

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

Danielle de Lima Ávila

**Efeitos da ingestão de Capsaicina em relação a marcadores de aterosclerose e
elucidação das vias de sinalização envolvidas: um efeito TRPV1 dependente.**

Belo Horizonte
2019

Danielle de Lima Ávila

Efeitos da ingestão de Capsaicina em relação a marcadores de aterosclerose e elucidação das vias de sinalização envolvidas: um efeito TRPV1 dependente.

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Professora Doutora Jacqueline I. Alvarez Leite

Coorientador: Professor Edenil da Costa Aguiar

Belo Horizonte
2019

043 Ávila, Danielle de Lima.

Efeitos da ingestão de capsaicina em relação a marcadores de aterosclerose e elucidação das vias de sinalização envolvidas: um efeito TRPV1 dependente [manuscrito] / Danielle de Lima Ávila. – 2019.

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

Orientadora: Professora Doutora Jacqueline I. Alvarez Leite. Coorientador: Professor Edenil da Costa Aguilar.

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

1. Aterosclerose. 2. Capsaicina. 3. Células Espumosas. 4. Inflamação. 5. PPAR gama. I. Leite, Jacqueline I. Alvarez. II. Aguilar, Edenil da Costa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE DANIELLE DE LIMA ÁVILA. Aos quatorze dias do mês de março de 2019 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Efeitos da ingestão de capsaicina em relação a parâmetros inflamatórios na aterosclerose e elucidação das vias de sinalização envolvidas: um efeito dependente de TRPV1?”, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profª. Jacqueline Isaura Alvarez Leite, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Miriam Chaves Schultz (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Ana Maria Caetano de Faria (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Maria do Carmo Gouveia Peluzio (Universidade Federal de Viçosa), aprovada; Dr. Reinaldo Barreto Oriá (Universidade Estadual do Ceará), aprovada; Dr. Edenil Costa Aguilar - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

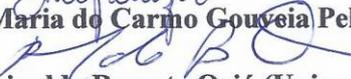
- APROVADA
 REPROVADA

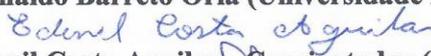
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 14 de março de 2019.


 Dra. Miriam Chaves Schultz (UFMG)


 Dra. Ana Maria Caetano de Faria (UFMG)


 Dra. Maria do Carmo Gouveia Peluzio (Universidade Federal de Viçosa)


 Dr. Reinaldo Barreto Oriá (Universidade Estadual do Ceará)


 Dr. Edenil Costa Aguilar - Coorientador (UFMG)


 Dr. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (UFMG)


 Profª Leda Quercia Vieira
 Coordenadora do Curso de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

Agradecimentos

Esse projeto é resultado de um trabalho em equipe, e não seria possível concluí-lo de outra forma. Assim, agradeço à incrível equipe da qual, orgulhosamente, fiz parte durante esses anos: labinianos, vocês me ensinaram inúmeras coisas além de protocolos a serem executados. Com vocês, entendi que uma equipe unida torna qualquer objetivo mais fácil de ser alcançado. Wesley, quero que saiba que esse trabalho não é apenas uma conquista minha, mas também sua. Muito obrigada! Agradeço em especial à minha orientadora, professora Jacqueline, pela enorme disponibilidade, por não desistir nunca, pela confiança, e por ser a luz no meio da escuridão, todas as vezes em que me perdi, ante tantas dificuldades. A Edenil, meu coorientador, agradeço pela enorme paciência, por estar sempre disponível em ouvir e dar os mais sensatos conselhos! Você é calma em meio à tempestade, Ed! Muito obrigada!

Também não poderia deixar de agradecer os demais colegas de departamento, em especial à Dani, pela solicitude e disposição em colaborar, sempre! Agradeço ainda aos colegas do LBV, especialmente o prof. Luciano Capettini: sem vocês, essa tese não seria possível.

Presto meus agradecimentos também à minha família, de maneira especial à minha mãe, principal responsável por eu ter chegado aqui hoje. Mãe, nem em mil anos de vida seria possível retribuir tudo que você fez por mim. Serei eternamente grata! A meu pai, irmão e cunhada, torcedores incansáveis, muito obrigada! Ao Saulo, por entender minha ausência, e por ser o maior incentivador disso tudo. À “amiga irmã” que a vida me deu de presente, Tico, pelas inúmeras discussões de resultados, no ônibus, a caminho da faculdade, em casa, e até pelos bares da vida. Agradeço ainda a você Tico, pelo desvelo, e por estar presente todas as vezes em que precisei: irmã, obrigada por ser meu anjo da guarda!

Por fim, agradeço ao ensino público e de qualidade, e às instituições de fomento à pesquisa, sem os quais eu não poderia ter almejado esse título.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar aquilo que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

(Arthur Schopenhauer)

Resumo

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte ao redor do mundo, sendo que o principal fator desencadeante dessas doenças é a aterosclerose. Nesse contexto, a pesquisa por produtos naturais com atividade antiaterosclerótica tem se tornado uma estratégia promissora. Entre os produtos naturais mais consumidos mundialmente encontram-se as pimentas, cujo principal princípio ativo é a Capsaicina (Caps). A esse composto já foi atribuída uma série de propriedades farmacológicas, entre as quais destacam-se suas ações anti-inflamatória, antioxidante e antilipidêmica. Apesar de amplamente estudada, e de já haver dados consistentes a respeito de seu papel ateroprotetor, as vias de sinalização envolvidas na ação de Caps não estão completamente esclarecidas, sendo os dados disponíveis acerca desse assunto bastante controversos.

Alguns trabalhos relacionam os efeitos de Caps à sinalização desencadeada pela ativação de TRPV1, outros estudos levantam a hipótese de que a ação de Caps em células espumosas independe da ativação de seu receptor, podendo ocorrer por vias alternativas, como aquelas dependentes da atividade de PPAR γ . Este trabalho primeiramente demonstrou, *in vivo*, que Caps pode atenuar a aterosclerose em animais ApoE^{-/-}, e que essa ação provavelmente decorre de sua atividade anti-inflamatória. Além disso, através de ensaios *in vitro*, pela primeira vez se investigou a ação de Caps na formação de células espumosas, marcador característico da aterosclerose. Para tanto, utilizou-se duas diferentes linhagens celulares de macrófagos, tais como a linhagem celular RAW 264.7, a qual não expressa TRPV1, e a de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM), que apresenta expressão desse receptor. Através da comparação do perfil celular nas duas diferentes linhagens, concluiu-se que, embora Caps possa atuar via PPAR γ , em células com atividade de ambos os receptores, sua ação se dá primordialmente via TRPV1.

Palavras chave: aterosclerose, capsaicina, células espumosas, inflamação, TRPV1, PPAR γ .

