capettini, Savergnini et al. 2012).

Apesar dos importantes efeitos da ativação central dos receptores CB1, o estudo dos efeitos mediados pela ativação periférica dos receptores CB2 tem sido destaque em várias patologias de caráter inflamatório crônico, principalmente relacionadas ao sistema cardiovascular. Para ativar endogenamente estes receptores, o sistema endocanabinóide conta com lipídeos endógenos que são produzidos por diferentes tipos celulares pelo cérebro e tecidos da periferia a partir do ácido araquidônico, e possuem diferentes afinidades pelos receptores CB1 e CB2 (Bisogno, Ligresti et al. 2005). A ativação dos receptores pelos endocanabinóides ativando a proteína G leva a uma via de sinalização celular que inibe adenilil ciclase na maioria dos tecidos e células, podendo estimular fosfolipase A e C e regular canais iônicos, como os de cálcio e potássio (Howlett 2005, Turu and Hunyady 2010).

Estímulo dos receptores canabinóides também leva a fosforilação e ativação de proteína quinases ativadas por mitógeno (MAPK), como p42/p44 MAPK, p38 MAPK e c-Jun N-terminal quinase, os quais podem regular fatores de transcrição nucleares (Howlett 2005, Turu and Hunyady 2010).

Entre os mais estudados endocanabinóides se encontram anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG) que são potentes ativadores de ambos receptores CB1 e CB2 (Di Marzo 2009). AEA e 2-AG não são estocados nas células, mas são sintetizados em resposta a estímulos fisiológicos e patológicos através de remodelamento fosfolipídeo. As vias e enzimas envolvidas na biossíntese e degradação destes endocanabinóides tem sido largamente identificada (Bisogno, Ligresti et al. 2005, Di Marzo 2009). Estas vias como alvo para modular níveis de endocanabinóides em condições patológicas como dor, distúrbios neurodegenerativos, inflamação gastrointestinal, disfunções metabólicas e obesidade, condições cardiovasculares etc, tem ganhado interesse na pesquisa em desenvolvimento terapêutico (Di Marzo 2008).

Efeitos cardioprotetores dos endocanabinóides mediados por ativação de receptores CB2 foram primeiro reportados em modelo *ex vivo* de corações isolados em sistema de Langendorff de pré-condicionamento induzido por lipopolissacarídeo (LPS) (Lagneux and Lamontagne 2001). Outros trabalhos sugerem que há um aumento na expressão dos

receptores CB2 em células endoteliais e musculares lisas humanas submetidas a estímulos pró-inflamatórios (Younis, Sharma et al. 2008, Abalo, Cabezos et al. 2011), em placas ateroscleróticas murinas e humanas (Baker, Gustafson et al. 2010), em formações neoíntimas pós-trauma (Ford, Cassin et al. 2011) e em miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca (Wittner, Christ et al. 1995). Por outro lado, amostras de placa aterosclerótica de carótidas de pacientes sintomáticos apresentaram redução na expressão dos receptores CB2 (Gyles, Carlberg et al. 2010). Desta forma, especula-se que a sinalização da via ativação de receptores CB2 seja parte de uma resposta protetora contra o desenvolvimento da placa aterosclerótica. Corroborando com o papel protetor da sinalização CB2, resultados com biópsias de rins humanos sugerem uma redução da expressão de receptores CB2 em pacientes com nefropatia avançada (Eriksson, Gustafson et al. 2010).

Em um importante estudo realizado por Montecucco e colaboradores (2009) foi demonstrado que tratamento preventivo com o agonista sintético CB2, o JWH133, reduziu significativamente a área infartada em modelo murino de isquemia e reperfusão do miocárdio, o que foi explicado neste trabalho pela redução do estresse oxidativo e infiltrado de neutrófilos, demonstrando uma atividade cardioprotetora do agonista CB2 (Montecucco, Lenglet et al. 2009).

Grande parte dos efeitos mediados pela ativação de receptores CB2 envolve a modulação de fatores de transcrição como o NF- κ B e da grande família MAP quinases (ERK, JNK, p38 MAPK, dentre outras). Estes dados sugerem que a ativação dos receptores CB2 poderia ser uma ferramenta útil no tratamento ou prevenção das formações neoíntimas vasculares. Além disso, dados recentes sugerem que a ativação dos receptores CB2 reduz a formação neoíntima após lesão endotelial por balão em carótidas (Ford, Cassin et al. 2011). Contudo, os estudos são muito preliminares e não há dados que indiquem os mecanismos envolvidos neste efeito.

Estudos demonstraram que os efeitos benéficos da ativação dos receptores CB2 envolviam produção de NO. De fato, inibição de NO mimetizou os efeitos do antagonismo do receptor CB2, inibindo o efeito cardioprotetor dos doadores de NO. O antagonismo de CB2, mas não o de CB1, reverteu os efeitos benéficos conquistados pela ativação de CB2 no músculo cardíaco (Joyeux, Arnaud et al. 2002).

Outro importante efeito da ativação de receptores canabinóides está relacionado à vasodilatação (Shmist, Goncharov et al. 2006, Scheen and Van Gaal 2007, Ford, Gulevich et al. 2011). Acredita-se que tanto a ativação de receptores CB1 quanto a ativação de receptores CB2 levem à vasodilatação por mecanismos dependentes ou independentes do endotélio vascular (Forde, Scribner et al. 2003, Seamon, Fass et al. 2007, Lemos, Resstel et al. 2010, Ford, Gulevich et al. 2011). Dentre as vias dependentes da participação do endotélio, acredita-se que a ativação da eNOS e consequente produção de NO seja a mais importante (Accorsi-Mendonca, Almado et al. 2008, Zakrzaska, Schlicker et al. 2010). Este fato apresenta particular importância clínica uma vez que a deficiência das vias envolvidas na síntese de NO apresentam estreita relação com o desenvolvimento de várias patologias vasculares como a aterosclerose, restenose pós-angioplastia, aneurisma arterial, dentre outras. Além disso, dados consistentes na literatura sugerem que a ativação de receptores CB1 e CB2 reduz a formação de placa aterosclerótica (Baker, Gustafson et al. 2010, Montecucco, Di Marzo et al. 2012). Desta forma, a ativação da síntese de NO endotelial poderia representar um importante mecanismo pelo qual o sistema canabinóide atue impedindo a deposição de placa e hiperplasia vascular.

Apesar de a eNOS ser comumente apontada como a principal via envolvida na síntese de NO endotelial, vários trabalhos recentes sugerem que a isoforma neuronal da NOS (nNOS) apresenta importante papel vaso-protetor, especialmente na aterosclerose e hiperplasias vasculares (Morishita, Tsutsui et al. 2002, Kuhlencordt, Hotten et al. 2006, Schodel, Padmapriya et al. 2009, Capettini, Cortes et al. 2011). A nNOS foi descrita recentemente pelo nosso grupo de pesquisa como um importante agente no controle da fisiologia vascular (Capettini, Cortes et al. 2008, Capettini, Cortes et al. 2010) e seu comprometimento está relacionado à disfunção endotelial ligada à aterosclerose (Capettini, Cortes et al. 2011). Estudos sugerem, ainda, que a deleção gênica da nNOS acelera a proliferação de células musculares lisas vasculares em formações neoíntimas frente a uma injúria mecânica vascular (Morishita, Tsutsui et al. 2002). Desta forma, substâncias que atuem ativando esta via poderiam apresentar potencial efeito nas complicações vasculares associadas à aterosclerose. Como descrito anteriormente, a ativação de receptores canabinóides leva à produção endógena de NO em vários tipos celulares. Trabalhos recentes sugerem especificamente que a ativação do sistema canabinóide pode modular

positivamente a via da nNOS em neurônios (Nagarkatti, Rieder et al. 2010). Contudo, este efeito ainda não foi demonstrado em células não neuronais. Assim, surge um importante ponto a ser discutido: a ativação de receptores canabinóides apresenta efeito vasculo-protetor por ativar a via da nNOS no sistema vascular? Uma vez ativada, a nNOS reduziria o processo de formações neointimas? Na tentativa de elucidar estes questionamentos, o presente projeto pretende avaliar o papel da nNOS nas formações neointimas de carótidas bem como avaliar o efeito dos receptores CB2 sobre esta via.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho é estudar o mecanismo envolvido no efeito vasculo-protetor dos receptores canabinóides CB2 em modelo de remodelamento arterial expansivo de carótidas de camundongos, bem como avaliar o envolvimento da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) nestes efeitos.

3.2 Objetivos Específicos

- a. Avaliar os efeitos da ativação dos receptores CB2 sobre a formação neoíntima e hiperplasia da camada média em carótidas de camundongo selvagem.
- b. Avaliar a participação da nNOS sobre a formação neoíntima e hiperplasia da camada média em carótidas após tratamento com agonista do receptor CB2.
- c. Determinar os níveis de expressão proteica da nNOS e eNOS (Western blot) e CB2, bem como de algumas proteínas envolvidas no processo de remodelamento mediante os diferentes tratamentos.
- d. Avaliar a produção de NO, H₂O₂ e de radicais superóxido nas carótidas e células humanas, após os diferentes tratamentos.
- e. Avaliar o papel dos receptores CB2 sobre a migração de células endoteliais de origem humana, e a função destas frente a estímulos de alteração de fluxo.

4. Materiais e métodos

4.1 Experimentos com modelo animal

4.1.1 Modelo animal

Foram utilizados camundongos C7bL6, machos, com 10 semanas de vida. Os animais foram adquiridos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) - UFMG, sendo mantidos posteriormente no biotério do Departamento de Farmacologia - ICB, UFMG, recebendo água e ração *ad libitum*, em ciclos de 12 horas entre claro e escuro. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da UFMG (CETEA-UFMG) sob protocolo número 386/15 (anexo 1).

4.1.2 Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram anestesiados através de uma injeção intraperitoneal de mistura de ketamina (87 mg/kg) e xilazina (13 mg/kg). Após indução anestésica, a artéria carótida comum esquerda foi localizada, isolada e cuidadosamente e ligada (ocluída) próximo à sua bifurcação com um fio estéril de seda trançada número 7,0 (Ethicon®). Nos animais falso-operados (*sham*), o fio foi apenas posicionado ao redor da artéria, sem comprimi-la. A ferida foi então suturada e o animal acondicionado sob manta aquecida em até a completa recuperação da anestesia. Para todos os experimentos os animais foram sacrificados 14 e 21 dias após a cirurgia de ligação da carótida para avaliação da extensão das formações neoíntimas. Para o sacrifício, os animais foram previamente anestesiados, de acordo com o protocolo acima, seguido de punção cardíaca para coleta do sangue (Guyton and Hartley 1985, Kumar and Lindner 1997).

4.1.3 Tratamento dos animais

Após a oclusão da carótida esquerda, os animais controle receberam, ao redor da carótida ocluída, 30 µL de uma solução de Pluronic F-127® 40% (Sigma-Aldrich) mantida em gelo, imediatamente após a oclusão. A 4°C, o Pluronic F-127® 40% encontra-se no estado líquido. Contudo, acima de 20°C o Pluronic F-127® solidifica-se, formando um gel.

Os animais tratados receberam a mesma formulação em gel contendo o agonista CB2 - JWH015 (JW - 0,5mg/animal. JWH015 foi dissolvido em etanol PA, sendo posteriormente adicionado ao gel de Pluronic (Montecucco, Di Marzo et al. 2012, Shi, Chen et al. 2014).

4.1.4 Coleta de tecidos

Após indução anestésica (como descrito anteriormente), os animais foram perfundidos com PBS sob pressão constante (70 mmHg) por 3 minutos. Para os experimentos de imunofluorescência, após a perfusão com PBS, os segmentos das carótidas ocluídas e contra-lateral dos animais operados, bem como as carótidas dos animais sham, foram embebidos em meio para congelamento de tecidos (Tissue-Tek OCT Compound; Sakura®, USA) e congelados. Para as análises morfométricas, as carótidas dos animais perfundidos com PBS foram coletadas em bloco, junto com todo o pescoço, fixadas em solução de Bouin (30 volumes ácido pícrico, 10 volumes de formol a 40% e 2 volumes de ácido acético) e posteriormente incluídas em parafina para posterior microtomia (5µm) e coloração (com HE).

4.1.5 Ensaios morfométricos

A eficácia do procedimento cirúrgico em induzir formação neoíntima ao longo do tempo foi confirmada por análise histológica (coloração com HE) das carótidas esquerda (ipsilateral - ligada) e direita (contralateral - controle). As medidas da espessura da parede total, camadas íntima, média e adventícia, bem como avaliação da área do lúmen das carótidas dos animais sham, controle e tratados com JWH015 foram realizadas após 14 e 21 dias de oclusão.

4.1.6 Imunofluorescência em cortes de carótidas

Foram avaliados alguns aspectos associados às formações neoíntimas induzidas pela alteração de fluxo sanguíneo. De modo geral, os cortes de carótida incluídas em OCT (5µm) foram fixados com acetona gelada e lavados com PBS. Os cortes foram então permeabilizados (Triton X-100 a 0,1% em PBS), seguido de bloqueio por 1 hora (Triton X-100 a 0,1% + BSA 4% em PBS). Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário *overnight* a 4°C. A seguir, as seções foram lavadas com PBS e posteriormente

incubadas com anticorpo secundário por 2h a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, as lâminas foram montadas com meio de montagem contendo DAPI (*DAPI mounting medium*; Invitrogen, USA) para evidenciar o núcleo. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse Ti do Centro de Processamento e Aquisição de Imagens (CAPI) do ICB-UFMG. A intensidade de fluorescência foi analisada e corrigida pela área selecionada através do software ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

Foram imunolocalizados músculo liso vascular (células α -actina⁺, SC 32251, Santa Cruz Biotechnology®), metaloproteinase 8 (MMP-8, SC8848, Santa Cruz Biotechnology®), o receptor CB2 (SC25494, Santa Cruz Biotechnology®) e a enzima nNOS (SC5302, , Santa Cruz Biotechnology®), marcação de células endoteliais (vWF, SC14014, Santa Cruz Biotechnology®), colágeno (SC9855, , Santa Cruz Biotechnology®) e nitrotirosina (SC71705, , Santa Cruz Biotechnology®), todos adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology. Anticorpos secundários conjugados a sondas fluorescentes Alexa fluor 488, 568 e 594.

4.1.7 Determinação da produção de radicais superóxido e NO *in situ* em cortes de carótidas

Para avaliação da produção de radicais superóxido ou NO nos grupos sham, controle e tratado com JWH015, os cortes de carótida foram tratados com sequestrador de superóxido MnTMPyP (Mn, 10 μ M) e N-propil L-arginina (NP, 100nM) ou com PBS (controle) por 30 minutos, seguido da incubação com as sondas específicas. Para se avaliar a produção de radicais superóxido foi utilizada a sonda Dihydroethidium (DHE - 1 μ M; 30 minutos; Invitrogen, USA). Para a produção de NO, foi utilizada a sonda 4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein (DAF-FM, 5 μ M; 30 min; Invitrogen, USA). Os cortes foram então lavados e fixados com paraformaldeído 4%, seguido de montagem com meio contendo DAPI e fotografadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse Ti. A intensidade de fluorescência foi analisada e corrigida pelo tamanho da área selecionada através do software ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

4.1.8 Determinação do conteúdo de colágeno pela coloração dos cortes de carótida com picrossirius red

Para se estimar o conteúdo total de colágeno, os cortes congelados das carótidas foram corados com solução de picrossirius red (picrossirius 0,1% em solução de ácido pícrico 1,3%). Para tal foram utilizadas três lâminas contendo oito cortes de carótida em cada. As imagens foram capturadas em microscópio de luz polarizada com objetiva apocromática (20x) (magnificação final 2000x). As imagens foram digitalizadas com uma microcâmera JVC TK-1270 /JCB e transferida para um analisador (software Image-Pro Plus 4.5, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, Maryland).

4.2 Experimentos com modelo celular

4.2.1 Linhagem celular

Foi utilizada linhagem de células endoteliais humanas EA.hy926 (derivadas da hibridização de uma linhagem tumoral com as células primárias HUVEC -*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) comercialmente disponível (ATCC, USA). As células EAhy926 apresentam preservado fenótipo endotelial mas com alta taxa de multiplicação. As células foram mantidas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) completo, enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina. Para a realização dos experimentos, as células foram plaqueadas em placas de 6 e 12 poços, onde foram colocados lamínulas, quando necessário. Para os experimentos, as células foram cultivadas até confluência e, então, soro fetal bovino foi reduzido a 0,5% por, pelo menos, 24h de antecedência para evitar que as células se encontrem em processo de divisão na ocasião do experimento.

4.2.2 Exposição das células endoteliais aos tratamentos

As células EA.hy926 foram dispostas em placas de 6 ou 12 poços e, após a confluência (~90%), as células foram cultivadas por 1 ou 24 horas na presença ou ausência de JWH015 (1µM). Os mesmos protocolos foram repetidos na presença do inibidor da nNOS, N-propil L-arginina (NP, 100 nM) ou TRIM (10 µM) ou Inibitor 1 (1µM), inibidor

da proteína quinase A, H-89 (10 μ M), inibidor da ERK, PD98059 (10 μ M), inibidor da PI3K, LY294002 (10 μ M), inibidor de proteína fosfatase 1 e 2 (PP1 e PP2), Calyculyn (10 nM).

4.2.3 Ensaio de viabilidade celular

Para se avaliar o efeito das diferentes drogas administradas sobre a viabilidade celular, foi utilizado o método colorimétrico do MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) (Gerlier and Thomasset 1986, Twentyman and Luscombe 1987). Para tal ensaio, as células foram plaqueadas a 7×10^4 por poço, em placa de 96 poços e estimuladas com os tratamentos previamente descritos. Após o tratamento, foi adicionado o reagente MTT (20 μ L de uma solução a 5mg/mL) por um período de 3,5h a 37°C; O sobrenadante foi cuidadosamente removido e se adicionou o solvente dos cristais de formazan (4 mM HCl, 0,1% Nonidet P-40). As placas foram então incubadas sob agitação por 15 minutos no escuro e, após este período, foi realizada leitura a 590nm de absorbância.

4.2.4 Exposição das células ao fluxo oscilatório

Uma vez que o modelo de remodelamento vascular utilizado neste projeto é caracterizado pela imposição de um shear stress oscilatório (OSS) às carótidas, resolvemos testar um modelo de OSS em cultura celular. As células EA.hy926 foram plaqueadas em placas de 6 poços e, após a confluência (~90%), as células foram expostas por até 24 horas com JWH015 (1 μ M) e/ou bem como outros tratamentos, sendo divididas em dois grupos: um exposto ao OSS (mimetizando condições encontradas na situação de oclusão da carótida) e outro grupo em repouso. O *shear stress* oscilatório foi gerado pela manutenção das placas em shaker orbital a 200rpm (Dardik, Chen et al. 2005).