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death around the world, and the main triggering factor for these diseases is atherosclerosis. In this context, the search for natural products with antiatherosclerotic activity has become a promising strategy. Among the most consumed natural products worldwide are the peppers, whose main active principle is Capsaicin (Caps). A number of pharmacological properties have been attributed to this compound, among which its anti-inflammatory, antioxidant and anti-lipidic actions stand out. Although widely studied, and that consistent data regarding its atheroprotective role already exists, the signaling pathways involved in Caps' action are unclear, and the data available today are controversial. Some studies relate the effects of Caps to signaling triggered by TRPV1 activation, other studies hypothesize that the action of Caps on foam cells is independent of the activation of their receptor, and may occur by alternative routes, such as those dependent on PPAR α activity. This work first demonstrated, *in vivo*, that Caps can attenuate atherosclerosis in ApoE $-/-$ animals, and that this action is probably due to its anti-inflammatory activity. In addition, the action of Caps on the formation of foam cells, a characteristic marker of atherosclerosis, was investigated through *in vitro* assays using two different macrophage cell lines, such as the RAW 264.7 cell line, which did not express TRPV1, and that of bone marrow derived macrophages (BMDM), which shows expression of this receptor. By comparing the cell profile in the two different strains, it was concluded that, although Caps can act via PPAR α , in cells with activity of both receptors, the action of Caps is given primarily via TRPV1.

Keywords: atherosclerosis, Capsaicin, foam cells, inflammation, TRPV1, PPAR α .

Lista de Figuras

- Fig. 1: Recrutamento células inflamatórias e formação de células espumosas.
- Fig. 2: Células espumosas e metabolismo de colesterol: principais vias de influxo e efluxo celular.
- Fig. 3: Estrutura química da Capsaicina.
- Fig. 4: Estrutura e fisiologia de TRPV1.
- Fig. 5: Efeitos fisiológicos da ativação de TRPV1 por Capsaicina.
- Fig. 6: Cirurgia de oclusão de carótida.
- Fig. 7: Microscopia Intravital para marcação de leucócitos.
- Fig. 8: Ingestão calórica e ganho de peso.
- Fig. 9: Peso relativo do fígado, tecido adiposo visceral e baço.
- Fig. 10: Glicemia e perfil lipídico.
- Fig. 11: Determinação do conteúdo hepático de lipídeos.
- Fig.12: Porcentagem da área de tecido aórtico acometido por lesões ateroscleróticas.
- Fig. 13: Área de tecido acometido por lesões ateroscleróticas na artéria carótida.
- Fig. 14: Quantificação do conteúdo de monócitos e macrófagos (MOMA) na artéria carótida.
- Fig. 15: Quantificação do conteúdo de receptores CD36 na artéria carótida.
- Fig. 16: Quantificação da atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG) e mieloperoxidase (MPO) no tecido hepático dos animais.
- Fig. 17: Quantificação de citocinas no tecido hepático dos animais.
- Fig. 18: Avaliação do rolamento e adesão de leucócitos marcados com rodamina 6G na veia mesentérica de animais ApoE ^{-/-}.
- Fig. 19: Citometria de fluxo na linhagem celular RAW 264.7 para avaliação das vias de influxo de colesterol: expressão do receptor scavenger CD36.

- Fig. 20: Citometria de fluxo na linhagem celular RAW 264.7 para avaliação das vias de influxo de colesterol: expressão do receptor scavenger SR-A.
- Fig. 21: Citometria de fluxo na linhagem celular RAW 264.7 para avaliação das vias de efluxo de colesterol: expressão do receptor cassete ABCA1.
- Fig. 22: Citometria de fluxo na linhagem celular RAW 264.7 para avaliação das vias de efluxo de colesterol: expressão do receptor cassete ABCG1.
- Fig. 23: Citometria de fluxo na linhagem celular RAW 264.7 para avaliação das vias de efluxo de colesterol em culturas tratadas ou não antagonista de PPAR γ (GW9662).
- Fig. 24: Citometria de fluxo em células BMDM para avaliação das vias de influxo: expressão de CD36.
- Fig. 25: Citometria de fluxo em células BMDM para avaliação das vias de influxo: expressão de SR-A.
- Fig. 26: Citometria de fluxo na linhagem celular BMDM para avaliação das vias de influxo de colesterol em culturas tratadas ou não com antagonista de TRPV1 (CZE).
- Fig. 27: Citometria de fluxo na linhagem celular BMDM para avaliação das vias de influxo de colesterol em culturas tratadas ou não antagonista de PPAR γ (GW9662).
- Fig. 28: Citometria de fluxo em células BMDM para avaliação das vias de efluxo: expressão de ABCA1.
- Fig. 29: Citometria de fluxo em células BMDM para avaliação das vias de efluxo: expressão de ABCG1.
- Fig. 30: Citometria de fluxo na linhagem celular BMDM para avaliação das vias de efluxo de colesterol em culturas tratadas ou não antagonista de TRPV1 (CZE).
- Fig. 31: Citometria de fluxo na linhagem celular BMDM para avaliação das vias de efluxo de colesterol em culturas tratadas ou não antagonista de PPAR γ (GW9662).

Lista de Abreviações

- Apo B-100: apolipoproteína B-100
- ApoE: apolipoproteína E
- AVC: acidente vascular cerebral
- BMDM: macrófagos derivados da medula óssea
- BSA: albumina de soro bovino
- Ca²⁺: cálcio
- Caps: capsaicina
- CD36: cluster de diferenciação 36
- CL: colesterol livre
- CML: célula muscular lisa
- CMLV: células muscular lisa vascular
- CT: colesterol total
- CZE: capsazepina
- DAMPS: padrões moleculares associados a danos
- DCV: doença cardiovascular
- DMSO: dimetilsulfóxido
- EC: éster de colesterol
- ERO's: espécies reativas de oxigênio
- Glic: glicose
- GM-CSF: fator estimulador de colônia de macrófago/ granulócito
- HDL: lipoproteína de alta densidade
- HDL-c: colesterol HDL
- HDL-nc: colesterol não-HDL

- ICAM-I: molécula I de adesão intercelular
- IL-1 β : interleucina 1 beta
- IL- 3: interleucina 3
- IL-6: interleucina 6
- IL-8: interleucina 8
- IL-10: interleucina 10
- LP: lipoproteína
- LDL: lipoproteína de baixa densidade
- LDLox: lipoproteína de baixa densidade oxidada
- LDLr: receptor de LDL
- LPS: lipopolissacarídeo
- LRP1: proteína 1 relacionada ao receptor de LDL
- LXR- α : receptor X do fígado alfa
- M-CFS: fator estimulador de colônia de macrófago
- MCP-1: proteína 1 quimioatrativa de monócitos
- MOMA: monócitos/macrófagos
- MP: membrana plasmática
- MPO: mieloperoxidase
- NAG: n-acetilglicosaminidase
- NFkB: fator nuclear kappa B
- OMS: Organização Mundial da Saúde
- PAMPS: padrões moleculares associados a danos
- PPAR γ : receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
- PRGC: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

- PGE2: protaglandina E2
- RNA: ribonucleotídeo
- RNAm: RNA mensageiro
- RS: receptor scavenger
- SBF: soro bovino fetal
- SP: substância P
- SR-A: receptor scavenger do tipo A
- TG: triglicerídeos
- TNF: fator de necrose tumoral
- TMB: tetrametilbenzidina
- TRC: transporte reverso de colesterol
- TRPV1: receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1
- VCAM-I: molécula I de adesão celular vascular