4.2.5 Inferência da produção de NO pelo método de Griess

Após cultivo e confluência das células endoteliais, estas foram submetidas aos tratamentos descritos e, após período estabelecido, o sobrenadante foi removido e passado para placa de 96 poços. Foi adicionada solução de sulfonilamida (1% em solução de ácido fosfórico 5% em água) por 10 min, protegido da luz. Em seguida foi adicionada solução de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED; 0,1%). Após 10 min procedeu-se a leitura a 550nm. A

determinação de nitrito e nitrato na amostra foi calculada através de curvas-padrão realizadas a cada experimento (Misko, Schilling et al. 1993).

4.2.6 Medidas da produção endotelial de NO, superóxido e H₂O₂

Foram utilizadas sondas intracelulares fluorescentes para a detecção das referidas espécies por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. Após os tratamentos, células foram carregadas com as sondas fluorescentes intracelulares para o NO (4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein, DAF-FM, 2,5µM; Invitrogen, USA), superóxido (dihydroethidium, DHE, 2,5 µM; Invitrogen, USA) e H₂O₂ (dihydrodichloro-fluorescein diacetate, H₂-DCF-DA, 2,5µM; Invitrogen, USA) por 30 minutos. Após a incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% para posterior análise por citometria de fluxo usando o FACS calibur system (BD, USA). Os dados foram analisados pelo software FlowJO. A média de fluorescência positiva para os canais FL1 (DAF e DCF) e FL2 (DHE) foi multiplicada pela porcentagem de células marcadas da população total de células endoteliais (definida pela delimitação de tamanho e granulosidade). Para os experimentos de microscopia de fluorescência, as células foram plaqueadas em lamínulas, tratadas com as drogas descritas anteriormente, fixadas em paraformaldeído a 4% e montadas em laminas utilizando-se meio de montagem contendo DAPI. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência em microscópio Nikon Eclipse Ti (Nikon, USA). Os resultados foram analisados pelo software imageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

4.2.7 Análise da expressão proteica por Western blot

Foram avaliadas as expressões do receptor CB2 e das isoformas da NOS (eNOS e nNOS), bem como o sítio de fosforilação da nNOS (nNOS^{ser852}, nNOS^{ser1412}) e da eNOS (eNOS^{ser1177}) em lisado de células endoteliais submetidas aos tratamentos e comparadas ao controle. Após o período de incubação, as células foram lisadas em tampão de lise (NaCl 150 mmol/L; Tris 50 mmol/L; EDTA.2Na 5 mmol/L; MgCl₂ 1 mmol/L) acrescido de 0,3% de Triton X-100, 0,5% de SDS e de coquetel de inibidores de proteases (SigmaFast[®],

Sigma), na proporção de 10^6 células para 150µl de tampão de lise enriquecido com o coquetel de inibidores de proteases. O lisado celular foi centrifugado a 14000 rpm por 20 minutos para separação da fração proteica. A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada através da medida da absorbância por espectrofotometria (260nm em Nanodrop®). As amostras foram diluídas em tampão da amostra (4X 0.25M tris HCl, pH=6.8, 3% Glycerol, 1%SDS, 0.6% b-mercaptoetanol, 0,25% Azul de Bromofenol) e aquecidas a 100°C por 5 minutos. Para separação, foram aplicados 60µg de proteína em gel de SDS-PAGE (sodium dodecyl (lauryl) sulfate-poliacrilamida) a 10% utilizando-se o sistema Mini-Protean tetra cell (Biorad). Após serem separadas no gel de poliácridamida (100V; 90 minutos), as proteínas foram transferidas (100V; 100 minutos) para uma membrana de nitrocelulose com poro de 0,45µm (Millipore, USA). A membrana foi então lavada em água destilada e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (3% de albumina e 0,1% de Tween-20, em TBS). Após o bloqueio, a membrana foi incubada overnight a 4°C com o anticorpo primário específico diluído em solução de bloqueio. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-NOS1 (nNOS) (1:500; monoclonal feito em coelho; Santa Cruz), antiphospho-NOS1^{Ser852} (p-nNOS^{Ser852}) (1:500; monoclonal feito em camundongo; Santa Cruz), antiphospho-NOS1^{Ser1412} (p-nNOS^{Ser1412}) (1:500; monoclonal feito em camundongo; Santa Cruz), anti-NOS3 (eNOS) (1:500; monoclonal feito em coelho; Santa Cruz), antiphospho-NOS3^{Ser1177} (p-eNOS^{Ser1177}) (1:500; monoclonal feito em camundongo; Santa Cruz), anti-beta-tubulina (1:500; monoclonal feito em camundongo; Santa Cruz) . Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0,3% de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com os anticorpos secundários conjugados a sondas fluorescentes Alexa fluor 488, 633 e 647 (1:1000) diluídos em 1% de albumina em TBS-Tween. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por três vezes). As bandas foram detectadas por uma reação de fluorescência e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageJ (Capettini, Cortes et al. 2008, Capettini, Cortes et al. 2011).

4.2.8 Imunofluorescência

A expressão da nNOS, dos receptores CB₂ e do marcador de proliferação celular, Ki67, foi também avaliada pela técnica de imunofluorescência. Após os estímulos ou tratamentos, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, seguido de bloqueio (BSA 4%), incubação com os anticorpos primários específicos (anti-nNOS, anti-CB e anti-Ki67) e anticorpos secundários conjugados à sonda fluorescente Alexa Fluor 488, 568 ou 594. O núcleo foi evidenciado pela montagem da preparação com o DAPI mounting media (Invitrogen, USA). As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência em microscópio Nikon Eclipse Ti (Nikon, USA).

4.2.9 Ensaio de fenda

Foram realizados ensaios de fenda para avaliar migração e proliferação de células endoteliais. As células, após confluência, foram submetidas a tratamento com agonista e antagonista CB₂ - JWH015 (1µM), bem como inibidor da nNOS (inibitor 1, 1µM). Em seguida, as células foram expostas ao dano (risco representando uma fenda no centro de cada poço da placa) para que fosse avaliada a porcentagem de fechamento da fenda ao longo do tempo (máximo 30 horas). As imagens foram obtidas em microscópio invertido (Zeiss, USA) e o resultado expresso como percentual de fechamento da área da fenda pelo software T-scratch (Geback, Schulz et al. 2009).

4.2.10 Avaliação da proliferação celular por citometria de fluxo

As células foram plaqueadas em placas não aderentes de 12 poços para realização dos tratamentos. Após tempo determinado decorrido para tratamentos e exposição ao fluxo oscilatório e repouso, as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. As células foram incubadas com marcador de proliferação celular Ki67 e fixadas com solução de paraformaldeído 4% em PBS. A leitura de 15000 células por evento foi realizada no citômetro FACScalibur (BD Biosciences) e os resultados foram analisados pelo software FlowJo. A média de fluorescência foi multiplicada pela porcentagem de células marcadas pela população total e o resultado foi expresso como fluorescência média.

4.3 Análises estatísticas

Todos os resultados foram expressos como $\text{media} \pm \text{EPM}$. O teste de Grubbs foi usado para identificação de outliers. Os resultados foram comparados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias quando paramétricos (avaliados pelo teste de normalidade D'agostino-Pearson), usando como post hoc o teste tukey ou o teste bomferroni para medidas contínuas no tempo. Quando os dados foram não paramétricos as comparações foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis, usando como post hoc o teste de Dunn's. Demais resultados comparando somente 2 grupos foram analisados através do teste T student não pareado para dados paramétricos e pelo teste Mann-withney para dados não paramétricos. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Caracterização do modelo de remodelamento vascular

O modelo de remodelamento vascular utilizado neste trabalho é caracterizado por um aumento na espessura das camadas média e íntima da carótida esquerda de camundongo selvagem da linhagem C57Bl/6J. A Figura 1 exemplifica o processo de formação neointima na carótida esquerda, comparada à contralateral, 14 dias após a cirurgia. Neste primeiro momento, os cortes do pescoço em bloco foram preferidos para melhor preservação e evidenciação das estruturas anatômicas. A Figura 1 representa um corte corado com HE.

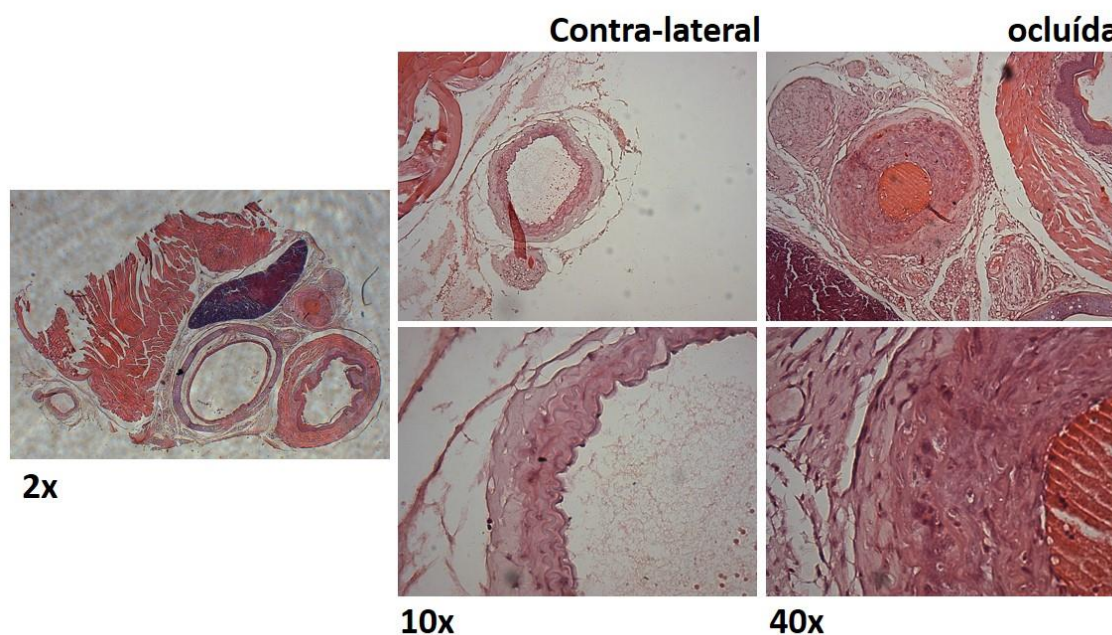


Figura 1: Remodelamento vascular em animais C57bl/6J induzido pela cirurgia de oclusão total da carótida esquerda. A imagem acima demonstra o espessamento da parede da carótida esquerda (ocluída) após 14 dias de oclusão. A carótida contralateral apresenta estrutura preservada. As imagens são representativas de cortes em parafina corados em HE, fotografados nos aumentos de 2x, 10x e 40x.

Um estudo piloto do nosso grupo revelou que a técnica utilizada só é eficaz na indução de formações neointimas em camundongos selvagens a partir de 14 dias pós-cirurgia. Através dos gráficos e imagens abaixo, podemos ver um aumento na espessura da parede das carótidas esquerdas após 14 e 21 dias de oclusão, comparados ao sham,

demonstrando a eficácia deste modelo na formação neointima (Figura 2). Pudemos observar que o espessamento da parede arterial aumenta significativamente com o tempo, sendo maior aos 21 dias de oclusão. Uma vez validado o modelo, partimos para análises mais detalhadas em animais controles e tratados localmente com o agonista canabinóide.

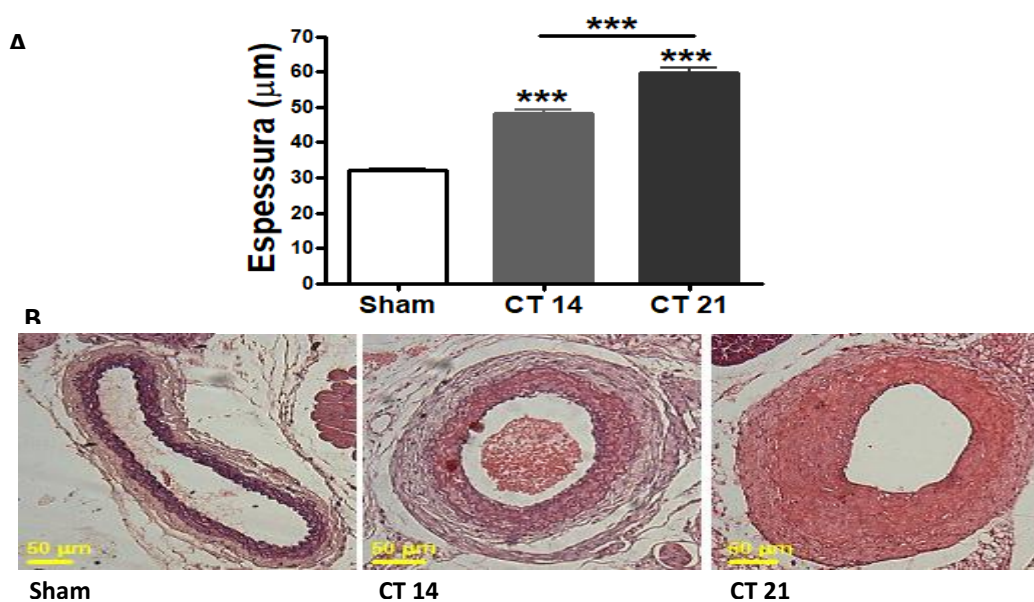


Figura 2: Efeito da cirurgia de oclusão sobre o remodelamento de carótida ao longo do tempo. Os animais foram divididos em três grupos: sham (falsamente operados), 14 dias e 21 dias pós-occlusão (n=5/grupo). Após este período, as carótidas foram cortadas (5µm), coradas em HE e analisadas quanto à espessura total da parede. ***p<0,001.

5.2 Efeito da modulação do receptor CB2 sobre o remodelamento vascular

A espessura das camadas íntima e média, espessura da parede arterial e a área do lúmen, foram avaliados em animais tratados localmente com o agonista CB2, JWH015 (1mg por animal, em gel de plurônico perivascular). O *delivery* local de JWH015 reduziu significativamente a formação neointima (espessura da camada íntima; Figura 3A) e impediu o aumento de espessura da camada média (Figura 3B) reduzindo, assim, a espessura total da parede arterial tanto nos tempos de 14 e 21 dias (Figura 3C). Ao se analisar a área do lúmen, pudemos observar uma redução gradual da luz arterial após 14 e

21 dias (Figura 3D). Contudo, o tratamento local com o JWH015 retardou a oclusão da luz arterial (Figura 3D).

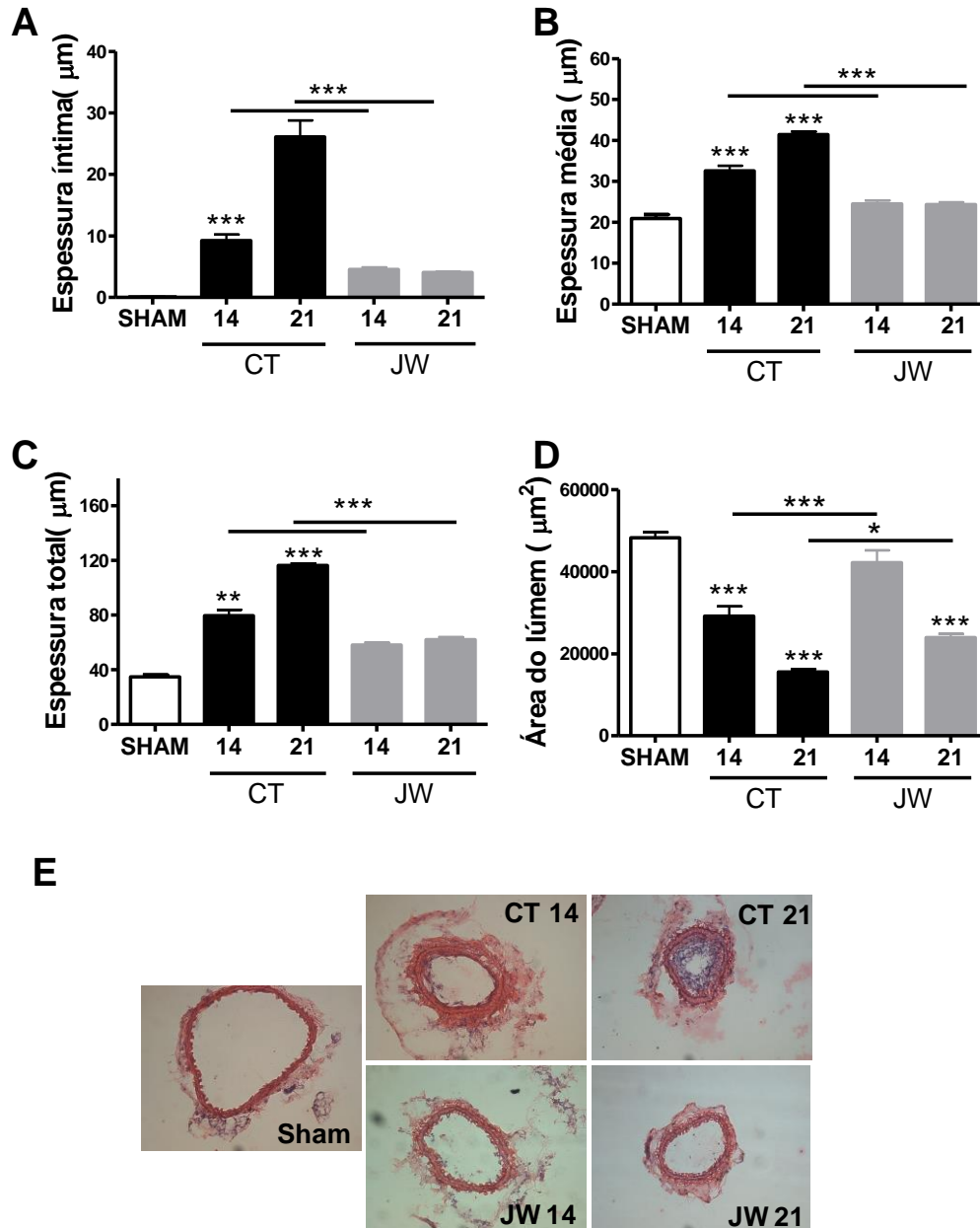


Figura 3: Efeito do tratamento com agonista CB2 - JWH015 sobre o remodelamento vascular. Os gráficos mostram as medidas das camadas íntima (A), média (B) e espessura da parede total (C) em μm . Os dados representam a média de 5 medidas por corte. A área do lúmen também foi analisada (D) e os resultados expressos em μm^2 . Os cortes foram obtidos de amostras de carótidas após 14 e 21 dias, incluídas em OCT, cortadas e coradas com HE. (n=5, sendo analisados oito cortes por lâmina). ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05. E: Imagem representativa.

Uma vez que o tratamento com o JWH015 preveniu o espessamento da parede e a redução da luz arterial, nosso próximo passo foi avaliar o efeito do mesmo sobre alguns fatores envolvidos no remodelamento vascular induzido pela cirurgia de oclusão. O primeiro fator avaliado foi o conteúdo de colágeno nas artérias. Assim, o conteúdo de colágeno arterial foi avaliada por imunofluorescência (Figura 4) e pela coloração com picrossirius red (Figura 5). A imuno-marcação para colágeno demonstrou aumento significativo do mesmo nos grupos controle, sugerindo um aumento na fibrose, a que pode também ser responsável pelo aumento da lesão aos 14 e 21 dias (Figura 4). Contudo, esta resposta foi totalmente prevenida pelo tratamento com JWH015 (Figura 4). Como as análises de fluorescência não nos fornece uma ideia real da área positiva ao colágeno, realizamos a coloração com o picrossirius red (Figura 5). Assim como na imunofluorescência para o colágeno, a coloração com picrossirius red demonstrou que a cirurgia aumentou o conteúdo de colágeno, o qual foi prevenido pelo tratamento com o JWH015 (Figura 5).

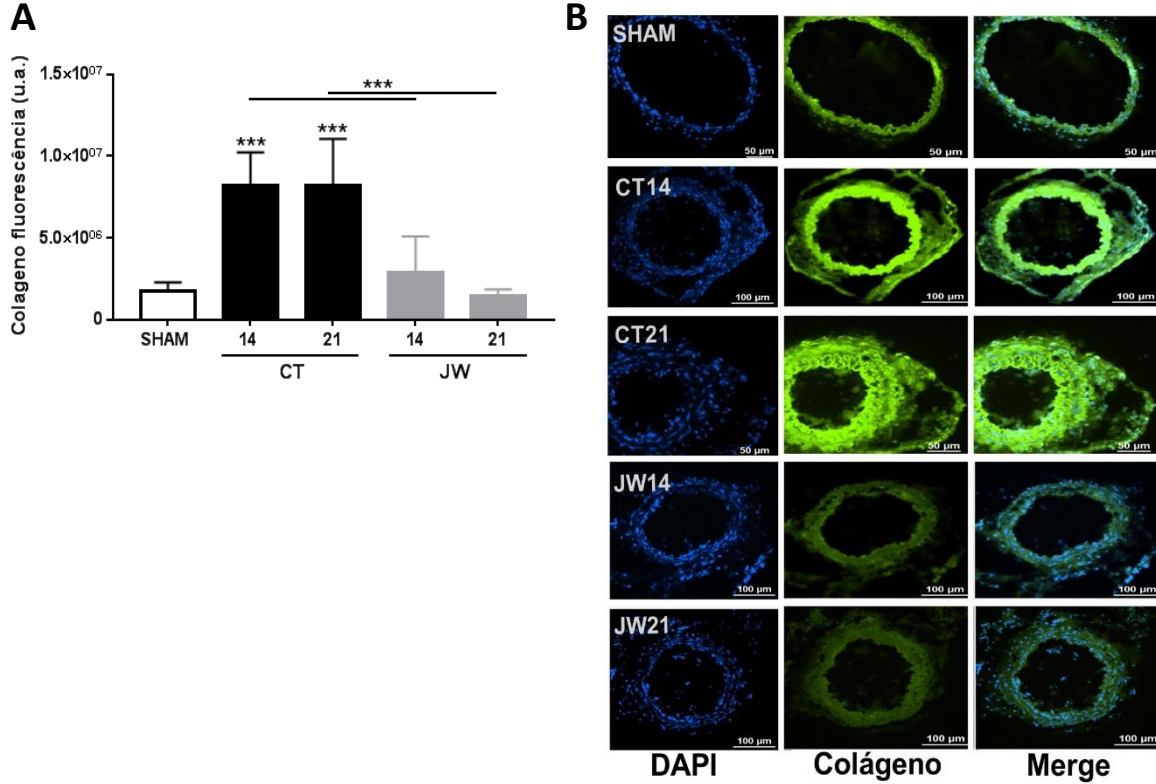


Figura 4: A. Efeito do tratamento com agonista JWH015 sobre a expressão de colágeno. A oclusão por 14 e 21 dias levou a um aumento na expressão de colágeno no controle, o que foi prevenido com tratamento com JWH015 nos dois tempos nas camadas íntima e média, (n=5, sendo 8 cortes por lâmina). ***p<0,001. B. Imagem representativa.

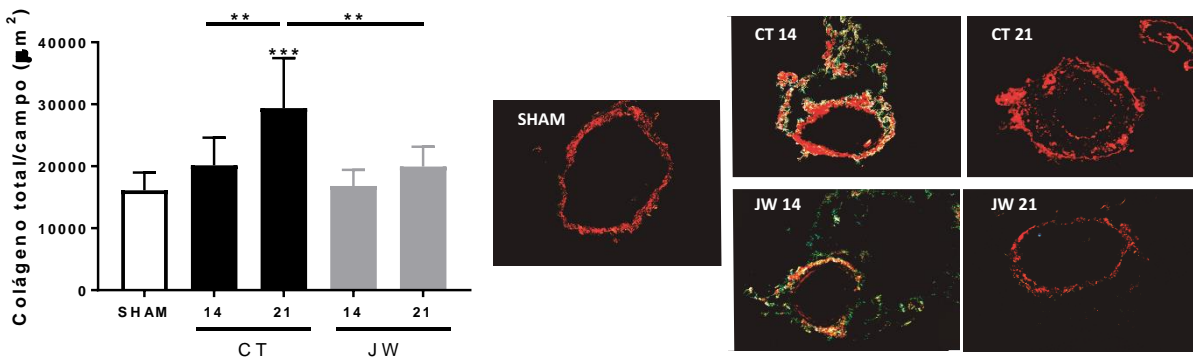


Figura 5: A. Efeito do tratamento com agonista JWH015 sobre a produção de colágeno. A oclusão demonstrou um aumento de colágeno acentuado com 21 dias de oclusão no controle e prevenido com JWH015 nas camadas íntima e média, (n=4, sendo 8 cortes por lâmina). ***p<0,001, **p<0,01. B. Imagem representativa.

O processo de remodelamento arterial não associado a dislipidemias comumente envolve ativação de metaloproteinases de matriz, proliferação e migração de células musculares lisas, culminando no aumento da espessura da parede e redução da luz arterial. Contudo, nossos resultados anteriores mostraram aumento no conteúdo de colágeno, o qual é degradado pelas metaloproteinases. Fez-se então necessário investigar se o aumento no colágeno seria devido a uma redução de metaloproteinases de matriz. A expressão da metaloproteinase 8 (MMP8) na camada média arterial foi aumentada após 14 e 21 dias pós-cirurgia (Figura 6). Estes dados são compatíveis com o aumento de colágeno encontrado nos experimentos anteriores. De forma surpreendente, o tratamento com o JWH015 reduziu a expressão da MMP8 (Figura 6). Este dado nos causou surpresa tendo em vista que o tratamento com o JWH015 também reduziu o conteúdo de colágeno arterial. Este resultado talvez possa ser explicado pelo fato de que o aumento do colágeno pode levar a um mecanismo de aumento na expressão e/ou atividade de metaloproteinases a fim de conter o processo fibrótico.

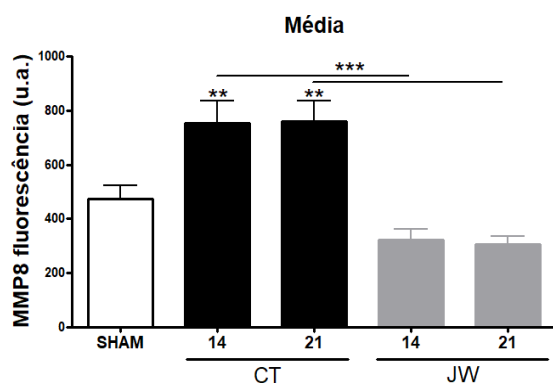


Figura 6: Efeito do tratamento com agonista JWH015 sobre a expressão de MMP-8. Cortes de carótidas tratadas com agonista CB2 foram submetidas à oclusão por 14 e 21 dias e comparadas ao grupo controle e sham para observar a expressão de MMP-8 na camada média, (n=5, sendo 8 cortes por lâmina). ***p<0,001, **p<0,01.

Além do conteúdo de colágeno e expressão de metaloproteinases de matriz, foi também avaliada a participação de músculo liso vascular, visto que o aumento na espessura do vaso também pode ser justificado pelo aumento no número ou tamanho de células musculares. Para tanto, foi utilizada a α -actina, um marcador de células musculares lisas. Em condições fisiológicas, não existem células musculares lisas na camada íntima. Por esta

razão, a expressão de α -actina na camada íntima só foi avaliada após 14 e 21 dias (Figura 7A). Pudemos verificar uma expressão considerável de α -actina após 14 dias, a qual foi reduzida após 21 dias (Figura 7A). Apesar de inesperado, este dado pode ser facilmente explicado pelo aumento de colágeno aos 21 dias. Neste tempo, a matriz muscular pode estar sendo gradualmente substituída por uma matriz fibrosa. Contudo, o tratamento com o JWH015 reduziu de forma significativa o conteúdo de células musculares lisas na neoíntima após 14 e 21 dias (Figura 7A). Ao se analisar a camada média, pudemos observar um aumento gradual de α -actina aos 14 e 21 dias (Figura 7B). Diferentemente da camada íntima, a camada média já contém células musculares lisas fisiologicamente. Por esta razão utilizamos o animal sham como controle. Tal qual ocorreu na íntima, o tratamento com o JWH015 reduziu a marcação de α -actina após 14 e 21 dias (Figura 7B).

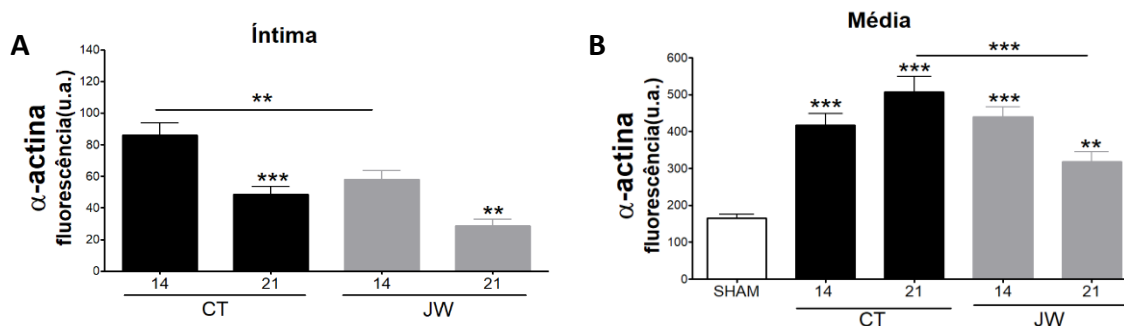


Figura 7: Efeito do tratamento com agonista JWH015 sobre a expressão de α -actina. Cortes de carótidas tratadas com agonista CB2 foram submetidas à oclusão por 14 e 21 dias e comparadas ao grupo controle e sham para observar a expressão de α -actina nas camadas íntimas (A) onde se evidenciou uma diminuição no controle com 21 dias, e ainda mais pronunciada, com tratamento de JWH015 com 14 e 21 dias e na camada média (B), onde se observou um aumento no controle e no tratado, sendo no grupo tratado com 21 dias uma menor expressão da proteína (n=5, sendo 8 cortes por lâmina). ***p<0,001, **p<0,01.

O conteúdo de fibras colágenas e células musculares lisas são essenciais para a determinação da extensão da lesão neste modelo. Por esta razão foram analisados acima o conteúdo de colágeno, expressão de MMP8 e o conteúdo de células musculares lisas. Contudo, sabemos que a integridade endotelial é fator fundamental para o processo de remodelamento vascular. Foi investigada, então, a integridade do endotélio através do marcador endotelial, fator de Von Willebrand (VWF). De forma inesperada, encontramos

um aumento de células endoteliais na camada íntima das carótidas após 14 e 21 dias de oclusão, o que foi prevenido pelo tratamento com o JWH015 (Figura 8).

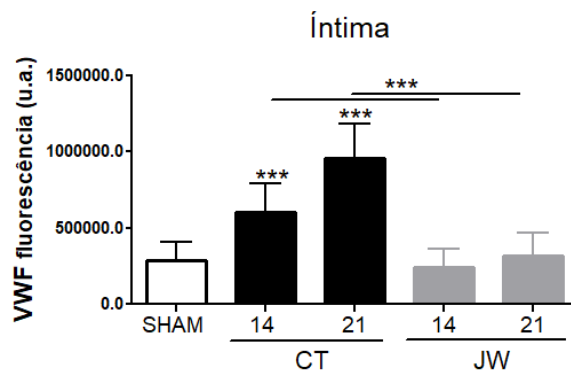


Figura 8: Efeito do tratamento com agonista JWH015 sobre a expressão de VWF, um marcador endotelial. Cortes de carótidas tratadas com agonista CB2 foram submetidas à oclusão por 14 e 21 dias e comparadas ao grupo controle e sham para observar a expressão de VWF na camada íntima, que se demonstrou aumentada no controle, contudo, teve o aumento prevenido pelo tratamento com agonista CB2 (n=5, sendo 8 cortes por lâmina). ***p<0,001.

Apesar do esperado componente muscular e fibroso das formações neointimas neste modelo, é possível que boa parte das células encontradas na formação neointima seja de células endoteliais.

5.3 Produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio durante o remodelamento vascular e sua modulação pelo agonista CB2 - JWH015

O processo de remodelamento vascular é estritamente relacionado a um estresse endotelial decorrente da mudança brusca do fluxo sanguíneo, com esperada produção de fatores que poderiam promover o restabelecimento da função normal, como NO, por exemplo. Contudo, outros fatores envolvidos no processo do dano, como espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (como o peroxinitrito) também podem ser produzidos. Por esta razão, foi avaliado um indicador de nitrosilação proteica, a nitrotirosina, por imunofluorescência. Pudemos observar um aumento de nitrotirosina após 14 e 21 dias no controle, sendo mais acentuado aos 14 dias de oclusão (Figura 9). Contudo, a marcação para

nitrotirosina encontrou-se significativamente diminuída pelo tratamento com o agonista CB2 aos 14 e 21 dias (Figura 9), sugerindo um menor estresse oxidativo.

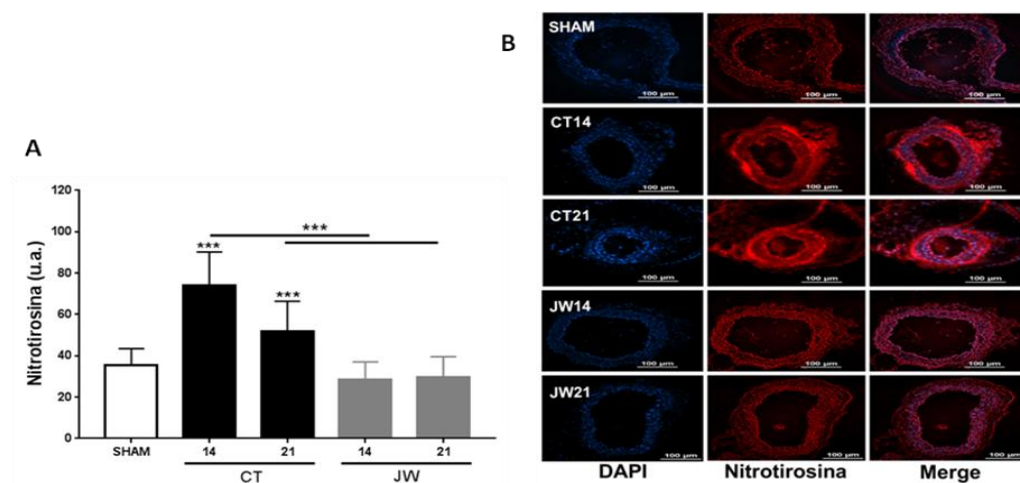


Figura 9: Marcação de nitrotirosina nas carótidas. A. Cortes de carótidas tratadas com agonista CB2 submetidas à oclusão por 14 e 21 dias e comparadas ao grupo controle e sham foram marcadas com nitrotirosina para observar a produção de espécies reativas de nitrogênio, que se demonstrou aumentado no controle, mas não no tratamento com JWH015. *** $p < 0,001$. B. Imagem representativa.

A formação de nitrotirosina está comumente associada à produção de peroxinitrito, resultado da reação entre NO e radicais superóxido. A partir do resultado anterior (Figura 10), foi avaliada a produção de NO e radicais superóxido pelas sondas fluorescentes intracelulares DAF-FM DA e DHE, respectivamente. Como obtivemos maior marcação para nitrotirosina aos 14 dias, utilizamos este tempo para as demais análises.

A produção de NO e de radicais superóxido apresentaram-se significativamente aumentadas após 14 dias de oclusão nos animais controle (Figuras 10 e 11, respectivamente). Contudo, o tratamento com o JWH015 aumentou a marcação para o NO (Figura 10), mas reduziu a marcação para radicais superóxido (Figura 11). Os dados de aumento de nitrotirosina (Figura 9), de NO (Figura 10) e de radicais superóxido (Figura 11) aos 14 dias, sugerem fortemente que a cirurgia de oclusão pode estar ocasionando um desacoplamento das NOS com subsequente aumento na produção de superóxido e peroxinitrito. De forma significativa, os dados obtidos após o tratamento com o agonista CB2 sugerem que o mesmo pode estar prevenindo o remodelamento pela melhora na biodisponibilidade do NO.

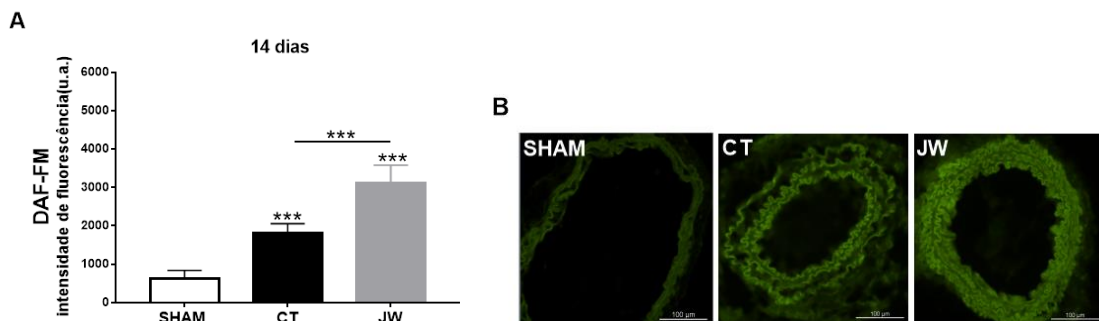


Figura 10: Detecção de NO em cortes de carótidas após 14 dias de cirurgia. **A.** Intensidade de fluorescência do DAF-FM. Os dados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência e como média±EPM de pelo menos 5 animais (média de 10 cortes por animal). Dados mostram aumento na produção de NO nos animais ocluídos, sendo maior no grupo tratado com JWH015. *** $p < 0,001$. **B.** Imagens representativas de carótidas de animais sham, controle (CT; não tratados) e tratados com o agonista CB2 JWH015 (JW: 1 mg/animal).