Sumário

1. Introdução	15
2. Revisão Bibliográfica	21
2.1 Aterosclerose: epidemiologia e fisiopatologia	21
2.2 Aterosclerose e Inflamação	22
2.3 Macrófagos, Células Espumosas e metabolismo de colesterol na aterosclerose	24
2.4 Capsaicina e TRPV1	28
3. Justificativa	34
4. Objetivo Geral	35
5. Objetivos Específicos	36
6. Materiais e Métodos	37
<i>In Vivo</i>	37
6.1 Animais e grupos experimentais	37
6.2 Preparo das Dietas	38
6.3 Cirurgia de Oclusão de Carótida	39
6.4 Avaliação do Consumo Calórico	40
6.5 Avaliação da Evolução Ponderal e do Ganho de Peso Corporal	40
6.6 Peso Relativo dos Tecidos	40
6.7 Análises Bioquímicas	41
6.7.1 Colesterol Total (CT)	41
6.7.2 HDL Colesterol	42
6.7.3 Triglicerídeos (TG's)	42
6.7.4 Glicose	43
6.8 Determinação do conteúdo hepático de Lipídeos	44
6.9 Quantificação da Área de Lesão	45
6.9.1 Aorta – Coloração em SUDAN IV para Aortas “ <i>En Face</i> ”	45
6.9.2 Quantificação das lesões na artéria carótida obstruída	46
6.10 Marcadores de Inflamação	46
6.10.1 Imunofluorescência: CD36 e MOMA	46
6.10.2 Quantificação enzimática de NAG e MPO	47
6.10.2.1 Preparo do tecido para dosagem de atividade de NAG e MPO	47
6.10.2.2 NAG	47
6.10.2.3 MPO	48
6.10.3 Quantificação de citocinas por ELISA	48
6.11 Avaliação do rolamento e adesão de leucócitos – Microscopia Intravital	49

In Vitro	50
6.12. Isolamento da LDL plasmática.....	50
6.13 Marcação LDL-Dil e Oxidação da LDL-Dil	51
6.14 Soluções utilizadas nos ensaios de Citometria de Fluxo	52
6.14.1 Solução Estoque de Capsaicina.....	52
6.14.2 Solução estoque de Capsazepina (CZE)	52
6.14.3 Solução estoque de GW9662	52
6.15 Culturas Celulares de Macrófagos.....	53
6.16 Citometria de fluxo.....	53
6.17 Análise Estatística	55
7. Resultados Comentados	57
- Experimentos <i>in vivo</i>	57
7.1 Ingestão Calórica e Composição Corporal.....	57
7.2 Peso Relativo dos Tecidos	58
7.3 Análises Bioquímicas:	59
7.3.1 Glicemia e Perfil lipídico	59
7.4 Determinação do conteúdo lipídico do Fígado	60
7.5 Mensuração da área de tecido acometida por lesão	62
7.5.1 Aorta	62
7.5.2 Carótida	63
7.6 Mensuração de Parâmetros Inflamatórios	64
7.6.1 Quantificação de MOMA.....	65
7.6.2 Quantificação de CD36.....	66
7.6.3 Mensuração da atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG) e Mieloperoxidase (MPO)	67
7.7 Avaliação do rolamento e adesão de leucócitos	70
- Experimentos <i>in vitro</i>	71
7.8 Investigação das vias ativadas por Caps envolvidas na redução do processo inflamatório.....	71
Linhagem RAW 264.7	71
7.8.1 Receptores de influxo de colesterol: CD36 e SR-A	71
7.8.1.1 Expressão de CD36 de superfície e conteúdo intracelular de LDL.....	71
7.8.1.2 Expressão de SR-A de superfície e conteúdo intracelular de LDL	73
7.8.2 Receptores de efluxo de colesterol: ABCA1 E ABCG1	73
7.8.2.1 Expressão de ABCA1 de superfície e conteúdo de LDLox intracelular	73
7.8.2.2 Expressão de ABCG1 de superfície e conteúdo de LDLox intracelular	76

7.8.2.3 Expressão de receptores de Efluxo em culturas tratadas com antagonista de PPAR γ (GW9662).....	76
7.8.2.4 Comparação entre expressão de receptores de efluxo e teor de LDL intracelular em células sem e com antagonista de PPAR γ (GW9662).....	78
Células BMDM	81
7.8.3 Receptores de influxo de colesterol: CD36 e SR-A	81
7.8.3.1 Expressão de CD36 de superfície e conteúdo intracelular de LDL.....	81
7.8.3.2 Expressão de SR-A de superfície e conteúdo intracelular de LDL	81
Expressão de receptores de Influxo em culturas tratadas com antagonista de TRPV1 (CZE)	85
7.8.3.3. Comparação entre teor total de receptores de influxo e LDL intracelular em células com e sem a presença do antagonista de TRPV1 (CZE).....	85
Expressão de receptores de Influxo em culturas tratadas com antagonista de PPAR γ (GW9662)	89
7.8.3.4. Comparação entre teor total de receptores de influxo em células com e sem a presença do antagonista de PPAR γ (GW9662)	89
7.8.4 Conteúdo de receptores de efluxo de colesterol: ABCA1 e ABCG1	90
7.8.4.1 Expressão de ABCA1 de superfície e conteúdo intracelular de LDL.....	90
7.8.4.2 Expressão de ABCG1 de superfície e conteúdo intracelular de LDL.....	92
Expressão de receptores de Efluxo em culturas tratadas com antagonista de TRPV1 (CZE)	94
7.8.4.3 Comparação entre teor total de receptores de efluxo e LDL intracelular em células com e sem a presença do antagonista de TRPV1 (CZE).....	94
Expressão de receptores de Efluxo em culturas tratadas com antagonista de PPARγ (GW9662)	97
7.8.4.4 Comparação entre teor total de receptores de efluxo e LDL intracelular em células com e sem a presença do antagonista de PPAR γ (GW9662)	98
8. Discussão	101
9. Conclusão	119
10. Referências Bibliográficas	120

1. Introdução

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte ao redor do mundo e estima-se que pelo menos 17,5 milhões de pessoas morreram por DCV em 2012, o que faz com que essas doenças sejam consideradas um problema de saúde pública mundial (WHO 2015).

A principal causa associada ao surgimento das DCV é a aterosclerose, uma doença inflamatória crônica arterial, que leva à formação de lesões ateroscleróticas na parede dos vasos. Essas lesões podem provocar a obstrução do fluxo sanguíneo, o que pode desencadear doenças isquêmicas, tais como o infarto cardíaco ou o cerebral (Libby *et al.*, 2002; Kurakula *et al.*, 2013; Alaarg *et al.*, 2016).