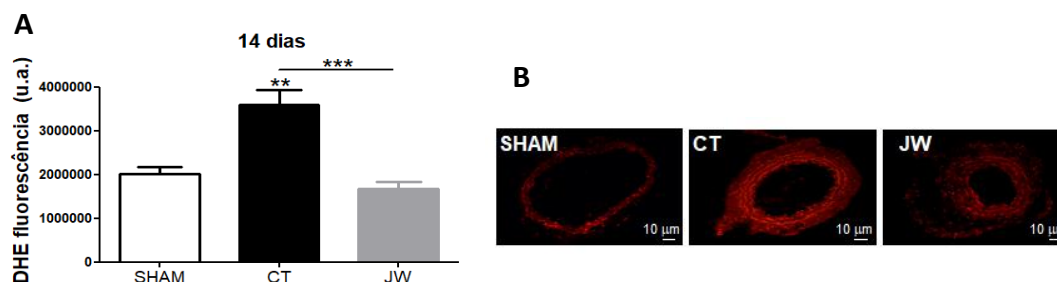


Figura 11: Detecção de radicais superóxido em cortes de carótidas após 14 dias de cirurgia. **A.** Intensidade de fluorescência do DHE, demonstrando aumento no controle e uma prevenção deste aumento pelo tratamento com JWH015. Os dados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência e como média±EPM de pelo menos 5 animais (média de 10 cortes por animal). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$. **B.** Imagens representativas de carótidas de animais sham, controle (CT; não tratados) e tratados com o agonista CB2 JWH015 (JW: 1 mg/animal).

A produção de radicais superóxido pode ser resultado de uma série de reações celulares não refletindo, especificamente, o desacoplamento da NOS. Por esta razão, resolvemos avaliar se a nNOS seria uma provável fonte dos radicais superóxido em nosso modelo. Quando submetidas à exposição com inibidor seletivo da nNOS, N-propil L-arginina (NP), observamos uma redução significativa na marcação de radicais superóxido pelas carótidas ocluídas do grupo controle, indicando que a nNOS poderia ser uma importante fonte destes radicais frente à oscilação do fluxo ocasionada pela cirurgia (Figura 12). Além disso, como a produção aumentada de radicais superóxido é resultado do desacoplamento das NOS, podemos ainda inferir que a cirurgia leva a um desacoplamento da nNOS após 14 dias de cirurgia.

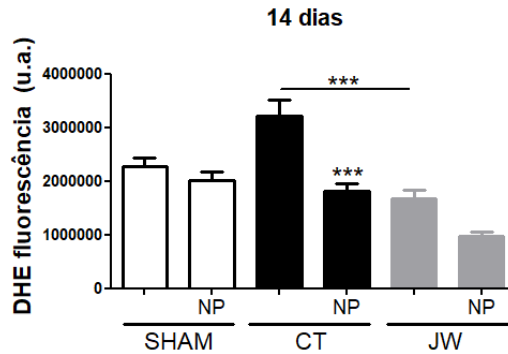


Figura 12: Detecção de radicais superóxido em cortes de carótidas após 14 dias de cirurgia, incubadas ou não com o inibidor seletivo da nNOS N-propil L-arginina (NP). **A.** Intensidade de fluorescência do DHE, demonstrando aumento no controle e prevenido no tratamento com JWH015. Os dados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência e como média±EPM de pelo menos 5 animais (média de 10 cortes por animal). *** $p < 0,001$. **B.** Imagens representativas de carótidas de animais sham, controle (CT; não tratados) e tratados com o agonista CB2 JWH015 (JW; 1 mg/animal).

5.4 Efeito do tratamento com JWH015 sobre a expressão da nNOS e do receptor CB2

A expressão da enzima nNOS foi avaliada por imunofluorescência nos cortes de carótida após 14 e 21 dias da cirurgia de oclusão (Figura 13). Não observamos aumento significativo da expressão da nNOS nas camadas íntima (Figura 13A) e média (Figura 13B) dos animais controle. Contudo, houve uma significativa diminuição na expressão da nNOS nos animais tratados com agonista CB2 por 21 dias, tanto nas camadas íntima como na média (Figura 13). Tal dado nos indica que há uma modulação da enzima pelo tratamento com agonista principalmente no maior tempo de oclusão, quando a estenose é mais pronunciada.

Diferentemente da expressão da nNOS (Figura 13), a expressão do receptor CB2 não foi alterada na camada íntima das carótidas tratadas ou não com o agonista CB2 (Figura 14A). Contudo, pudemos observar um aumento na expressão do receptor na camada média dos animais controle (14 e 21 dias) e após 14 dias de tratamento com o agonista (Figura 14B). Surpreendentemente, o tratamento com o agonista por 21 dias reduziu de forma significativa a expressão do receptor CB2 na camada média (Figura 14B).

Juntos, estes dados sugerem que o tratamento local com o agonista CB2 modula tanto a expressão do próprio receptor CB2 quanto da nNOS.

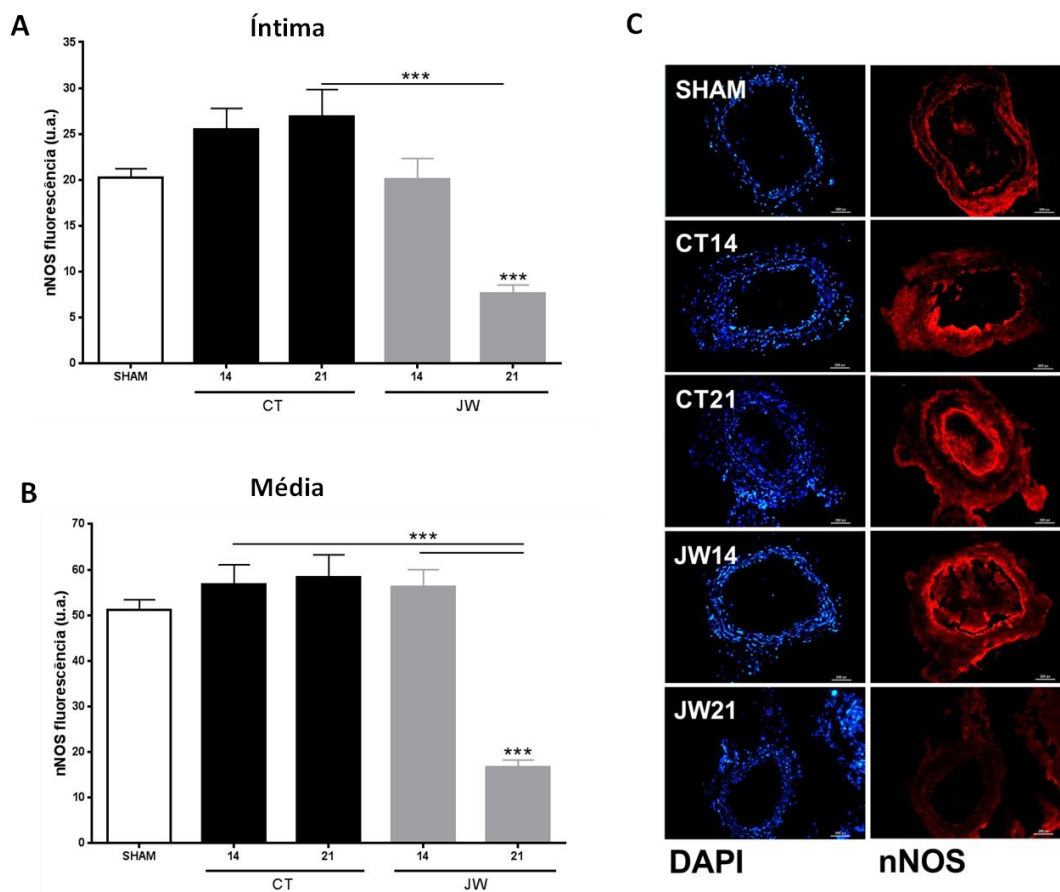


Figura 13: Expressão da nNOS em cortes de carótida de animais tratados (JW) ou não (CT) com o agonista CB2 (JWH015; JW) por 14 e 21 dias. **A.** Análise da expressão da nNOS na camada íntima. **B.** Análise da expressão da nNOS na camada média. Os dados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência e como média±EPM (n=5, sendo 8 cortes por lâmina). ***p<0,001. **C.** Imagem representativa dos cortes de carótidas. Azul: marcação dos núcleos com DAPI; vermelho: marcação da nNOS.

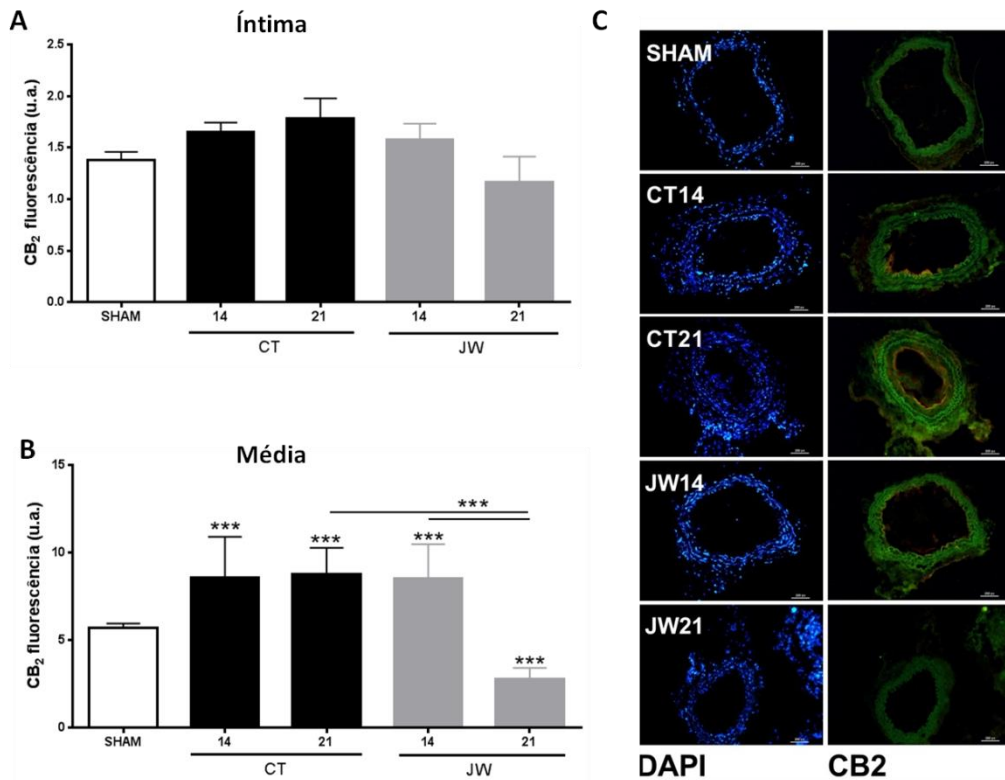


Figura 14: Expressão do receptor CB2 em cortes de carótida de animais tratados (JW) ou não (CT) com o agonista CB2 (JWH015; JW) por 14 e 21 dias. **A.** Análise da expressão do receptor CB2 na camada íntima. **B.** Análise da expressão do receptor CB2 na camada média. Os dados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência e como média±EPM (n=5, sendo 8 cortes por lâmina). ***p<0,001. **C.** Imagem representativa dos cortes de carótidas. Azul: marcação dos núcleos com DAPI; verde: marcação do receptor CB2.

Conclusões parciais:

- O modelo de oclusão total da carótida esquerda de camundongos selvagem demonstrou ser eficiente no remodelamento vascular;
- O remodelamento arterial foi prevenido pelo tratamento com agonista CB2 JWH015, por uma menor deposição de colágeno neste grupo, bem como mmp8, células musculares lisas e endoteliais;
- O aumento do estresse endotelial levou ao aumento de nitrotirosina e radicais superóxido no controle, sugerindo estresse oxidativo, que foi prevenido pelo tratamento com JWH015;

- O tratamento com agonista CB2 diminui a expressão da nNOS no tempo 21 dias, quando é maior a estenose. Já o receptor CB2 teve sua expressão aumentada na camada média do grupo controle e uma redução no tratado por 21 dias, demonstrando que o tratamento local modula tanto a enzima quanto o receptor CB2.

5.5 Modulação da expressão do receptor CB2 e da nNOS pelo JWH015 em linhagem de células endoteliais

A expressão do receptor CB2 foi avaliada em cultura de células endoteliais submetidas ou não ao tratamento com o agonista CB2 (JWH015; 1 μ M), bem como o inibidor seletivo da nNOS (TRIM; 10 μ M). Os resultados obtidos sugerem que o tanto o tratamento com agonista CB2 quanto com o inibidor da nNOS aumentou a expressão do receptor CB2, após 24h de incubação (Figura 15). Contudo, o aumento de expressão do receptor CB2 induzido pelo agonista foi atenuado pela inibição da nNOS (Figura 15), sugerindo o *crosstalk* entre as duas vias no modelo celular, tal qual ocorre *in vivo*. Para dar suporte a esta hipótese, avaliamos a expressão da nNOS em células tratadas com o agonista (Figura 16). O tratamento por 24h com o JWH015 (1 μ M) aumentou a expressão da nNOS, confirmando nossa ideia de que o receptor CB2 modula a expressão da nNOS mesmo sem o estímulo do *shear stress* oscilatório.

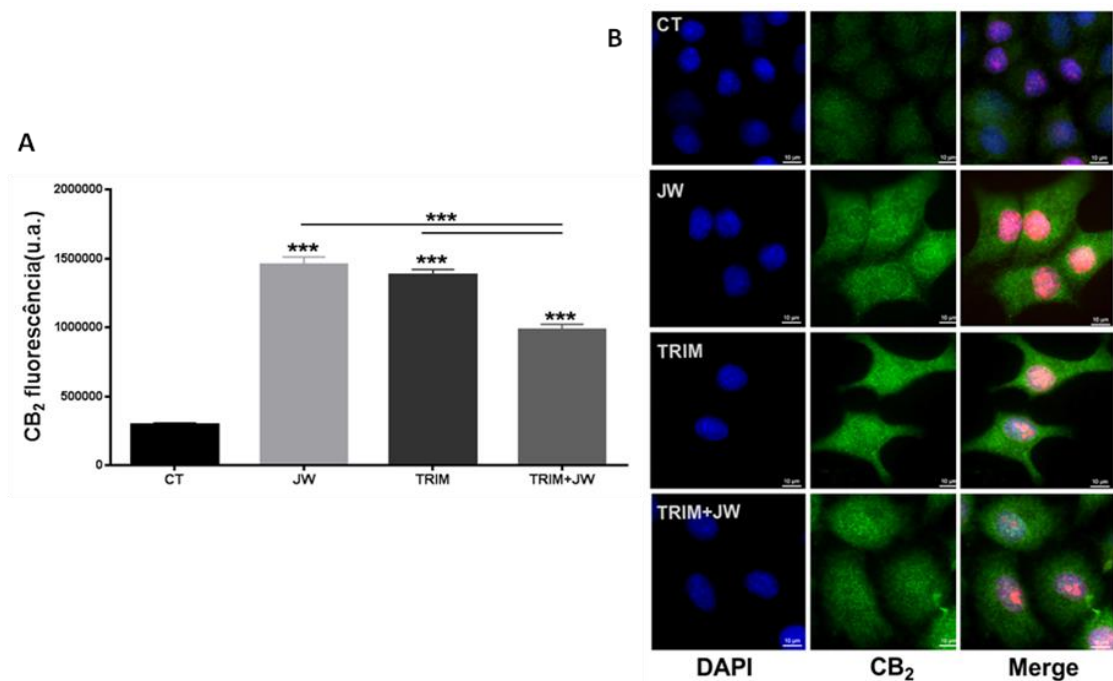


Figura 15: Expressão do receptor CB₂ nas células endoteliais EA.hy92, tratadas ou não com JWH015 (1 μ M) e/ou TRIM (10 μ M). **A.** Intensidade de fluorescência expressa em unidades arbitrárias. N= 20 células de pelo menos 5 experimentos diferentes, demonstrando aumento da expressão do receptor mediante os diferentes tratamentos frente ao controle. ***p<0,001. **B.** Imagens representativas de células na presença ou ausência dos tratamentos. Azul: marcação dos núcleos com DAPI; Verde: marcação do receptor CB₂.

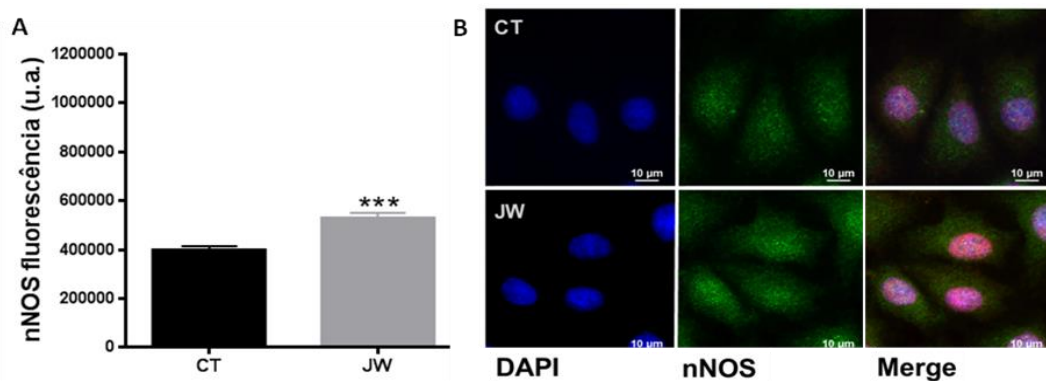


Figura 16: Expressão da nNOS em células endoteliais EA.hy926, tratadas (JW) ou não (CT) com JWH015 (1 μ M). **A.** Intensidade de fluorescência expressa em unidades arbitrárias, demonstrando aumento da expressão da enzima mediante tratamento com agonista CB₂. N= 20 células de pelo menos 5 experimentos diferentes. ***p<0,001. **B.** Imagens representativas de células na presença ou ausência dos tratamentos. Azul: marcação dos núcleos com DAPI; Verde: marcação da nNOS.

5.6 Produção de NO e radicais superóxido pelas células endoteliais expostas ou não ao *shear stress* oscilatório

Após observarmos que a ativação do receptor CB2 modulava a expressão da nNOS de forma positiva, resolvemos investigar a produção de NO pelas células endoteliais frente ao estímulo com o agonista e/ou frente a imposição de um *shear stress* oscilatório. Para este ensaio, as células foram divididas em dois grupos: um grupo repouso (REP), onde as células foram mantidas em condições estáticas habituais, e um grupo mantido sob *shear stress* oscilatório (OSS) por 1h. O primeiro dado que pudemos observar foi o aumento da produção de NO induzido pelo OSS na ausência do agonista (Figura 17). Contudo, o tratamento com o agonista CB2 preveniu o aumento na produção de NO nas células em repouso e também nas células expostas ao OSS. Estes dados nos indicam que tanto o OSS quanto o tratamento com o agonista ativam agudamente a produção de NO. Para avaliarmos o papel da nNOS neste processo, repetimos os tratamentos na presença do inibidor seletivo da nNOS, o N-propil L-arginina (NP, 1 μ M). A inibição da nNOS, de forma surpreendente, não alterou a produção de NO na situação de repouso. O OSS aumentou de forma discreta a produção de NO na presença do inibidor da nNOS. Entretanto, ao se comparar a produção de NO nas situações de OSS, a inibição da nNOS reduz a produção de NO induzida pelo OSS. Ao analisarmos o papel da nNOS sobre a produção de NO induzida pelo agonista CB2 em condições de repouso e OSS, os dados foram ainda mais intrigantes. A inibição da nNOS aumentou ainda mais a produção de NO induzida pelo JWH015 em repouso. Contudo, durante o OSS, a inibição da nNOS não altera a produção de NO induzida pelo JWH015. Estes dados nos sugerem que tanto o OSS quanto a estimulação de receptores CB2 modulam a produção de NO por modulação de ambas, eNOS e nNOS. Contudo, estes dados nos sugerem pela primeira vez que:

- 1) A nNOS poderia regular negativamente a atividade da eNOS;
- 2) Uma vez inibida a nNOS, a ativação dos receptores CB2 poderiam levar a uma produção exagerada de NO em situações de repouso e OSS, contribuindo para o estresse oxidativo/nitrosativo.