A ligação entre lipídeos e aterosclerose foi percebida tendo-se por base as fortes relações clínica e experimental entre hipercolesterolemia e ateroma. Sabe-se hoje que a aterosclerose envolve o acúmulo de lipídeos, notadamente das lipoproteínas contendo apoB100, tais como a lipoproteína de baixa densidade (LDL), na parede arterial e a consequente ativação local de células endoteliais. Isso porque, uma vez no vaso, essas lipoproteínas tornam-se suscetíveis à modificação oxidativa por espécies reativas de oxigênio (ERO) ou por vias enzimáticas, mediadas por enzimas tais como mieloperoxidase ou lipoxigenases liberadas por células inflamatórias. Esse processo gera lipoproteínas modificadas oxidativamente (LDLox), as quais desencadeiam um processo inflamatório crônico que dará origem às lesões ateroscleróticas (Libby *et al.*, 2002; Kurakula *et al.*, 2013; (Weber e Noels, 2011).

As células endoteliais ativadas secretam então quimioatraentes, o que desencadeia a atração quimiotática de monócitos circulantes diretamente para o local da injúria. Primeiramente, os monócitos atraídos rolam pela superfície da parede endotelial, através da interação entre selectinas endoteliais, notadamente E e P-selectinas, com seus ligantes nos monócitos. Isso torna possível que outras moléculas também expressas durante a ativação do endotélio, tais como as moléculas de adesão, mediem a firme adesão das células recrutadas com a superfície do endotélio, possibilitando assim sua posterior migração para o espaço subendotelial, onde se dará de fato a formação da lesão aterosclerótica inicial (Mestas e Ley, 2008; Goossens *et al.*, 2010; Kamei e Carman, 2010; Aluganti Narasimhulu *et al.*, 2016).

É importante notar que esse movimento de diapedese dos monócitos é estimulado não apenas pela expressão de quimiocinas endoteliais, mas também pela de citocinas, tais como MCP-1, interleucina-8 (IL-8) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF). Uma vez na subíntima, dirigidos pelo fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) e provavelmente por outros fatores de diferenciação, como sinais de citocinas pró-inflamatórias, a maioria dos monócitos se diferenciam em macrófagos (Paulson *et al.*, 2010).

A esta altura, muitos marcadores de superfície importantes na aterosclerose, tais como receptores scavenger, começam a ser expressos nessas células. Esses receptores, representados principalmente pelas famílias SR-A e CD36, passam a captar, de forma descontrolada, as LDL modificadas oxidativamente (LDLox), formando gotículas de lipídeos em seu citoplasma. Quando a captação dessas LDLox excede o seu efluxo, ou o efluxo se encontra perturbado de alguma forma, o que é usual na aterosclerose, lipídeos se acumulam cada vez mais no interior celular e esses macrófagos dão origem às células espumosas. Essas células caracterizam a lesão aterosclerótica inicial, a estria gordurosa. Com o tempo, macrófagos vão se acumulando continuamente dentro do ateroma e secretam uma variedade de fatores de crescimento e citocinas envolvidos na progressão e complicação da lesão (Mclaren *et al.*, 2011; Legein *et al.*, 2013).

Assim, é bem estabelecido que macrófagos são componentes os quais contribuem criticamente para o início e progressão das lesões ateroscleróticas, visto que eles são considerados os principais precursores das células espumosas, reconhecidas na literatura como centrais para o desenvolvimento da placa aterosclerótica (Siegel-Axel *et al.*, 2008). Como já salientado, macrófagos derivados de monócitos aumentam a expressão de receptores scavenger (RS), tais como SR-A e CD36, os quais são os responsáveis pela maior parte da captação de LDLox nessas células. Estudos *in vitro* demonstram que SR-A e CD36 são responsáveis por cerca de 75 a 90% da LDLox internalizada por macrófagos, enquanto outros RS não conseguem compensar sua ausência (Kunjathoor *et al.*, 2002). Apesar desses scavengers usualmente possuírem como função a limpeza de patógenos invasores e células apoptóticas, eles também exibem afinidade para LDL alterada. A modificação oxidativa de LDL na íntima rapidamente os capacita a internalizá-la, sem que haja inibição desse processo por retroalimentação, o que faz com que a captação ocorra de forma descontrolada. Como resultado, a captação de LDLox mediada por RS leva

à sua contínua internalização e ao excessivo acúmulo de lipídeos derivados do metabolismo dessas lipoproteínas no citoplasma das células espumosas. Isso induz essas células a liberarem agentes pró-inflamatórios adicionais, exacerbando, assim, a inflamação pré-existente e perpetuando, dessa forma, a resposta inflamatória. Esse loop de feedback positivo promove a formação da placa e, em última instância, a sua evolução para placas com núcleos necróticos, características de lesões mais avançadas (Yuan *et al.*, 2012; Patel e Blazing, 2013; Yu *et al.*, 2013).

Após internalização, as lipoproteínas são entregues aos endossomos tardios e lisossomos, nos quais os ésteres de colesterol (EC) da LDL são hidrolisados em colesterol livre (CL) e ácidos graxos. Para prevenir a citotoxicidade associada ao CL e a consequente morte celular, associada à geração de lesões mais avançadas, o CL é reesterificado no retículo endoplasmático e, então, armazenado nas células como gotículas lipídicas citoplasmáticas. Vale destacar que o ciclo de hidrólise e esterificação dos EC são processos importantes na manutenção da homeostase do metabolismo intracelular de colesterol, os quais desempenham um papel vital na funcionalidade de macrófagos e células espumosas (Maxfield e Tabas, 2005; Borradaile *et al.*, 2006).

Assim, além da reesterificação do excesso de CL em EC para reduzir a citotoxicidade celular, já é bem estabelecido que o processo de efluxo, o qual exporta o excesso de colesterol das células espumosas para posterior remoção hepática, é outro mecanismo reconhecidamente importante para remoção de colesterol celular, sendo considerado um processo crítico em prevenir a formação de células espumosas e o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (Li e Glass, 2002).

A maior parte do efluxo ocorre num processo mediado por receptor, embora a difusão passiva também possa colaborar em menor grau. Diferentes transportadores cassete ligantes de ATP (ABC), tais como ABCA1 e ABCG1/4, são os principais contribuidores da rede de efluxo e cooperam de forma significativa para o transporte reverso de colesterol mediado pela lipoproteína de alta densidade (HDL). Os mecanismos e a exata rota do transporte de colesterol para a membrana plasmática (MP) dos EC não foram ainda completamente elucidados, embora se acredite que o transporte de vesículas do Golgi para a membrana possa estar envolvido (Chang *et al.*, 2006; Moore e Tabas, 2011).

Fato é que, uma vez na MP, o colesterol é removido das células para o lado extracelular, primariamente pelo transporte mediado por ABCA-1/ABCG1 para

apoproteína A1 e HDL, respectivamente, e pode ser então finalmente depositado no fígado, num processo conhecido como transporte reverso de colesterol (TRC). No tecido hepático, o colesterol proveniente do transporte reverso pode ser reciclado na forma de lipoproteínas secretadas ou ser submetido à excreção via bile. Dessa forma, o efluxo do excesso de colesterol das células espumosas para apo A1 e HDL é considerado um mecanismo contrarregulatório que se opõe ao acúmulo desse componente lipídico em macrófagos e, conseqüentemente, à inflamação decorrente desse processo. Assim, o efluxo dependente de ABCA1 e ABCG1 pode ser considerado crucial na prevenção do acúmulo excessivo desse componente lipídico em macrófagos da parede arterial e desempenha um papel crítico na proteção contra a progressão da aterosclerose (Pennings *et al.*, 2006; Van Eck *et al.*, 2006; Tall, 2008; Rothblat e Phillips, 2010; Tabas *et al.*, 2015).

Considerando-se, assim, o papel fundamental da formação de células espumosas e da inflamação crônica advinda de sua aglomeração na subíntima, bem como a contribuição dos processos de disfuncionalidade e morte dessas células para a iniciação e progressão da aterosclerose, faz-se necessário o desenvolvimento de terapias que permitam conter esses processos para prevenir o avanço ou até mesmo o surgimento da doença em questão. Levando-se em conta que o uso de drogas sintéticas por longos períodos, visando à prevenção dos estágios iniciais da aterosclerose é impraticável, em decorrência das limitadas indicações de prescrição e da severidade de efeitos colaterais, além do alto custo associado a esse tipo de abordagem terapêutica, o uso de produtos naturais com propriedades anti-inflamatórias e/ou antioxidantes pode se tornar uma alternativa interessante e efetiva para deter o avanço da aterosclerose (Rai *et al.*, 2013; Orekhov *et al.*, 2015).

Além disso, sabe-se que, apesar do crescente número de drogas desenvolvidas para tentar evitar e tratar as DCV, a prevalência desse tipo de doença, segundo a Organização Mundial de Saúde, tem aumentado globalmente, e é bastante provável que essa tendência continue nos próximos anos. Reconhece-se também que a natureza é considerada a principal fonte de produtos com potenciais propriedades farmacológicas e, nas décadas recentes, produtos naturais têm atraído cada vez mais a atenção de pesquisadores no contexto da prevenção ou tratamento de DCV. Atualmente, terapias focando a prevenção e principalmente a regressão da aterosclerose estão ainda em fase de desenvolvimento, e a pesquisa por produtos naturais com atividade antiaterosclerótica torna-se, assim, uma promissora

oportunidade para buscar mecanismos adicionais de prevenção e tratamento da aterosclerose, na tentativa de reduzir a morbimortalidade associada às DCV (Waltenberger *et al.*, 2016).

Entre os produtos naturais mais amplamente consumidos em todo o mundo, encontram-se as pimentas. O uso secular e tão abrangente desses compostos deve-se tanto à sua capacidade em incrementar o sabor e tempero dos alimentos, assim como às várias propriedades farmacológicas a eles atribuídos. O principal componente bioativo das pimentas é a capsaicina (Caps), que, juntamente com outros componentes correlacionados estruturalmente, pertence a uma classe de fitoquímicos de ocorrência natural denominados capsaicinóides (Luo *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2013).

Já foram descritas várias ações farmacológicas relacionadas ao uso tópico ou oral da capsaicina, tais como: capacidade analgésica, antioxidante e anti-inflamatória, além de efeitos no abaixamento de lipídeos séricos e na perda de peso. Todas essas propriedades atribuídas à capsaicina fazem dela uma promissora alternativa terapêutica para a prevenção ou até mesmo atenuação da aterosclerose (Ma *et al.*, 2011; Janssens *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2016).

Apesar de amplamente estudada, e de já haver disponível uma série de dados que confirmam o papel da capsaicina como uma substância com potencial ateroprotetor, as vias de atuação desse composto não estão totalmente esclarecidas. Ainda há uma grande discussão na literatura a respeito das vias de sinalização envolvidas nos mecanismos de ação da capsaicina na aterosclerose, e os dados disponíveis atualmente apresentam muitas controvérsias.

Vários estudos defendem que as atividades anti-inflamatórias e antioxidantes de Caps devem-se à sinalização mediada por sua ligação a seu receptor, conhecido como Receptor de Potencial Transitório Vanilóide Tipo 1 (TRPV1), o qual é expresso numa grande variedade de células, entre elas, células do sistema imune, células endoteliais e células musculares lisas, todas elas relevantes para o desenvolvimento da aterosclerose. Sabe-se que a interação de TRPV1 com Caps, seu principal ligante endógeno, leva a um aumento dos níveis intracelulares de Cálcio (Ca^{2+}). Dessa forma, TRPV-1 teria o potencial de regular a função dessas células, através da sinalização desencadeada pela modulação das concentrações de Ca^{2+} intracelular,

efeito que resultaria no desencadeamento de diferentes respostas fisiológicas (Tsuji *et al.*, 2010; Mccarty *et al.*, 2015).

Por outro lado, nas últimas décadas, alguns trabalhos têm demonstrado que a capsaicina pode atuar por mecanismos independentes da sinalização desencadeada pela ativação de TRPV1, já que os efeitos antiaterogênicos mediados por Caps continuam a ser observados em células com a inibição ou mesmo ausência desse receptor (Kim *et al.*, 2003).

Chu-Sook Kim e colaboradores demonstraram pela primeira vez em 2003 que Caps poderia atuar de maneira independente de TRPV1, sugerindo que esse composto poderia exercer sua atividade anti-inflamatória por atuar como um agonista de ocorrência natural para os Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissoma-Gama (PPAR- γ). Outros trabalhos posteriores mostraram ainda uma atuação de Caps em diferentes classes de PPAR, ou pela ativação/inativação de fatores de transcrição, como o NFkB (Kim *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2004; Mittelstadt *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015). (Mittelstadt *et al.*, 2012)

Assim, embora as propriedades da Caps na prevenção e progressão da aterosclerose já estejam sendo exploradas, o conhecimento das vias pelas quais esse fitoquímico evoca suas ações é de grande importância para encontrar novos alvos terapêuticos com potencial ateroprotetor.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Aterosclerose: epidemiologia e fisiopatologia

A aterosclerose é a causa primordial de doenças tais como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC) e angina instável. Coletivamente, essas doenças são consideradas as principais causas de morte ao redor do mundo, e sua incidência aumenta continuamente como resultado da epidemia global de obesidade e diabetes mellitus tipo 2, os quais são potentes fatores de risco para a aterogênese (WHO, 2014). Ainda de acordo com a OMS, as doenças cardiovasculares representam aproximadamente 30% das mortes pelo mundo, e estima-se que em 2030 mais de 23,3 milhões de pessoas morrerão anualmente em decorrência dessas doenças (Badimon e Vilahur, 2014).

A aterosclerose é uma patologia de lenta progressão, e sua evolução envolve uma combinação de fatores, entre os quais destacam-se: disfunção endotelial, extensiva deposição de lipídeos na íntima arterial, respostas imunes inata e adaptativa exacerbadas, proliferação de células musculares lisas (CML) e remodelamento de matriz extracelular, o que resulta, por fim, na formação de uma placa aterosclerótica (Libby, 2012). Com o tempo, uma complexa interação de respostas mal-adaptativas contribui para a progressão da doença, incluindo inflamação crônica, estresse oxidativo, distúrbios nos mecanismos celulares de efluxo de colesterol e perda da homeostase do metabolismo desse componente lipídico, entre outras. (Libby *et. al.*, 2002).