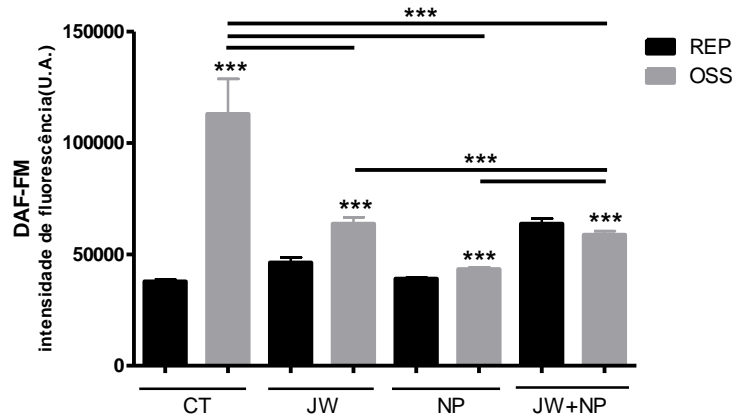


Figura 17: Medidas de NO em células endoteliais EA.hy926 por citometria de fluxo utilizando a sonda fluorescente sensível ao NO, DAF-FM. As células foram divididas em grupos em repouso (REP, demonstrado pelas barras em preto) e *shear stress* oscilatório (OSS, demonstrado pelas barras cinza), os grupos foram divididos em controle e tratamento com JWH015 e N-propil L-arginina. Resultados demonstram aumento na produção de NO decorrente do fluxo oscilatório no controle e JWH015. Grupo tratado com NP apresentou menor aumento na produção de NO, sendo este aumentado quando na ocasião do tratamento concomitante com agonista CB2. Todos os grupos em relação ao controle repouso foram $p < 0,001$. *** $p < 0,001$.

Após avaliarmos a produção de NO, resolvemos investigar se o OSS também levaria ao aumento de radicais superóxido na presença ou ausência dos tratamentos. Observamos em um primeiro momento que o OSS reduz a produção de radicais superóxido (Figura 18). O agonista CB2 não alterou a produção de radicais superóxido nas situações de repouso, mas aumentou a produção dos mesmos frente ao OSS (Figura 18). A inibição da nNOS reduziu de forma significativa a produção de radicais superóxido no repouso e de forma discreta no OSS. A inibição da nNOS não alterou o perfil de produção de radicais superóxido frente ao tratamento das células com o JWH015.

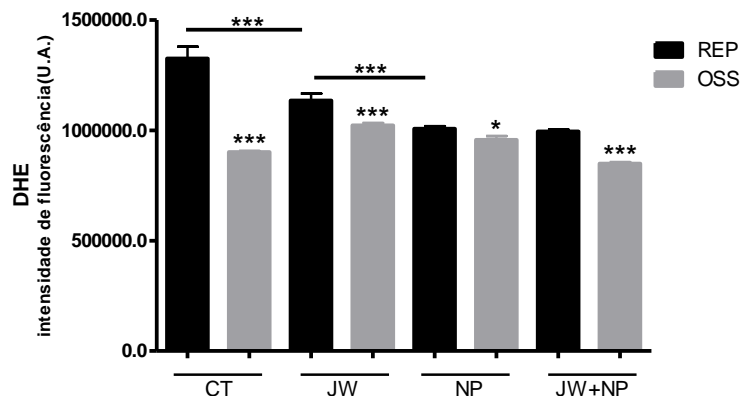


Figura 18: Medida de superóxido na célula endotelial pelo marcador DHE. A produção de superóxido foi avaliada por citometria de fluxo na célula endotelial exposta ou não a fluxo oscilatório, na presença e ausência de JWH015 e N-propil L-arginina. O fluxo oscilatório reduziu a produção de superóxido no controle e nos grupos tratados. A produção demonstrou estar ainda menor nos grupos expostos ao tratamento concomitante com NP. Grupo repouso (REP, demonstrado pelas barras em preto) e oscilatório (OSS, demonstrado pelas barras cinza). Todos os grupos em relação ao controle repouso foram $p < 0,001$. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

5.7 Expressão da eNOS e nNOS, total e fosforilada, pelas células endoteliais frente aos diferentes estímulos

Como observamos um aumento na produção de NO em razão do fluxo oscilatório, resolvemos investigar a expressão das duas isoformas constitutivas da NOS, eNOS e nNOS, bem como seus níveis de fosforilação em sítios de ativação e inibição. Após 1h de tratamento, não houve diferença na expressão total da eNOS mediante OSS ou tratamento com JWH015 (Figura 19A). Contudo, houve um aumento na expressão da nNOS frente ao tratamento com o agonista CB2 em presença de OSS (Figura 19B).

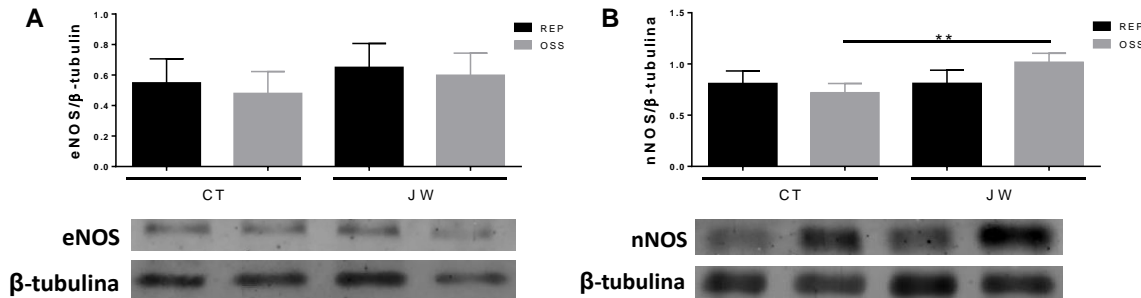


Figura 19: Expressão das isoformas constitutivas da NOS mediante OSS e tratamento com o JWH015 (JW). **A.** Expressão da eNOS. **B.** expressão da nNOS. Os dados foram expressos como média±EPM de 5 experimentos. Grupo repouso na cor preta e oscilatório em cinza. **p<0,01.

Como a expressão da enzima total não reflete necessariamente o nível de atividade da mesma, avaliamos o nível de fosforilação de sítios de ativação e inibição de ambas as isoformas, eNOS e nNOS, frente aos tratamentos utilizados. A análise de fosforilação do sítio de ativação da eNOS, ser1177 (eNOS^{ser1177}), mostrou que o OSS e o tratamento com o JWH015 aumentam de forma semelhante a fosforilação do mesmo (Figura 20). De forma surpreendente, observamos também que a inibição da nNOS com o NP também aumenta a fosforilação da eNOS^{ser1177}, indicando aumento da sua atividade. Contudo, a estimulação dos receptores CB2 na presença do inibidor da nNOS não apresentou efeito aditivo sobre a fosforilação da eNOS^{ser1177}.

Estes dados corroboram com nossos dados de dosagem de NO em repouso e na presença do inibidor da nNOS, onde sugerimos que a nNOS poderia regular negativamente a atividade da eNOS.

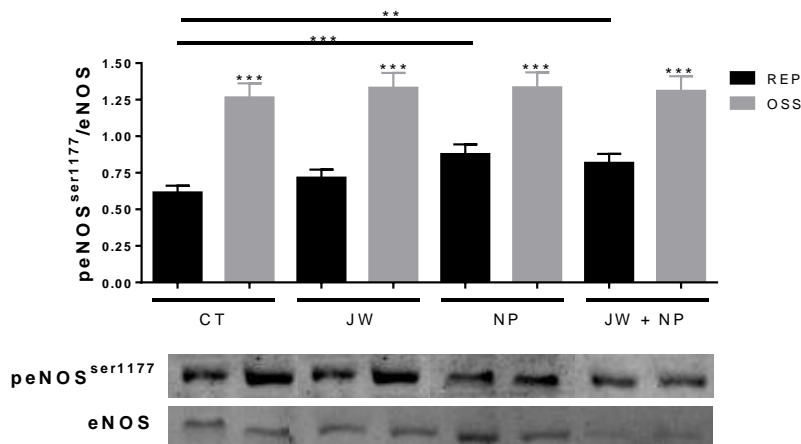


Figura 20: Análise de fosforilação do sítio de ativação resíduo serina 1177 da eNOS (eNOS^{ser1177}) por Western blot. As células foram mantidas por 1h sob os diferentes estímulos. Os dados foram normalizados pela eNOS total e expressos como média±EPM de 5 experimentos. Grupo repouso na cor preta e oscilatório em cinza. ***p<0,001, **p<0,01.

Em relação à nNOS, avaliamos o nível de fosforilação em um sítio de inativação (nNOS^{ser852}) e em um sítio de ativação (nNOS^{ser1412}). Observamos que o OSS aumentou a fosforilação do sítio de inativação nNOS^{ser852}, independentemente do tratamento farmacológico utilizado (Figura 21). Este resultado sugere que o OSS, *per se*, leva a uma redução na atividade da nNOS. Já o tratamento com o agonista CB2 reduz de forma discreta a fosforilação em nNOS^{ser852}, sugerindo aumento de atividade da mesma em repouso. A inibição da nNOS com o N-propil L-arginina (NP) não alterou os níveis de fosforilação em relação ao controle. Contudo, quando em associação com o agonista CB2, observamos uma menor fosforilação do sítio de inativação induzida pelo OSS, levando a uma maior atividade da mesma quando comparado ao controle (Figura 21).

Sobre o sítio de ativação da nNOS, serina 1412 (nNOS^{ser1412}) podemos observar que o OSS aumenta a fosforilação, e conseqüentemente a atividade, da nNOS (Figura 22). O tratamento com o agonista CB2 não altera a fosforilação deste sítio no repouso mas impede o aumento de fosforilação induzido pelo OSS, sugerindo que a ativação CB2 reduz a ativação da nNOS pelo OSS. A inibição da nNOS sozinha não alterou a fosforilação em nNOS^{ser1412}. Contudo, a inibição da nNOS simultaneamente a estimulação do receptor CB2 levou a um aumento significativo da fosforilação da nNOS^{ser1412} no repouso e uma redução significativa da fosforilação frente ao OSS (Figura 22).

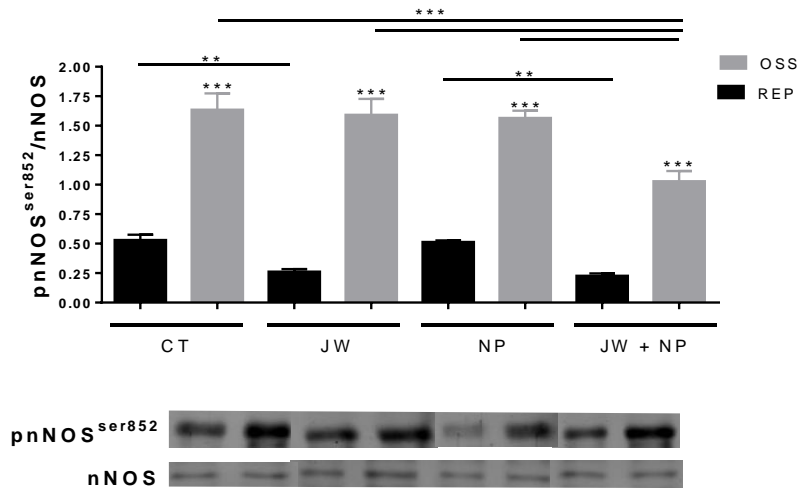


Figura 21: Análise de fosforilação do sítio de inativação resíduo serina 852 da nNOS (nNOS^{ser852}) por Western blot. As células foram mantidas por 1h sob os diferentes estímulos. Os dados foram normalizados pela nNOS total e expressos como média±EPM de 5 experimentos. Grupo repouso na cor preta e oscilatório em cinza. ***p<0,001, **p<0,01.

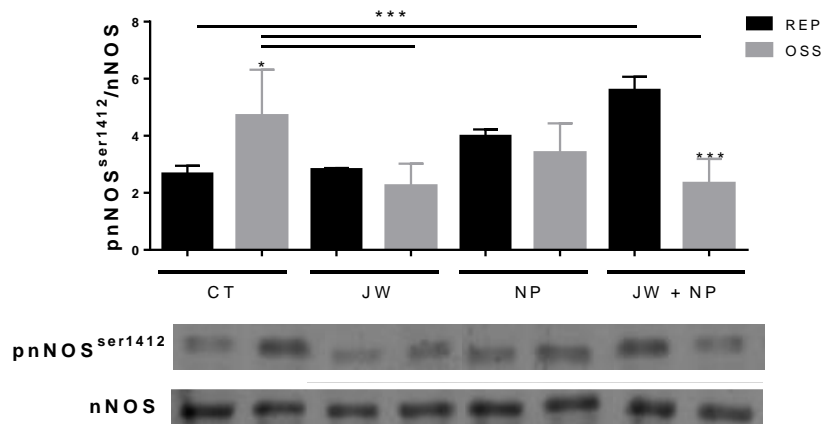


Figura 22: Análise de fosforilação do sítio de ativação resíduo serina 1412 da nNOS (nNOS^{ser1412}) por Western blot. As células foram mantidas por 1h sob os diferentes estímulos. Os dados foram normalizados pela nNOS total e expressos como média±EPM de 5 experimentos. Grupo repouso na cor preta e oscilatório em cinza. ***p<0,001, *p<0,05.

Conclusões parciais:

- Nas células endoteliais, o tratamento com JWH015 e com inibidor da nNOS aumenta a expressão do receptor CB2, o tratamento com agonista CB2 também aumenta a expressão da nNOS, demonstrando que o receptor CB2 modula a expressão desta enzima;
- Sob OSS, as células endoteliais demonstraram aumento na produção de NO, que foi prevenido com tratamento com agonista CB2;
- A produção de superóxido está diminuída sob OSS no controle, sendo que a inibição da nNOS ou tratamento com agonista CB2 reduzem a produção de superóxido em condições de repouso;
- O tratamento com JWH015 e o OSS não alterou a expressão da eNOS, mas aumentou a nNOS;
- A atividade da eNOS, por sua vez, aumenta com OSS, inibição da enzima nNOS e com agonista CB2;
- JWH015 aumenta atividade da nNOS em repouso, mas diminui ativação desta mediante OSS.

5.8 Possível mecanismo envolvido na produção de NO

Nossos dados até o momento sugerem que tanto o OSS quanto o tratamento com o JWH015 levam a uma maior produção de NO. Contudo, o tratamento com o JWH015 previne parcialmente o aumento da produção de NO induzida pelo OSS. Como nossos dados anteriores sugeriram um papel modulatório da nNOS sobre a eNOS, particularmente sob influência do OSS e da estimulação dos receptores CB2, resolvemos avaliar algumas das vias envolvidas na ativação da eNOS e nNOS. Para tal, inferimos a produção de NO pela quantificação de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ (NO_x^-) nos sobrenadantes pela técnica de Griess. Tal qual observamos pela técnica de citometria de fluxo (Figura 17), o OSS aumenta a produção de NO (Figura 23). O tratamento com o agonista previne o aumento de NO induzido pelo OSS. Além disso, a inibição da nNOS com o NP não altera a produção de NO no repouso, mas

reduz a mesma frente ao OSS. Contudo, a inibição da nNOS aumenta a produção de NO induzida pelo JWH015 no repouso, não alterando frente o estímulo OSS (Figura 23).

Mais uma vez, nossos dados sugerem, por outra técnica, que a nNOS contribui para o aumento de NO induzido pelo OSS, que o JWH015 reduz o aumento do NO frente ao OSS e que a nNOS pode regular negativamente a atividade da eNOS, uma vez que o JWH015 aumenta a produção de NO quando a nNOS esta inibida com o NP.

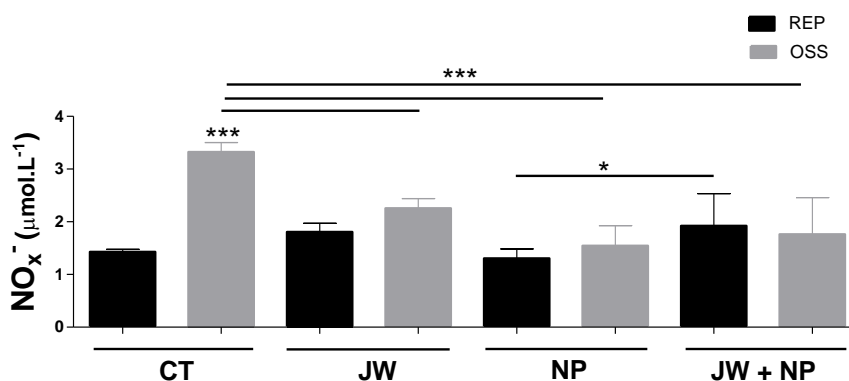


Figura 23: Produção de nitrito e nitrato (NO_x⁻) na presença e ausência de fluxo oscilatório. A produção de NO_x⁻ foi avaliada mediante a ativação dos receptores CB2 com JWH015 (JW, 1 µM) e/ou inibição da nNOS com N-propil L-arginina (NP, 1 µM). Grupo repouso na cor preta e oscilatório em cinza. ***p<0,001, **p<0,01.

Em nossos trabalhos anteriores, verificamos que a nNOS pode ser regulada pela via PKA/PP1 (Navia-Pelaez, Campos et al. 2018). Sabendo que a proteína quinase A (PKA) leva à ativação da proteína fosfatase 1 (PP1) e consequente desfosforilação do sítio de inativação da nNOS serina 852 (nNOS^{ser852}), resolvemos avaliar a via PKA/PP1 na produção de NO frente ao OSS. Os resultados sugerem que a inibição da PKA com o H89 não altera a produção de NO em repouso mas reduz a produção de NO induzida pelo OSS (Figura 24). Contudo, a inibição da PKA não altera o perfil de resposta do JWH015 tanto no repouso quanto sob OSS. Como a PKA não é essencial à ativação da eNOS, mais uma vez temos um dado sugestivo de que o JWH015 pode modular negativamente a nNOS e, assim, aumentar a atividade da eNOS.

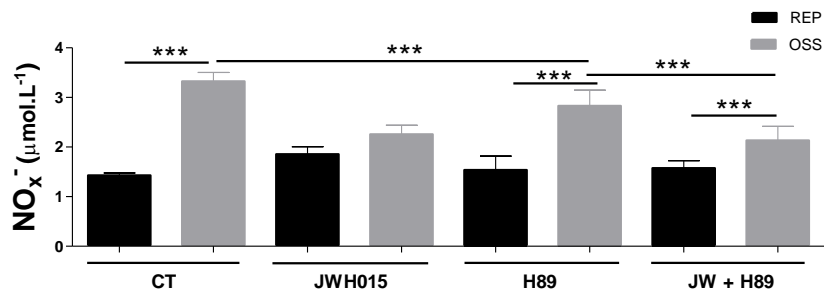


Figura 24: Produção de nitrito e nitrato (NO_x^-) na presença e ausência de fluxo oscilatório. A produção de NO_x^- foi avaliada mediante a ativação dos receptores CB2 com JWH015 (JW, 1 μM) e/ou inibição da PKA com H89 (1 μM). Grupo repouso na cor preta e oscilatório em cinza. *** $p < 0,001$.

Para dar suporte aos resultados acima, utilizamos o inibidor de fosfatases PP1 e PP2, a calcicolina A (Figura 25). Assim como na inibição da PKA com o H89, a calcicolina A não alterou a produção de NO no repouso e reduziu a sua produção no OSS. A associação do JWH015 à calcicolina aumentou de forma discreta a produção de NO no repouso mas não alterou a resposta no OSS (Figura 25).

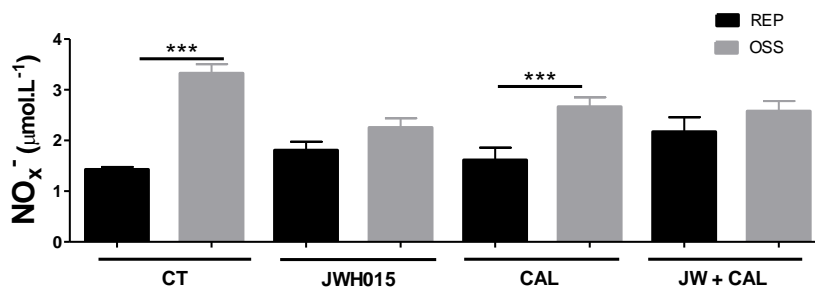


Figura 25: Produção de nitrito e nitrato (NO_x^-) na presença e ausência de fluxo oscilatório. A produção de NO_x^- foi avaliada mediante a ativação dos receptores CB2 com JWH015 (JW, 1 μM) e/ou inibição da PKA com H89 (1 μM). Grupo repouso na cor preta e oscilatório em cinza. *** $p < 0,001$.

Estes resultados sugerem que a via PKA/PP1 contribui para a produção de NO induzida pelo OSS. Mais especificamente, estes dados nos dão a ideia de que a nNOS pode ser importante para a produção de NO frente ao OSS.

Contudo, sabemos que a via PKA/PP1 pode não ser a mais importante para ativação da nNOS frente a alguns estímulos. Por esta razão, resolvemos avaliar outras quinases envolvidas na fosforilação da nNOS. A ERK1/2 fosforila de maneira importante o sítio de

inativação nNOS^{ser852}. A inibição da ERK com o PD não alterou a produção de NO no repouso ou induzida pelo OSS (Figura 26). A inibição da ERK1/2 também não alterou o padrão de resposta do JWH015 (Figura 26). Como acreditamos que o OSS leva a uma ativação da nNOS e a ERK1/2 fosforila sítios de inativação, este resultado é explicável.

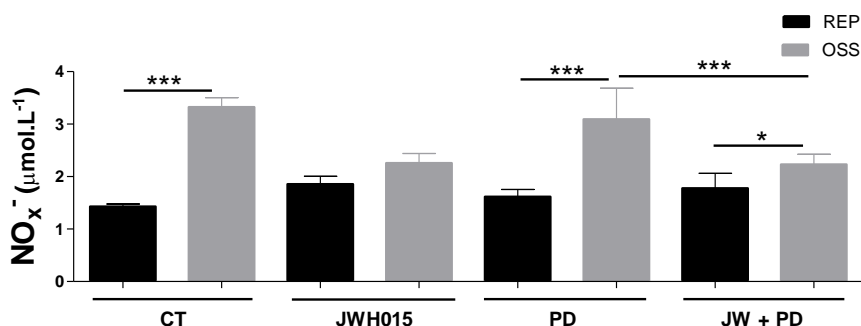


Figura 26: Produção de nitrito e nitrato (NO_x^-) na presença e ausência de fluxo oscilatório. A produção de NO_x^- foi avaliada mediante a ativação dos receptores CB2 com JWH015 (JW, 1 μM) e/ou inibição da ERK1/2 com PD (1 μM). Grupo repouso na cor preta e oscilatório em cinza. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

Outra importante via de ativação das NOS é a via PI3K/AKT. Esta via está relacionada à fosforilação dos sítios de ativação eNOS^{ser1177} e nNOS^{ser1412}. A inibição da PI3K com o LY294002 reduziu significativamente a produção de NO no repouso e no OSS, independentemente da estimulação do receptor CB2 (Figura 27). Estes dados também são explicáveis tendo em vista que a PI3K modula a produção de NO tanto pela eNOS quanto pela nNOS.

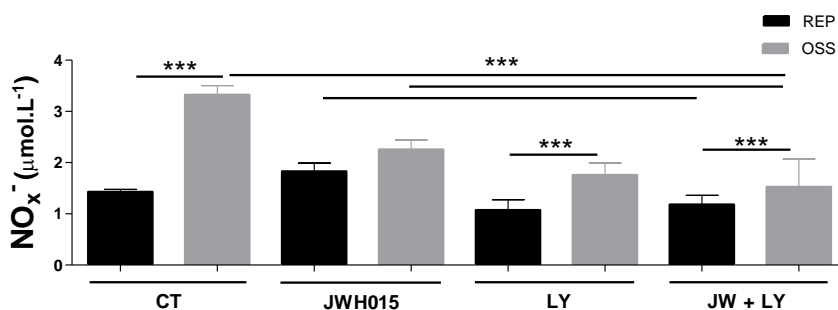


Figura 27: Produção de nitrito e nitrato (NO_x^-) na presença e ausência de fluxo oscilatório. A produção de NO_x^- foi avaliada mediante a ativação dos receptores CB2 com JWH015 (JW, 1 μM) e/ou inibição da PI3K com LY294002 (10 μM). Grupo repouso na cor preta e oscilatório em cinza. *** $p < 0,001$.

Conclusões parciais:

- OSS aumenta NO no controle, mas não na presença do agonista CB2 e inibição da nNOS, demonstrando que a nNOS contribui para o aumento de NO frente ao OSS;
- A inibição de PKA, PP1 e PP2 diminui NO no OSS, sugerindo que esta via contribui para a produção de NO induzida pelo OSS, sugerindo que a nNOS pode ser importante para produção de NO mediante OSS;
- A inibição de ERK1/2 não alterou a produção de NO, tampouco a resposta ocasionada pelo JWH;
- A inibição de PI3K diminui NO no repouso e OSS.

5.9 Proliferação endotelial por ensaio de fenda

Como na primeira parte do trabalho nós evidenciamos que o tratamento com o JWH015 modulou a proliferação/migração de células endoteliais em carótidas submetidas ao OSS, realizamos o ensaio de fenda para avaliação de migração *in vitro*. Para avaliar somente a migração celular, excluindo-se a proliferação, os experimentos foram realizados na presença de um inibidor de proliferação (hidroxiuréia, 10 μ M). O tratamento com JWH015 (1 μ M) acelerou o fechamento da fenda ao longo do tempo, indicando que, de algum modo, a via CB2 poderia contribuir para o processo de cicatrização ou reparo endotelial (Figura 28).

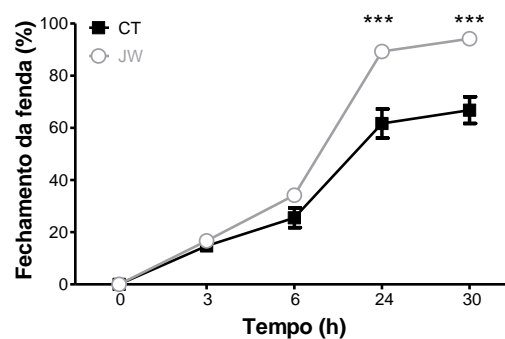


Figura 28: Avaliação do efeito do JWH015 (1 μ M) sobre o fechamento de fenda endotelial. Os resultados são representativos de 5 experimentos diferentes. ***p<0,001.

Como demonstramos nos gráficos anteriores, nós hipotetizamos que o OSS induziria um aumento na produção de NO via ativação da nNOS, a qual é regulada pelo receptor CB2. Resolvemos então avaliar o papel da nNOS no processo de reparo endotelial. A inibição da nNOS com o inibidor 1 (INB 1- *inhibitor 1*, 1 μ M) retardou a cicatrização endotelial e, conseqüentemente, o fechamento da fenda (Figura 29). Contudo, a inibição da nNOS não foi capaz de reduzir o efeito do JWH015 em acelerar o fechamento da fenda. Assim, podemos afirmar que o JWH015 aumenta a migração endotelial, a qual não é inibida pela inibição da nNOS.

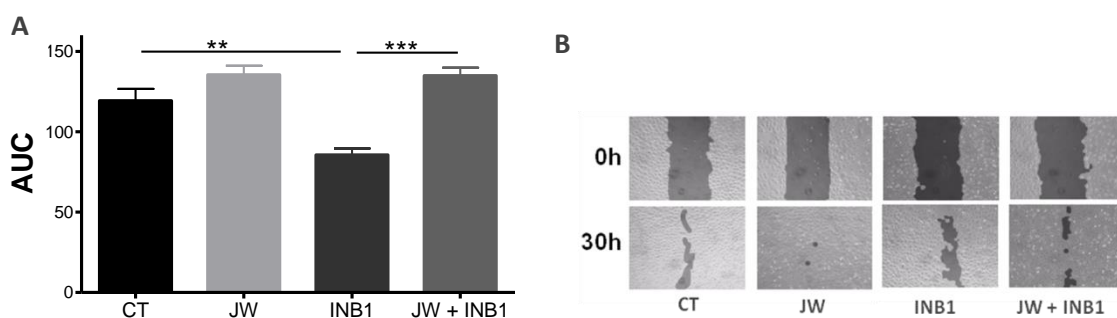


Figura 29: **A.** Ensaio de migração endotelial. Os dados foram expressos como a área sob a curva (AUC) do percentual de fechamento da fenda em células controle ou tratadas com JWH015 (1 μ M) e/ou inibidor 1 (INB1; 1 μ M). Os resultados são representativos de 5 diferentes experimentos de fechamento da fenda. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$. **B.** Imagem representativa de fotos da fenda nos tempos 0h e 30h.

A migração endotelial pode ser modulada por produtos da NOS como o NO e o H₂O₂. Como o JWH015 acelerou a migração celular para a região de fenda, resolvemos avaliar a produção de NO e H₂O₂ após 30h de tratamento (tempo no qual fizemos as análises finais do fechamento da fenda). Tal qual ocorreu após 1h de estimulação, o JWH015 aumentou a produção de NO e de H₂O₂, mesmo em condições de repouso (sem OSS) (Figuras 30A e 30B, respectivamente). A inibição da nNOS reduziu a produção de NO e H₂O₂ tanto no controle quanto as células tratadas com o agonista (Figura 30A e 30B, respectivamente). Além disso, a inibição da nNOS preveniu o aumento de NO e H₂O₂ induzidos pelo JWH015 (Figuras 30A e 30B, respectivamente). Juntos, os dados de migração e de dosagens de NO e H₂O₂ sugerem que o agonista CB2 estimula a produção de

NO e H₂O₂ pela nNOS, mas estes produtos da nNOS não são essenciais ao processo de migração endotelial induzida pelo mesmo.

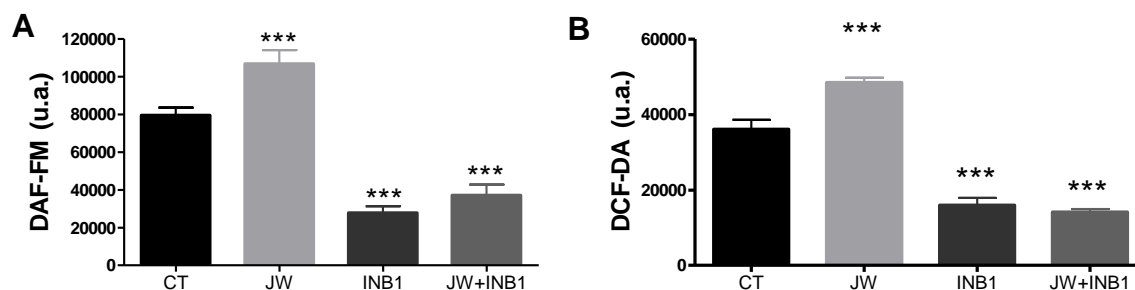


Figura 30: Participação da nNOS no aumento da produção de NO e H₂O₂ induzidos pelo JWH015. **A.** Produção de NO medida por citometria de fluxo pelo uso da sonda DAF-FM. **B.** Produção de H₂O₂ medida por citometria de fluxo pelo uso da sonda DCF-DA. As análises foram feitas 30h após as incubações com o agonista JWH015 (1μM) e/ou inibidor da nNOS (*inhibitor 1*; INB1 1μM). Os resultados expressam a média de 6 diferentes experimentos. ***p<0,001.

5.10 Ensaio de proliferação endotelial por citometria de fluxo

Apesar de os nossos dados anteriores apontarem para um papel do JWH015 sobre a migração celular, avaliamos também um marcador de proliferação celular, o ki67. A exposição das células endoteliais por 24h com o agonista CB2 reduziu a expressão de ki67, sugerindo uma menor taxa de proliferação celular (Figura 31). A inibição da nNOS, per se, não alterou a expressão de ki67. Contudo, a inibição da nNOS preveniu o efeito do JWH015 em reduzir a taxa de proliferação celular. A validação do método em detectar células em proliferação foi realizada pelo tratamento das células com soro fetal bovino (SBF, 10%).

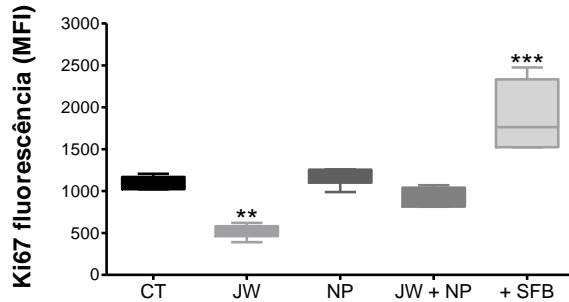


Figura 31: Efeito do agonista CB2 JWH015 (1 μ M) e da nNOS sobre a proliferação endotelial. A proliferação celular foi avaliada através da marcação de Ki67 na célula endotelial após 24h de tratamento com agonista JWH015 e/ou o inibidor da nNOS (N-propil L-arginina; NP 100nM). A última barra refere-se ao controle positivo com adição de soro fetal bovino (SFB 10%). Os resultados expressam a média de 6 diferentes experimentos. ***p<0,001, **p<0,01.

Conclusões parciais:

- Na presença de inibidor de proliferação, JWH015 acelera a cicatrização endotelial, enquanto a inibição da nNOS retarda a cicatrização, fato que não ocorre na presença do agonista CB2;
- Com 30 horas de tratamento, JWH015 aumenta NO e H₂O₂, sendo este aumento prevenido na presença do inibidor da nNOS, demonstrando que estes produtos não são essenciais ao processo de cicatrização endotelial;
- Sobre a proliferação celular, JWH015 diminui a expressão de Ki67, contudo a inibição da nNOS previne o efeito do agonista Cb2.

6. Discussão

6.1 O modelo de remodelamento vascular em camundongo: participação do receptor CB2 e da nNOS

Vários estudos têm sido dedicados a estudar as doenças cardiovasculares, especificamente destinados a estudar as mudanças relacionadas com o sistema vascular, quer sejam elas relacionadas com doença, como aterosclerose, ou com remodelamento arterial natural que ocorre ao longo do tempo ou proveniente de intervenções cirúrgicas, como as restenoses de carótida resultantes de implante de *stent*, por exemplo (Langille and O'Donnell 1986, Post, Borst et al. 1994, Pasterkamp, Borst et al. 1995, Glagov, Bassiouny et al. 1997).

Neste trabalho, ao estudarmos o sistema vascular, identificamos em nosso modelo que a ligação total da carótida em camundongos C57bl/6J leva ao processo de remodelamento desta artéria, com envolvimento principalmente das camadas média e íntima da parede arterial. Contudo, demonstramos que o tratamento local com agonista CB2, JWH015, foi capaz de prevenir o processo de espessamento da parede arterial nos animais tratados localmente com este agonista.

O sistema endocanabinóide é conhecido pelos seus efeitos no sistema nervoso central e com relação ao sistema imune, mas pouco ainda é sabido sobre sua modulação no sistema cardiovascular. Alguns trabalhos mostram o papel do sistema endocanabinóide relacionando o tratamento a ganhos no sistema cardiovascular, como melhoria na reperfusão do miocárdio, isquemia cerebral, principalmente relacionado ao receptor CB2 (Steffens and Pacher 2012, Duerr, Heinemann et al. 2014, Benyo, Ruisanchez et al. 2016, Maslov, Khaliulin et al. 2016). Especificamente sobre o remodelamento vascular, sabemos que o sistema endocanabinóide, através do receptor CB2, tem sido associado com a regulação da resposta inflamatória em algumas patologias que levam ao remodelamento vascular, como estenose ou aneurisma de aorta, por exemplo (Klein, Newton et al. 2003, Gestrich, Duerr et al. 2015). Assim, estes trabalhos nos mostram que o receptor CB2, quando ativado por agonista, é capaz de modular uma resposta endógena positiva de

correção ou prevenção ao dano vascular, corroborando nossos resultados que demonstraram pela primeira vez o papel protetor do receptor CB2 em prevenir o remodelamento vascular ocasionado em resposta à oclusão de carótida em camundongo.

Os resultados demonstram que o remodelamento vascular foi relacionado a um aumento de colágeno para formação neointima no controle, bem como aumento na expressão de MMP8. Sabemos que, no processo de estenose vascular concêntrica, resultante de aumento da parede vascular e consequente diminuição do lúmen, há um aumento de metaloproteinases de matriz (MMPs), mas há também aumento da produção de colágeno pelas células musculares lisas. O aumento na produção de colágeno ocorre em decorrência do aumento e perturbação ocasionados por alterações no fluxo sanguíneo, ou *shear stress* oscilatório, sendo este um dos mais importantes componentes da parede arterial no âmbito do remodelamento vascular (Strauss, Chisholm et al. 1994, Strauss, Robinson et al. 1996, Lafont, Durand et al. 1999, Sluijter, Smeets et al. 2004). A inibição de MMPs também está atrelada a diminuição ou prevenção do aumento da parede vascular seja por intervenção cirúrgica ou mudança no fluxo sanguíneo (Abbruzzese, Guzman et al. 1998, Siervogel, Pasterkamp et al. 2001, Siervogel, Velema et al. 2002). Sendo assim, o aumento de MMPs observado nos achados indica presença do dano ocasionado pela oclusão com consequente remodelamento. Contudo, o aumento no colágeno e também nas MMPs foi prevenido pelo tratamento com JWH015, demonstrando que, de algum modo, o agonista CB2 atuou na prevenção do dano e manutenção da integridade da artéria.