Já é consenso, portanto, que a aterosclerose é uma doença proeminentemente inflamatória, sendo que a inflamação está implicada em vários estágios dessa condição patológica, variando desde a iniciação da placa aterosclerótica, até a sua possível ruptura, processo decorrente da progressão da lesão e que culmina na ocorrência das doenças vasculares isquêmicas.

Levando em conta todos esses fatores, é razoável acreditar que substâncias apresentando propriedades anti-inflamatórias ou antioxidantes constituiriam, provavelmente, em um alvo terapêutico eficaz na prevenção ou tratamento da aterosclerose e, conseqüentemente, das comorbidades a ela relacionadas.

2.2 Aterosclerose e Inflamação

Como já mencionado, a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, a qual envolve o acúmulo de ésteres de colesterol em células espumosas, migração de células musculares lisas para a íntima e formação de núcleo necrótico. A inflamação desempenha importante papel em vários desses processos e contribui de forma significativa para a ruptura da placa, dando origem às doenças isquêmicas, principal causa de morte atualmente ao redor do mundo (WHO, 2014).

O processo inicia-se com uma disfunção endotelial, a qual permite a retenção de lipoproteínas contendo a apolipoproteína B-100 (ApoB-100) em áreas focais das artérias de médio e grande calibre, particularmente em regiões onde o fluxo laminar é perturbado devido à ocorrência de curvaturas, pontos de ramificação ou mesmo de pontos de obstrução ao fluxo. Em resposta à lesão sofrida, o endotélio passa por alterações estruturais, entre as quais encontra-se a exposição de proteoglicanos de matriz extracelular negativamente carregados, que são ligados pela ApoB-100 presente nas LDL circulantes, levando à retenção dessas partículas na íntima. Acredita-se que essa retenção, seguida pelo conseqüente acúmulo de partículas LDL na parede endotelial, seja o principal fator instigador da iniciação da aterosclerose (Williams e Tabas, 1995).

Nesse ambiente, as lipoproteínas retidas sofrem modificação oxidativa, processo que pode ocorrer diretamente pela ação de ERO's gerados pelas células inflamatórias residentes ou ainda via enzimática, através da ação de enzimas tais como mieloperoxidase (MPO) ou lipoxigenases. Essas modificações provavelmente mimetizam os padrões moleculares associados a patógeno/dano (PAMPS/DAMPS), fazendo com que as LDLox passem a atuar como agentes pró-inflamatórios, desencadeando, inicialmente, uma resposta inflamatória de baixo grau. Assim, o acúmulo de crescentes quantidades de LDLox na superfície endotelial contribui de forma significativa para a perda da homeostase tecidual, levando a alterações do fenótipo endotelial que geram um estado disfuncional. Tal disfunção se caracteriza por ser pró-inflamatória, pró-trombótica e com perda da função de barreira. Esse estado disfuncional pré-lesional aumenta a predisposição em reter lipoproteínas ricas em ApoB-100, o que exacerba ainda mais o fenótipo de disfunção endotelial e a resposta inflamatória dela advinda (Tabas *et al.*, 2007).

A ativação endotelial decorrente da aglomeração excessiva das LDLox acarreta a liberação de quimiocinas, como a proteína 1 quimioatrativa de monócitos (MCP-1), que pode ser solúvel ou estar presente na superfície endotelial ativada, bem como a expressão de moléculas de adesão, as quais atuam conjuntamente de forma a recrutar mais células inflamatórias para o local da lesão, notadamente monócitos circulantes (Libby *et. al.*, 2002, McLaren . *et. al.*, 2011, Tabas *et. al.*, 2015).

Em adição, um endotélio ateropropenso produz várias citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-1 β (IL- 1 β), fator de necrose tumoral (TNF), entre outras proteínas de matriz extracelular, fatores de crescimento e micro-RNA's, que atuam coletivamente como fatores parácrinos e autócrinos que fomentam um ambiente pró-aterogênico local (Van Diepen *et al.*, 2013; Taleb, 2016).

Ao serem recrutados, os monócitos circulantes inicialmente rolam pela superfície endotelial através da interação com moléculas adesivas expressas pelo endotélio ativado, como E e P-selectina, principalmente. Essas moléculas medeiam uma adesão fraca pela interação transitória entre si e seus ligantes na superfície dos monócitos. Isso permite um íntimo contato dessas células com o endotélio e torna possível a interação, durante o rolamento, com outras moléculas expressas pelo endotélio ativado, tais como a Molécula I de Adesão Intercelular (ICAM-I) e Molécula I de Adesão Celular Vascular (VCAM-I), com os seus ligantes, as integrinas expressas na superfície leucocitária. Essas interações possibilitam enfim uma firme adesão dessas células, permitindo sua parada, a fim de facilitar sua subsequente migração para a íntima (Libby *et.al.*, 2002; Libby, 2012; Legein *et.al.*, 2013).

Aderidos, monócitos penetram no espaço subendotelial e, uma vez na íntima, dirigidos pelo fator estimulador de colônia de macrófagos e provavelmente por outros fatores de diferenciação, diferenciam-se em macrófagos expressando receptores scavenger (RS), os quais podem ligar LDLox com diferentes afinidades, o que provoca a sua ingestão por essas células inflamatórias. Recentes estudos mostram que a captação ocorre notadamente via receptores SR do tipo A (SR-A) e ainda por um membro da família B (CD36), mas sugerem que pode haver ainda outras vias envolvidas, como a pinocitose e fagocitose de LDL. A LDLox captada é armazenada na forma de gotículas lipídicas no citosol, criando uma aparência espumosa, o que levou esses macrófagos a serem chamados de células espumosas (Moore e Tabas, 2011).

Desse modo, é amplamente reconhecido que macrófagos derivados de monócitos são os principais impulsionadores do processo aterosclerótico. De fato, há uma significativa correlação entre a contagem de monócitos no sangue e doença vascular aterosclerótica em humanos (Tabas *et.al.*, 2015). Também em camundongos, já foi demonstrada uma correlação positiva entre o número de monócitos circulantes e o tamanho da placa aterosclerótica (Combadière *et al.*, 2008).

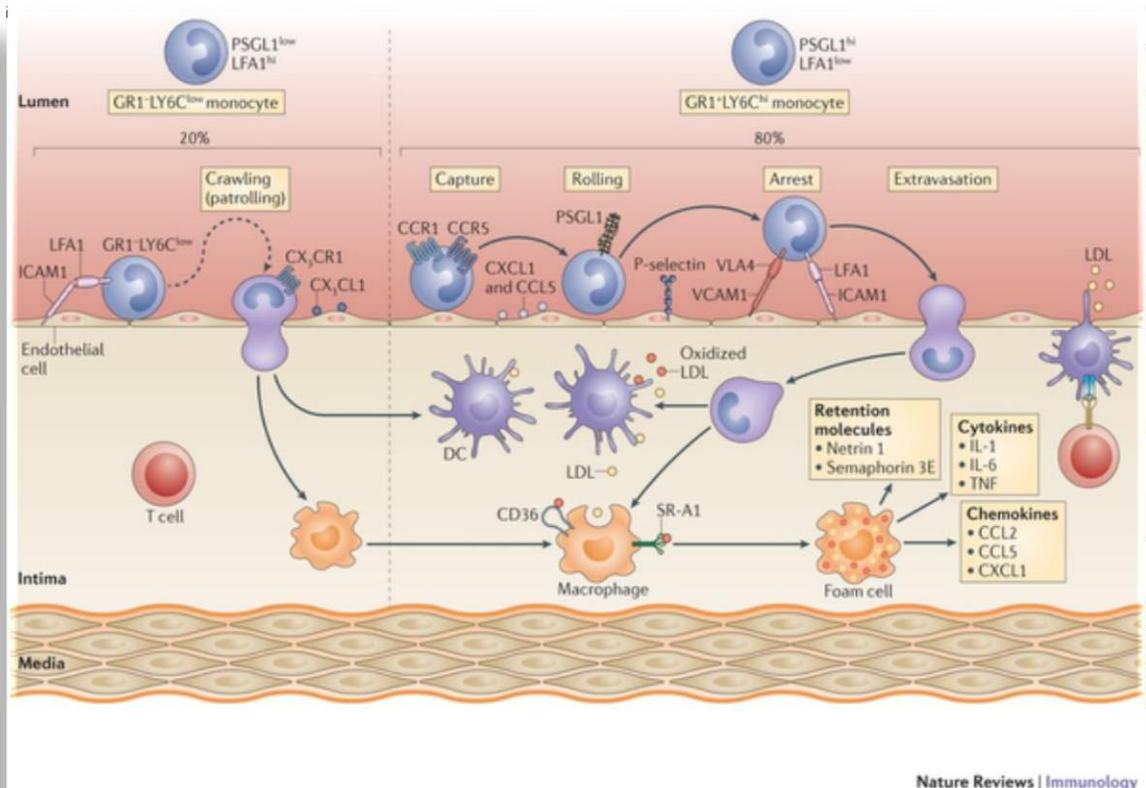


Figura 1: Recrutamento de células inflamatórias e formação do células espumosas. (Moore, 2013).

2.3 Macrófagos, Células Espumosas e metabolismo de colesterol na aterosclerose

No espaço subendotelial, macrófagos internalizam as lipoproteínas (LP) retidas, tanto as nativas como as modificadas por oxidação, agregação e outros processos. Estudos *in vitro* sugerem que LP podem ser internalizadas por uma

combinação da fagocitose de agregados de LP, captação de LP modificadas mediada por RS e pinocitose de LDL nativa (Haka *et al.*, 2009). Embora macrófagos possam captar LDL sob diferentes condições, atualmente acredita-se que a captação de LDL modificada é o modo predominante pelo qual essas células acumulam lipídeos em seu citoplasma (Narasimhulu C.A. *et al.*, 2016).

É importante destacar que, ao contrário do que é observado para receptor de LDL (LDLr), a expressão dos RS não sofre regulação negativa em consequência dos aumentados níveis de colesterol intracelular. Por conseguinte, a captação de LDLox mediada por RS leva a uma internalização contínua de lipoproteínas e ao acúmulo de quantidades excessivas dos lipídeos delas derivados pelos macrófagos (Rios *et al.*, 2011).

Um importante receptor implicado no acúmulo de LDLox celular é o receptor scavenger A (SR-A), o qual é altamente expresso em células espumosas derivadas de macrófagos (Naito *et al.*, 1992; Hiltunen *et al.*, 1998). Estudos prévios demonstraram que a captação de LDLox por macrófagos deficientes em SR-A foi em torno de 70% daquela observada em macrófagos selvagens. Já a deficiência total de SR-A resultou em redução 50% e 20% no tamanho da lesão aterosclerótica em animais nocautes para apoproteína E (ApoE) e nocautes para o receptor de LDL (LDLr), respectivamente (Lougheed *et al.*, 1997; Sakaguchi *et al.*, 1998; Van Berkel *et al.*, 1998).

O envolvimento do scavenger SR-A com a progressão da aterosclerose também já foi evidenciado por Babaev e colaboradores. Esses estudiosos geraram camundongos C57BL-6 e LDLr^{-/-} que possuíam macrófagos seletivamente deficientes em SR-A. Em ambos os modelos, a ausência de SR-A resultou em uma redução da área de lesão em torno de 60%, o que indica um importante papel pró-aterogênico da expressão de SR-A por macrófagos (Babaev *et al.*, 2000). Contudo, a superexpressão de SR-A por macrófagos derivados de camundongos C57BL-6 e LDLr^{-/-} não afetou significativamente o desenvolvimento da lesão aterosclerótica (Herijgers *et al.*, 2000; Van Eck *et al.*, 2000).

Além do receptor SR-A, CD36, um representante da família de scavengers da classe B, também demonstra ser capaz de ligar e internalizar partículas de LDL, mesmo aquelas minimamente modificadas (Pennings *et al.*, 2006). Febbraio e colaboradores mostraram que macrófagos peritoneais de camundongos deficientes em CD36 exibiram uma redução de 60 a 80% na capacidade de ligar LDLox (Febbraio

et al., 2000). Evidências adicionais a respeito do envolvimento de CD36 na progressão da aterosclerose foram demonstradas pelo grupo de Pobrez e colaboradores, os quais observaram que animais duplo nocautes para a apoproteína E e CD36 mostraram redução da área de lesão aterosclerótica, bem como significativa diminuição na captação de LDLox por macrófagos, quando comparados aos seus controles (Pobrez *et al.*, 2000). Além disso, outro grupo de pesquisa demonstrou que camundongos ApoE^{-/-} reconstituídos com células da medula óssea deficientes em CD36 exibiram uma redução de 88% na área de lesão após receberem 12 semanas de dieta ocidental, o que estabelece um papel essencial do receptor scavenger CD36 de macrófagos na formação da lesão aterosclerótica (Zhao *et al.*, 2005).

Como macrófagos são incapazes de limitar a taxa de captação de LDLox pelos mecanismos acima descritos, essas células são largamente dependentes das vias de efluxo de colesterol para manter a homeostase lipídica celular. Dessa forma, em resposta à sobrecarga de lipídeos internalizada, macrófagos ativam as vias de efluxo compensatórias. Os dois principais receptores envolvidos no efluxo de colesterol são os transportadores cassete ligantes de ATP ABCA1 e ABCG1. ABCA1 promove o efluxo de colesterol para a apoproteína A1, enquanto ABCG1 facilita a transferência de colesterol celular para partículas HDL, iniciando, dessa maneira, o transporte reverso de colesterol, que culminará com a remoção hepática desse produto por excreção biliar (Yuan *et al.*, 2012; Tall e Yvan-Charvet, 2015).