Ao verificarmos o conteúdo das células musculares lisas na neointima, observamos que há um aumento na camada íntima, principalmente com 14 dias de oclusão e que este aumento foi prevenido com tratamento com agonista CB2. O processo de formação neointima associado ou não a um processo de aterosclerose, como não é nosso caso, acomete a camada média arterial, que, ao aumentar a degradação da matriz, conforme discutido no parágrafo anterior, favorece a proliferação de células musculares lisas deste tecido, que migram de forma desordenada em direção à íntima, culminando em um remodelamento vascular concêntrico, caracterizado por espessamento da parede e diminuição do lúmen (Gibbons and Dzau 1994, Mulvany, Baumbach et al. 1996, Kumar and Lindner 1997).

Neste trabalho, entretanto, ao tratarmos da formação neointima, o achado mais interessante foi com relação ao aumento no número de células endoteliais na camada íntima ao longo do período de oclusão (foi maior no grupo ocluído por 21 dias do que no grupo ocluído por 14 dias), sendo este aumento prevenido pelo tratamento com agonista CB2. Este resultado nos mostra que, nos tempos e modelo estudados, o *shear stress* leva a uma acelerada multiplicação deste tipo celular, que foi o mais significativo para formação neointima observada. A disfunção endotelial é um importante preditor da aterosclerose e começa a partir da percepção da alteração do fluxo sanguíneo com presença de *shear stress* (Langille 1984, Langille and O'Donnell 1986, Galbusera, Zoja et al. 1997).

Assim, ao percebermos o aumento do número das células endoteliais, bem como a importância deste tipo celular na formação neointima observada, tornou-se importante investigar fatores relacionados ao estresse endotelial como nitrotirosina e radical superóxido, sendo estes produzidos pela célula endotelial em condições de dano. Também investigamos a produção de NO, como forma de avaliar a atividade das NOS. Nossos achados sugerem um aumento na marcação da nitrotirosina nas carótidas dos animais ocluídos, que foi prevenido pelo tratamento com agonista CB2 nos animais tratados com JWH015. O mesmo se deu para a produção de radicais superóxido, que demonstrou estar aumentada no controle e diminuída no grupo tratado. Já a produção de NO esteve aumentada nos dois grupos, sendo este aumento ainda mais acentuado no grupo tratado com JWH015, o que é condizente com literatura, pois a produção de NO já foi investigada mediante *shear stress* e demonstrou estar aumentada pelas células endoteliais (Kolluru, Sinha et al. 2010).

A literatura mostra que o remodelamento constritivo pode ser prevenido através da inibição do estresse oxidativo nas células endoteliais (Langille 1984, Langille and O'Donnell 1986, Langille, Bendeck et al. 1989, Nunes, Sgoutas et al. 1995). O aumento na produção de peroxinitrito e radicais superóxido podem ser advindos de NOS desacoplada mediante o dano de *shear stress*. Estudos já demonstraram que a exposição das células endoteliais ao fluxo oscilatório induz a produção de radicais superóxido (Chiu, Wung et al. 1997, Takabe, Jen et al. 2011), o que condiz com nossos achados. Como a produção de NO também demonstrou estar aumentada, é provável que o superóxido produzido esteja

reagindo com NO a fim de formar peroxinitrito, o que também explica nosso achado de aumento na marcação de nitrotirosina nos animais ocluídos, pois, condições onde NO e radicais superóxido se encontram aumentados, há um conseqüente aumento na formação de peroxinitrito (Guzik, West et al. 2002, Kar and Kavdia 2013).

Em condições de doenças, como diabetes, por exemplo, ou distúrbios no fluxo, há uma disfunção endotelial, que é resultante de desacoplamento de NOS culminando em aumento das espécies reativas de oxigênio em detrimento da produção de NO (Forstermann and Munzel 2006), além de superóxido estar reagindo com NO produzido, o que leva a uma menor disponibilidade de NO, como foi observado no controle. Já nas carótidas tratadas com agonista CB2, observou-se uma quantidade maior na produção de NO, de repente por esta espécie estar sendo menos consumida na reação com superóxido, tendo em vista que o grupo tratado com JWH demonstrou menor quantidade de superóxido produzida, o que nos leva a inferir que o tratamento, de algum modo, preveniu dano endotelial ao contribuir para manutenção das NOS, evitando desacoplamento destas espécies, pois ainda quando avaliamos a expressão da enzima nNOS, sendo entre as NOS o alvo de estudo deste trabalho, observamos que o tratamento com agonista CB2 diminuiu a expressão da nNOS, principalmente com 21 dias após a oclusão, quando a estenose é maior.

Com relação ao receptor CB2, observamos um aumento na expressão deste na camada média das carótidas dos animais ocluídos e uma redução na expressão observado no tratamento com agonista CB2 por 21 dias. Este resultado pode indicar um *downregulation* do receptor, talvez por aumento da demanda de agonista, visto que o sistema endocanabinóide conta com agonistas endógenos que são produzidos sob demanda, assim, com oferta externa de mais agonista poderia estar levando a uma diminuição ou internalização de parte destes receptores, o que já foi demonstrado em receptores CB2 de murinos estimulados com LPS (Lee, Newton et al. 2001). Já foi amplamente demonstrado que a exposição do receptor CB1 a agonistas canabinóides leva a *downregulation* do mesmo, então sugerimos que o mesmo pode estar ocorrendo para o receptor CB2 conforme observamos neste trabalho (Oviedo, Glowa et al. 1993, Breivogel, Childers et al. 1999, Breivogel, Scates et al. 2003, Sim-Selley 2003, McKinney, Cassidy et al. 2008).

6.2 O papel da célula endotelial frente ao remodelamento: envolvimento do receptor CB2 e da nNOS

Nas células endoteliais, os achados nos mostram que o tratamento com agonista CB2 aumenta a expressão da enzima nNOS, demonstrando que o receptor modula a expressão desta enzima em uma condição isolada de alteração de fluxo. Estudos já descreveram que a estimulação do receptor CB1 leva a ativação de nNOS nas células neuronais, via estímulo de GMPc. Através do estímulo com agonista, o receptor canabinoide estimula a produção de NO via ativação de proteína $G_{i/o}$ que aumenta a atividade da nNOS, e acreditamos que o mesmo possa estar ocorrendo em virtude do estímulo no receptor CB2 (Prevot, Rialas et al. 1998, Jones, Carney et al. 2008, Carney, Lloyd et al. 2009).

Sob *shear stress* oscilatório, condição em que mimetizamos as encontradas na carótida em decorrência da oclusão, as células demonstraram aumento na produção de NO, que foi ainda mais acentuado na presença do agonista CB2, mesmo em condições de repouso, o que corrobora o resultado discutido de aumento na expressão de nNOS estimulado via sistema canabinoide. (Li, Zheng et al. 2003, Sprague, Chesler et al. 2010, Sriram, Laughlin et al. 2016). Os resultados demonstraram ainda que a inibição da nNOS reduziu a produção de radicais superóxido das células em repouso, bem como quando estas foram tratadas com agonista CB2, demonstrando que, de alguma forma, o superóxido produzido é advindo da nNOs e é prevenido pelo tratamento com JWH015. Estudos já demonstraram que a exposição das células endoteliais ao fluxo oscilatório induz a produção de radicais superóxido (Chiu, Wung et al. 1997, Takabe, Jen et al. 2011), contudo, de modo surpreendente, durante fluxo oscilatório a produção de radicais superóxido demonstrou estar diminuída no controle. Tal fato pode ser discutido pelo tempo de exposição às células que foi de uma hora, o que pode ter sido curto ou ainda que este radical produzido possa ter reagido com NO para formar peroxinitrito, já que há produção aumentada de NO sob estímulo de shear stress como mostra a literatura (Kolluru, Sinha et al. 2010).

A expressão da eNOS não alterou mediante OSS e o tratamento com JWH015, demonstrando que a modulação da enzima não corresponde neste modelo ao OSS aplicado tampouco ao estímulo pelo agonista ao receptor CB2. Contudo, tanto OSS quanto

tratamento com JWH015 aumentou a expressão da nNOS, o que reforça os dados que já discutimos no início desta seção sobre o estímulo com agonista canabinóide levar a estímulo da nNOS (Prevot, Rialas et al. 1998, Jones, Carney et al. 2008, Carney, Lloyd et al. 2009).

6.3 O mecanismo envolvido na produção de NO

Devido ao *shear stress* ocasionado pelo fluxo oscilatório nas células endoteliais, foi observado aumento de NO no sobrenadante destas células no controle, o que foi prevenido pelo tratamento com agonista CB2 e inibição da nNOS, demonstrando que a nNOS pode estar contribuindo para o aumento de NO frente ao estímulo OSS. Como já foi discutido, o *shear stress* provoca aumento na produção de NO pela célula endotelial que já foi relacionado à eNOS [133]. Também já foi estudado que *shear stress* ativa nNOS endotelial levando a aumento na produção e liberação de NO, o que corrobora o resultado encontrado de diminuição na produção de NO mediante fluxo oscilatório na presença do inibidor da nNOS, N-propil L-arginina [152]. Outro achado interessante é que, em situação de repouso na presença de JWH015, há uma atenuação na resposta de inibição observada da nNOS, demonstrando que, de algum modo, o agonista CB2 é capaz de ativar a produção de NO mesmo na presença do inibidor da nNOS.

Ao pesquisarmos as vias envolvidas na ativação ou inativação da nNOS para entendermos o que pode estar acontecendo, começamos avaliando a via PKA/PP1, que já foi descrita na literatura por ativar sítio serina 852 da nNOS e assim, inativar esta enzima [114], resultando em aumento na produção de NO. Nos resultados, observamos que a inibição da PKA ou de PP1 diminui a produção de NO no OSS, ainda que não totalmente, sugerindo que a via PKA/PP1 contribui parcialmente para a produção de NO induzida pelo OSS, sugerindo mais uma vez que a nNOS pode ser importante para produção de NO frente OSS.

Outra importante quinase envolvida na fosforilação do sítio de inibição da nNOS é a ERK1/2, que também resulta em aumento na diminuição de NO ao fosforilar sítio de serina 852 da nNOS [153]. Nossos achados demonstraram que esta quinase não está envolvida no

aumento de NO proveniente da nNOS mediante fluxo oscilatório, pois a inibição dela não resultou em diminuição da produção de NO. Assim, ao investigarmos o envolvimento da via PI3K/AKT, importante via envolvida na via de sinalização que ativa sítio ser 1412 da nNOS [154, 155], observamos que a inibição desta via resultou em redução do NO produzido, o que nos possibilitou concluir que, provavelmente, o aumento de NO proveniente da nNOS poderia ser via PI3K/AKT modulando sítio serina 1412 de ativação da enzima.

6.4 A migração endotelial mediante tratamento co agonista CB2

Sobre a migração e cicatrização endotelial, os principais achados neste trabalho foram que o tratamento com agonista do receptor CB2 promoveu um tempo menor para cicatrização endotelial das células em repouso. Por outro lado, nestas mesmas condições, a inibição da enzima nNOS retardou este processo.

Sabemos que alguns processos cirúrgicos, como implante de stent ou angioplastia por balão, levam a uma lesão endotelial que, ao invés de reparo, inicia-se um novo dano que culmina na formação neoíntima com restenose. Nesse ínterim, alguns grupos têm se dedicado a estudar formas de prevenir ou reduzir a lesão endotelial de modo a evitar o início e propagação do dano [156-158]. Como já discutimos, o receptor CB2 tem sido associado com a regulação da resposta inflamatória em algumas patologias que levam ao remodelamento vascular, como estenose ou aneurisma de aorta, por exemplo (Klein, Newton et al. 2003, Gestrich, Duerr et al. 2015). Assim, alguns trabalhos nos mostram que o receptor CB2, quando ativado por agonista, é capaz de modular uma resposta endógena positiva de correção ou prevenção ao dano vascular, o que condiz com nossos achados.

Após a descoberta da nNOS e constantes evidências da importância fisiológica desta isoforma no controle da homeostase vascular, contribuindo com produção de NO e peróxido de hidrogênio [6, 12, 103,104, 159], podemos imaginar que ela também poderia estar envolvida em sinalização celular que resulte em migração de células endoteliais para reparo de dano, embora ainda não tenha sido descrito este papel. Sobre a eNOS, que foi primariamente descrita no endotélio vascular e que sobre ela temos mais estudos

relacionados a esta área, sabemos que a inibição da eNOS atenua a migração de células endoteliais mas não a proliferação [160], o que condiz com nossos achados e imaginamos que a nNOS, por ser uma isoforma que origina o mesmo produto, NO, esteja atuando da mesma forma, pois a inibição da nNOS isoladamente foi capaz de retardar o processo de fechamento da fenda, além de diminuir a produção de NO e peróxido de hidrogênio, conforme esperado.

7. Considerações finais

Neste trabalho foi demonstrado que a oclusão total em carótida de camundongo leva a um expressivo remodelamento vascular nesta artéria, com participação importante do endotélio. O receptor canabinóide do tipo 2 previne a formação neointima, em parte por manutenção da integridade do tecido vascular, e provável modulação da enzima nNOS.

O mecanismo de proteção e inibição da formação neointima através da modulação do receptor CB2 envolve diminuição na proliferação de células endoteliais, células musculares lisas na formação neointima, redução na expressão da nNOS, que no modelo de oclusão pode estar desacoplada, inibição do aumento de metaloproteinases de matriz e colágeno.

Os resultados também nos permitiram perceber um *crosstalk* entre o receptor CB2 e a enzima nNOS, pois a modulação do receptor altera a expressão da enzima em células endoteliais e que, a modulação de ambos altera a produção de NO em circunstâncias que mimetizam a alteração de fluxo, ou seja, em *shear stress* oscilatório.

Concluimos ainda que a via PI3K está envolvida no aumento de NO observado mediante o fluxo oscilatório ativando a nNOS, pois a inibição desta via resulta em diminuição na produção de NO.

O sistema endocanabinóide humano, neste trabalho e na figura do receptor CB2, demonstrou ser útil na prevenção da formação neointima frente ao dano de oclusão em camundongos, podendo servir de base para estudos na prevenção da restenose humana com utilização de tratamento que envolva agonista CB2. Contudo, ressaltamos ainda, a importância de mais estudos em modelos celulares e animais que possam reforçar essa teoria, bem como elucidar de modo mais claro o mecanismo envolvidos na formação neointima e na prevenção desta.

8. Referências bibliográficas

- Abalo, R., et al. (2011). "Cannabinoid-induced delayed gastric emptying is selectively increased upon intermittent administration in the rat: role of CB1 receptors." Neurogastroenterol Motil **23**(5): 457-467, e177.
- Abbruzzese, T. A., et al. (1998). "Matrix metalloproteinase inhibition limits arterial enlargements in a rodent arteriovenous fistula model." Surgery **124**(2): 328-334; discussion 334-325.
- Accorsi-Mendonca, D., et al. (2008). "Inhibition of spontaneous neurotransmission in the nucleus of solitary tract of the rat by the cannabinoid agonist WIN 55212-2 is not via CB1 or CB2 receptors." Brain Res **1200**: 1-9.
- Artom, N., et al. (2014). "Carotid atherosclerotic plaque stenosis: the stabilizing role of statins." Eur J Clin Invest **44**(11): 1122-1134.
- Baker, T. B., et al. (2010). "Relevance of CONSORT reporting criteria for research on eHealth interventions." Patient Educ Couns **81 Suppl**: S77-86.
- Ballantyne, C. M. (2007). "Treatment of dyslipidemia to reduce cardiovascular risk in patients with multiple risk factors." Clin Cornerstone **8 Suppl 6**: S6-13.
- Ballermann, B. J., et al. (1998). "Shear stress and the endothelium." Kidney Int Suppl **67**: S100-108.
- Benjamin, E. J., et al. (2018). "Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association." Circulation **137**(12): e67-e492.
- Benyo, Z., et al. (2016). "Endocannabinoids in cerebrovascular regulation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **310**(7): H785-801.
- Bisogno, T., et al. (2005). "The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects." Pharmacol Biochem Behav **81**(2): 224-238.
- Breivogel, C. S., et al. (1999). "Chronic delta9-tetrahydrocannabinol treatment produces a time-dependent loss of cannabinoid receptors and cannabinoid receptor-activated G proteins in rat brain." J Neurochem **73**(6): 2447-2459.
- Breivogel, C. S., et al. (2003). "The effects of delta9-tetrahydrocannabinol physical dependence on brain cannabinoid receptors." Eur J Pharmacol **459**(2-3): 139-150.
- Bult, H. (2000). "Restenosis: a challenge for pharmacology." Trends Pharmacol Sci **21**(7): 274-279.
- Byrne, R. A., et al. (2015). "Stent thrombosis and restenosis: what have we learned and where are we going? The Andreas Gruntzig Lecture ESC 2014." Eur Heart J **36**(47): 3320-3331.
- Capettini, L. S., et al. (2008). "Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(6): H2503-2511.
- Capettini, L. S., et al. (2010). "Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta." Eur J Pharmacol **643**(2-3): 260-266.

Capettini, L. S., et al. (2011). "Decreased production of neuronal NOS-derived hydrogen peroxide contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis." Br J Pharmacol **164**(6): 1738-1748.

Capettini, L. S., et al. (2012). "Update on the role of cannabinoid receptors after ischemic stroke." Mediators Inflamm **2012**: 824093.

Carbone, F., et al. (2014). "Pathophysiology and Treatments of Oxidative Injury in Ischemic Stroke: Focus on the Phagocytic NADPH Oxidase 2." Antioxid Redox Signal.

Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." Nat Med **6**(4): 389-395.

Carney, S. T., et al. (2009). "Cannabinoid regulation of nitric oxide synthase I (nNOS) in neuronal cells." J Neuroimmune Pharmacol **4**(3): 338-349.

Caro, C. G., et al. (1971). "Atheroma and arterial wall shear. Observation, correlation and proposal of a shear dependent mass transfer mechanism for atherogenesis." Proc R Soc Lond B Biol Sci **177**(1046): 109-159.

Cheng, C., et al. (2006). "Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress." Circulation **113**(23): 2744-2753.

Chiu, J. J., et al. (1997). "Reactive oxygen species are involved in shear stress-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(12): 3570-3577.

Copin, J. C., et al. (2013). "Treatment with Evasin-3 reduces atherosclerotic vulnerability for ischemic stroke, but not brain injury in mice." J Cereb Blood Flow Metab **33**(4): 490-498.

Cunha, P., et al. (2011). "Endocannabinoid system in cardiovascular disorders - new pharmacotherapeutic opportunities." J Pharm Bioallied Sci **3**(3): 350-360.

Dai, X. and J. E. Faber (2010). "Endothelial nitric oxide synthase deficiency causes collateral vessel rarefaction and impairs activation of a cell cycle gene network during arteriogenesis." Circ Res **106**(12): 1870-1881.

Dardik, A., et al. (2005). "Differential effects of orbital and laminar shear stress on endothelial cells." J Vasc Surg **41**(5): 869-880.

Davignon, J. (2004). "Cardioprotective and other emerging effects of statins." Int J Clin Pract Suppl(143): 49-57.

Di Marzo, V. (2008). "Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce?" Nat Rev Drug Discov **7**(5): 438-455.

Di Marzo, V. (2009). "The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation." Pharmacol Res **60**(2): 77-84.

Di Marzo, V. and S. Petrosino (2007). "Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease." Curr Opin Lipidol **18**(2): 129-140.

Dolan, J. M., et al. (2013). "High wall shear stress and spatial gradients in vascular pathology: a review." Ann Biomed Eng **41**(7): 1411-1427.

- Duerr, G. D., et al. (2014). "The endocannabinoid-CB2 receptor axis protects the ischemic heart at the early stage of cardiomyopathy." Basic Res Cardiol **109**(4): 425.
- Eriksson, I., et al. (2010). "Do urinary tract infections affect morale among very old women?" Health Qual Life Outcomes **8**: 73.
- Fernandez-Sanchez, M. E., et al. (2015). "Mechanotransduction's impact on animal development, evolution, and tumorigenesis." Annu Rev Cell Dev Biol **31**: 373-397.
- Fleming, I. and R. Busse (1999). "NO: the primary EDRF." J Mol Cell Cardiol **31**(1): 5-14.
- Ford, K. A., et al. (2011). "Neonicotinoid insecticides: oxidative stress in planta and metallo-oxidase inhibition." J Agric Food Chem **59**(9): 4860-4867.
- Ford, K. L., et al. (2011). "Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance." Front Plant Sci **2**: 44.
- Forde, P., et al. (2003). "Prevention of hypertension and renal dysfunction in Dahl rats by alpha-tocopherol." J Cardiovasc Pharmacol **42**(1): 82-88.
- Forstermann, U. (1986). "[Significance of endothelial cells for the regulation of the tone of smooth muscle--formation of an endothelial, relaxing factor]." Z Kardiol **75**(10): 577-583.
- Forstermann, U., et al. (1994). "Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions." Hypertension **23**(6 Pt 2): 1121-1131.
- Forstermann, U. and T. Munzel (2006). "Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace." Circulation **113**(13): 1708-1714.
- Forstermann, U. and W. C. Sessa (2012). "Nitric oxide synthases: regulation and function." Eur Heart J **33**(7): 829-837, 837a-837d.
- Furchgott, R. F., et al. (1984). "Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries." J Cardiovasc Pharmacol **6 Suppl 2**: S336-343.
- Furuno, Y., et al. (2011). "Crucial vasculoprotective role of the whole nitric oxide synthase system in vascular lesion formation in mice: Involvement of bone marrow-derived cells." Nitric Oxide **25**(3): 350-359.
- Galbusera, M., et al. (1997). "Fluid shear stress modulates von Willebrand factor release from human vascular endothelium." Blood **90**(4): 1558-1564.
- Garas, S. M., et al. (2001). "Overview of therapies for prevention of restenosis after coronary interventions." Pharmacol Ther **92**(2-3): 165-178.
- Geback, T., et al. (2009). "TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays." Biotechniques **46**(4): 265-274.
- Gerlier, D. and N. Thomasset (1986). "Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation." J Immunol Methods **94**(1-2): 57-63.
- Gestrich, C., et al. (2015). "Activation of Endocannabinoid System Is Associated with Persistent Inflammation in Human Aortic Aneurysm." Biomed Res Int **2015**: 456582.

- Gibbons, G. H. and V. J. Dzau (1994). "The emerging concept of vascular remodeling." N Engl J Med **330**(20): 1431-1438.
- Glagov, S., et al. (1997). "Mechanical determinants of plaque modeling, remodeling and disruption." Atherosclerosis **131 Suppl**: S13-14.
- Goel, S. A., et al. (2012). "Mechanisms of post-intervention arterial remodelling." Cardiovasc Res **96**(3): 363-371.
- Gomez, C. R. (2000). "Carotid angioplasty and stenting: new horizons." Curr Atheroscler Rep **2**(2): 151-159.
- Gustafson, W. C. and W. A. Weiss (2010). "Addiction to B-MYB." Oncotarget **1**(4): 235-236.
- Guyton, J. R. and C. J. Hartley (1985). "Flow restriction of one carotid artery in juvenile rats inhibits growth of arterial diameter." Am J Physiol **248**(4 Pt 2): H540-546.
- Guzik, T. J., et al. (2002). "Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels." Hypertension **39**(6): 1088-1094.
- Gyles, C. L., et al. (2010). "Economic valuation of the potential health benefits from foods enriched with plant sterols in Canada." Food Nutr Res **54**.
- Harrison, D. G., et al. (1987). "Alterations of vascular reactivity in atherosclerosis." Circ Res **61**(5 Pt 2): II74-80.
- Hazzard, W. R. (1988). "Dyslipidemia and accelerated atherosclerosis." Hosp Pract (Off Ed) **23**(5A): 41-50.
- Howlett, A. C. (2005). "Cannabinoid receptor signaling." Handb Exp Pharmacol(168): 53-79.
- Hynes, B. G., et al. (2014). "Carotid artery stenting for recurrent carotid artery restenosis after previous ipsilateral carotid artery endarterectomy or stenting: a report from the National Cardiovascular Data Registry." JACC Cardiovasc Interv **7**(2): 180-186.
- Ichimoto, E., et al. (2012). "Mechanism of edge restenosis after sirolimus-eluting stent implantation." J Invasive Cardiol **24**(2): 55-57.
- Ignarro, L. J., et al. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical." Circ Res **61**(6): 866-879.
- Jones, J. D., et al. (2008). "Cannabinoid receptor-mediated translocation of NO-sensitive guanylyl cyclase and production of cyclic GMP in neuronal cells." Neuropharmacology **54**(1): 23-30.
- Joyeux, M., et al. (2002). "Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts." Cardiovasc Res **55**(3): 619-625.
- Kamiya, A. and T. Togawa (1980). "Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery." Am J Physiol **239**(1): H14-21.

- Kar, S. and M. Kavdia (2013). "Endothelial NO and O₂(⁻) production rates differentially regulate oxidative, nitroxidative, and nitrosative stress in the microcirculation." Free Radic Biol Med **63**: 161-174.
- Klein, T. W. (2005). "Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics." Nat Rev Immunol **5**(5): 400-411.
- Klein, T. W., et al. (2003). "The cannabinoid system and immune modulation." J Leukoc Biol **74**(4): 486-496.
- Kolluru, G. K., et al. (2010). "Shear stress promotes nitric oxide production in endothelial cells by sub-cellular delocalization of eNOS: A basis for shear stress mediated angiogenesis." Nitric Oxide **22**(4): 304-315.
- Kubes, P., et al. (1991). "Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(11): 4651-4655.
- Kuchan, M. J. and J. A. Frangos (1994). "Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells." Am J Physiol **266**(3 Pt 1): C628-636.
- Kuhlencordt, P. J., et al. (2006). "Atheroprotective effects of neuronal nitric oxide synthase in apolipoprotein e knockout mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(7): 1539-1544.
- Kumar, A. and V. Lindner (1997). "Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(10): 2238-2244.
- Lafont, A., et al. (1999). "Endothelial dysfunction and collagen accumulation: two independent factors for restenosis and constrictive remodeling after experimental angioplasty." Circulation **100**(10): 1109-1115.
- Lagneux, C. and D. Lamontagne (2001). "Involvement of cannabinoids in the cardioprotection induced by lipopolysaccharide." Br J Pharmacol **132**(4): 793-796.
- Landmesser, U. and H. Drexler (2005). "The clinical significance of endothelial dysfunction." Curr Opin Cardiol **20**(6): 547-551.
- Landmesser, U., et al. (2004). "Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis?" Circulation **109**(21 Suppl 1): II27-33.
- Langille, B. L., et al. (1989). "Adaptations of carotid arteries of young and mature rabbits to reduced carotid blood flow." Am J Physiol **256**(4 Pt 2): H931-939.
- Langille, B. L. and F. O'Donnell (1986). "Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent." Science **231**(4736): 405-407.
- Langille, L. B. (1984). "Integrity of arterial endothelium following acute exposure to high shear stress." Biorheology **21**(3): 333-346.
- Lee, S. F., et al. (2001). "Downregulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) messenger RNA expression during in vitro stimulation of murine splenocytes with lipopolysaccharide." Adv Exp Med Biol **493**: 223-228.

- Lemos, J. I., et al. (2010). "Involvement of the prelimbic prefrontal cortex on cannabidiol-induced attenuation of contextual conditioned fear in rats." Behav Brain Res **207**(1): 105-111.
- Lenglet, S., et al. (2014). "Statin treatment is associated with reduction in serum levels of receptor activator of NF-kappaB ligand and neutrophil activation in patients with severe carotid stenosis." Mediators Inflamm **2014**: 720987.
- Li, Y., et al. (2003). "Effects of pulsatile shear stress on nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase expression by ovine fetoplacental artery endothelial cells." Biol Reprod **69**(3): 1053-1059.
- Lin, Y., et al. (2011). "Immunosuppressive CD14+HLA-DR(low)/- monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma." Blood **117**(3): 872-881.
- Loscalzo, J. (2013). "The identification of nitric oxide as endothelium-derived relaxing factor." Circ Res **113**(2): 100-103.
- Ludewig, B., et al. (2002). "Arterial inflammation and atherosclerosis." Trends Cardiovasc Med **12**(4): 154-159.
- Lundman, B., et al. (2010). "Sense of coherence (SOC) related to health and mortality among the very old: the Umea 85+ study." Arch Gerontol Geriatr **51**(3): 329-332.
- Malek, A. M., et al. (1999). "Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis." JAMA **282**(21): 2035-2042.
- Maslov, L. N., et al. (2016). "Prospects for Creation of Cardioprotective Drugs Based on Cannabinoid Receptor Agonists." J Cardiovasc Pharmacol Ther **21**(3): 262-272.
- McKinney, D. L., et al. (2008). "Dose-related differences in the regional pattern of cannabinoid receptor adaptation and in vivo tolerance development to delta9-tetrahydrocannabinol." J Pharmacol Exp Ther **324**(2): 664-673.
- Misko, T. P., et al. (1993). "A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples." Anal Biochem **214**(1): 11-16.
- Montecucco, F., et al. (2012). "The activation of the cannabinoid receptor type 2 reduces neutrophilic protease-mediated vulnerability in atherosclerotic plaques." Eur Heart J **33**(7): 846-856.
- Montecucco, F., et al. (2009). "CB(2) cannabinoid receptor activation is cardioprotective in a mouse model of ischemia/reperfusion." J Mol Cell Cardiol **46**(5): 612-620.
- Montecucco, F., et al. (2010). "Systemic and intraplaque mediators of inflammation are increased in patients symptomatic for ischemic stroke." Stroke **41**(7): 1394-1404.
- Montecucco, F., et al. (2012). "Statins in the treatment of acute ischemic stroke." Curr Pharm Biotechnol **13**(1): 68-76.
- Morishita, T., et al. (2002). "Vasculoprotective roles of neuronal nitric oxide synthase." FASEB J **16**(14): 1994-1996.

- Mudau, M., et al. (2012). "Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis." Cardiovasc J Afr **23**(4): 222-231.
- Mulvany, M. J., et al. (1996). "Vascular remodeling." Hypertension **28**(3): 505-506.
- Nagarkatti, M., et al. (2010). "Do cannabinoids have a therapeutic role in transplantation?" Trends Pharmacol Sci **31**(8): 345-350.
- Navia-Pelaez, J. M., et al. (2018). "Modulation of nNOS(ser852) phosphorylation and translocation by PKA/PP1 pathway in endothelial cells." Nitric Oxide **72**: 52-58.
- Nichols, J. M. (2005). "Inferences about information flow and dispersal for spatially extended population systems using time-series data." Proc Biol Sci **272**(1565): 871-876.
- Nunes, G. L., et al. (1995). "Combination of vitamins C and E alters the response to coronary balloon injury in the pig." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(1): 156-165.
- Oviedo, A., et al. (1993). "Chronic cannabinoid administration alters cannabinoid receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study." Brain Res **616**(1-2): 293-302.
- Pasterkamp, G., et al. (1995). "Remodeling of De Novo atherosclerotic lesions in femoral arteries: impact on mechanism of balloon angioplasty." J Am Coll Cardiol **26**(2): 422-428.
- Post, M. J., et al. (1994). "The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty. A study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic Yucatan micropig." Circulation **89**(6): 2816-2821.
- Prevot, V., et al. (1998). "Morphine and anandamide coupling to nitric oxide stimulates GnRH and CRF release from rat median eminence: neurovascular regulation." Brain Res **790**(1-2): 236-244.
- Rabaneda Vallecillos, R. (1990). "[Dyslipidemia, atherosclerosis and heart disease. Epidemiology and prevention]." Rev Enferm **13**(148): 68-73.
- Radomski, M. W., et al. (1987). "The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide." Br J Pharmacol **92**(3): 639-646.
- Rafieian-Kopaei, M., et al. (2014). "Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes." Int J Prev Med **5**(8): 927-946.
- Ramirez, S. H., et al. (2012). "Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates leukocyte-endothelial cell interactions and blood-brain barrier dysfunction under inflammatory conditions." J Neurosci **32**(12): 4004-4016.
- Ranjan, V., et al. (1995). "Constitutive NOS expression in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress." Am J Physiol **269**(2 Pt 2): H550-555.
- Rapoport, R. M. and F. Murad (1983). "Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP." J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res **9**(4-5): 281-296.
- Rudic, R. D. and W. C. Sessa (1999). "Nitric oxide in endothelial dysfunction and vascular remodeling: clinical correlates and experimental links." Am J Hum Genet **64**(3): 673-677.

- Scheen, A. J. and L. F. Van Gaal (2007). "[Cardiometabolic effects of rimonabant in obese/overweight subjects with dyslipidaemia or type 2 diabetes]." Rev Med Liege **62**(2): 81-85.
- Schodel, J., et al. (2009). "Expression of neuronal nitric oxide synthase splice variants in atherosclerotic plaques of apoE knockout mice." Atherosclerosis **206**(2): 383-389.
- Seamon, M. J., et al. (2007). "Medical marijuana and the developing role of the pharmacist." Am J Health Syst Pharm **64**(10): 1037-1044.
- Shah, N. B., et al. (2010). "Shuttleworthia satelles endocarditis: evidence of non-dental human disease." J Infect **60**(6): 491-493.
- Shi, X., et al. (2014). "Periadventitial application of rapamycin-loaded nanoparticles produces sustained inhibition of vascular restenosis." PLoS One **9**(2): e89227.
- Shmist, Y. A., et al. (2006). "Delta-9-tetrahydrocannabinol protects cardiac cells from hypoxia via CB2 receptor activation and nitric oxide production." Mol Cell Biochem **283**(1-2): 75-83.
- Sierevogel, M. J., et al. (2001). "Oral matrix metalloproteinase inhibition and arterial remodeling after balloon dilation: an intravascular ultrasound study in the pig." Circulation **103**(2): 302-307.
- Sierevogel, M. J., et al. (2002). "Matrix metalloproteinase inhibition reduces adventitial thickening and collagen accumulation following balloon dilation." Cardiovasc Res **55**(4): 864-869.
- Sim-Selley, L. J. (2003). "Regulation of cannabinoid CB1 receptors in the central nervous system by chronic cannabinoids." Crit Rev Neurobiol **15**(2): 91-119.
- Sluijter, J. P., et al. (2004). "Increased collagen turnover is only partly associated with collagen fiber deposition in the arterial response to injury." Cardiovasc Res **61**(1): 186-195.
- Sprague, B., et al. (2010). "Shear stress regulation of nitric oxide production in uterine and placental artery endothelial cells: experimental studies and hemodynamic models of shear stresses on endothelial cells." Int J Dev Biol **54**(2-3): 331-339.
- Sriram, K., et al. (2016). "Shear-Induced Nitric Oxide Production by Endothelial Cells." Biophys J **111**(1): 208-221.
- Steffens, S. and P. Pacher (2012). "Targeting cannabinoid receptor CB(2) in cardiovascular disorders: promises and controversies." Br J Pharmacol **167**(2): 313-323.
- Steffens, S., et al. (2005). "Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice." Nature **434**(7034): 782-786.
- Strauss, B. H., et al. (1994). "Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis." Circ Res **75**(4): 650-658.
- Strauss, B. H., et al. (1996). "In vivo collagen turnover following experimental balloon angioplasty injury and the role of matrix metalloproteinases." Circ Res **79**(3): 541-550.
- Takabe, W., et al. (2011). "Oscillatory shear stress induces mitochondrial superoxide production: implication of NADPH oxidase and c-Jun NH2-terminal kinase signaling." Antioxid Redox Signal **15**(5): 1379-1388.

- Tsutsui, M. (2004). "Neuronal nitric oxide synthase as a novel anti-atherogenic factor." J Atheroscler Thromb **11**(2): 41-48.
- Turcotte, C., et al. (2015). "Regulation of inflammation by cannabinoids, the endocannabinoids 2-arachidonoyl-glycerol and arachidonoyl-ethanolamide, and their metabolites." J Leukoc Biol **97**(6): 1049-1070.
- Turu, G. and L. Hunyady (2010). "Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor." J Mol Endocrinol **44**(2): 75-85.
- Twentyman, P. R. and M. Luscombe (1987). "A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity." Br J Cancer **56**(3): 279-285.
- Uematsu, M., et al. (1995). "Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress." Am J Physiol **269**(6 Pt 1): C1371-1378.
- van Varik, B. J., et al. (2012). "Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases." Front Genet **3**: 290.
- Weber, C. and H. Noels (2011). "Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options." Nat Med **17**(11): 1410-1422.
- Wen, K. Y., et al. (2010). "Developing and validating a model to predict the success of an IHCS implementation: the Readiness for Implementation Model." J Am Med Inform Assoc **17**(6): 707-713.
- Wittner, M., et al. (1995). "Trypanosoma cruzi induces endothelin release from endothelial cells." J Infect Dis **171**(2): 493-497.
- Younis, N., et al. (2008). "Glycation as an atherogenic modification of LDL." Curr Opin Lipidol **19**(4): 378-384.
- Yu, P. K., et al. (2005). "Endothelial F-actin cytoskeleton in the retinal vasculature of normal and diabetic rats." Curr Eye Res **30**(4): 279-290.
- Zakrzaska, A., et al. (2010). "A cannabinoid receptor, sensitive to O-1918, is involved in the delayed hypotension induced by anandamide in anaesthetized rats." Br J Pharmacol **160**(3): 574-584.
- Zarins, C. K., et al. (1983). "Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress." Circ Res **53**(4): 502-514.
- Zou, M. H., et al. (2002). "Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite." J Clin Invest **109**(6): 817-826.