O envolvimento de ABCA1 é claramente demonstrado em pacientes com Doença de Tangier, os quais exibem mutações no gene *abca1* e, em decorrência disso, apresentam excessivo acúmulo de colesterol por macrófagos (Konstantinov *et al.*, 2006). Ademais, em camundongos duplo nocautes LDLr^{-/-}/ApoE^{-/-} que receberam células progenitoras da medula óssea deficientes em ABCA1 observou-se um aumento significativo das lesões ateroscleróticas em relação aos animais que receberam células progenitoras selvagens, sem que houvesse alterações nos níveis de colesterol (Aiello *et al.*, 2002; Van Eck *et al.*, 2002).

Em adição a ABCA1, macrófagos também expressam ABCG1, o qual é induzido durante a captação de LDLox por essas células (Klucken *et al.*, 2000). A deficiência ou ausência da expressão de ABCG1 em macrófagos tem sido relacionada a modestos aumentos na formação de lesões ateroscleróticas (Out *et al.*, 2006). Macrófagos isolados de camundongos ABCG1^{-/-} exibiram uma redução na capacidade de efluxo de colesterol após tratamento com ativadores de LXR, uma via

reconhecidamente envolvida na regulação do efluxo (Kennedy *et al.*, 2005; Baldan *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Soma-se a isso o fato de que camundongos LDLr^{-/-} reconstituídos com células derivadas da medula óssea deficientes em ABCG1, após 6 e 12 semanas de dieta hiperlipídica, apresentaram um moderado aumento, por volta de 33 a 36%, na formação da lesão (Van Eck *et al.*, 2002). Yvan-Charvet e colegas também demonstraram que a deficiência combinada de ABCA1 e ABCG1 promove o acúmulo de células espumosas e acelera a aterosclerose em camundongos. Mais recentemente, Cheng e colegas demonstraram que o ácido lipoico, um conhecido antioxidante, pode suprimir o acúmulo de colesterol por macrófagos e reduzir a formação de células espumosas devido a sua capacidade em aumentar a expressão de ABCA1 e ABCG1 em linhagens celulares de macrófagos murinos e humanos (Yvan-Charvet *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2011).

Todos esses dados levam a crer que, sob condições aterogênicas, observam-se tanto a captação descontrolada de LDLox por RS, bem como prejuízos na capacidade de efluxo de colesterol. Juntos, esses fatores proporcionam um aumento na formação de células espumosas, as quais se acumulam na parede do vaso, dando origem à lesão aterosclerótica inicial, chamada de estria gordurosa (Yuan *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013).

Ao mesmo tempo, ocorrem distúrbios no metabolismo celular de colesterol, o que, associado aos processos acima descritos, também contribui para o aumento dos níveis intracelulares de colesterol livre (CL), o qual demonstra ser um produto altamente citotóxico. Os altos níveis de CL intracelular levam à formação de cristais de colesterol, que podem ser facilmente observados nos núcleos necróticos de lesões avançadas. Esses cristais podem promover a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e IL-8, exacerbando o ambiente já inflamatório e levando à progressão da lesão para estágios mais avançados (Dewell *et al.*, 2010; Moore e Tabas, 2011).

Em conjunto, tais dados suportam assim a ideia de que a redução da expressão ou atividade dos RS's de influxo, bem como o aumento daqueles de efluxo, conjunta ou isoladamente, são processos ateroprotetores. Isso pode ser explicado pelo fato de que o crescente acúmulo de colesterol intracelular leva à formação de cristais citotóxicos desse metabólito, o que estimula a produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios por macrófagos, tais como citocinas (TNF, IL-1 β , entre outras) e espécies reativas de oxigênio (ERO). Tais mediadores atuam de forma a recrutar mais células inflamatórias para o local da injúria e contribuem, dessa forma, para a

cronicidade da resposta inflamatória e, conseqüentemente, para a progressão da lesão para formas mais complexas, aumentando, assim, a morbidade dessa condição patológica (Shibata e Glass, 2009).

Logo, pode-se concluir que processos os quais interfiram na homeostase do metabolismo de colesterol intensificam a formação de lesões ateroscleróticas. É possível inferir-se ainda que produtos naturais ou sintéticos que demonstrem ser capazes de atenuar a sobrecarga de metabólitos lipídicos em células espumosas podem exercer atividade ateroprotetora, contribuindo tanto para a prevenção como para o retardo da evolução da doença já estabelecida.

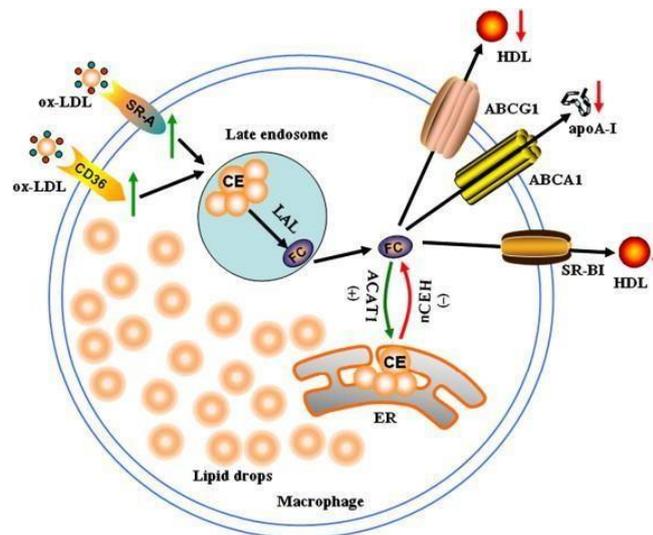


Figura 2: Células espumosas e metabolismo de colesterol: principais vias de influxo e efluxo celular (Yu *et al.*, 2013).

2.4 Capsaicina e TRPV1

Embora produtos naturais desempenhem um importante papel na descoberta de propriedades farmacológicas e na projeção e desenvolvimento de novas drogas sintéticas, atualmente a indústria farmacêutica tende a não priorizar estudos científicos nesse campo. Ao contrário, a estratégia mais comum adotada atualmente é a triagem de componentes com potenciais propriedades farmacológicas em bancos de dados disponíveis e sua posterior modificação estrutural. Apesar disso, essa estratégia não tem sido completamente bem-sucedida, pelo menos no que se refere às DCV, tendo em vista o fato de que a prevalência dessas doenças tem aumentado gradualmente a cada ano (WHO, 2015; Waltenberger *et.al*, 2016).

Uma grande variedade de compostos naturais tem sido relacionada à proteção contra determinadas doenças, entre elas, as doenças inflamatórias. As pimentas estão presentes na cultura gastronômica em todo o mundo, há vários séculos, e têm sido usadas, ao longo do tempo, com diferentes propósitos: tanto com objetivos culinários, visando melhorar o sabor, a cor e a preservação dos alimentos, como para finalidades médicas, haja vista a ampla variedade de ações farmacológicas associadas a elas, e validadas por uma gama de estudos experimentais e populacionais (Kang *et al.*, 2007)

O principal componente bioativo das pimentas é a capsaicina, e a literatura científica já demonstrou amplamente que esse composto exibe complexas propriedades farmacológicas, entre as quais se destacam efeitos termogênico, analgésico, antilipidêmico, anti-inflamatório e antioxidante. Grande parte desses estudos mostram que Caps pode exercer uma significativa atividade ateroprotetora devido principalmente à sua capacidade em modular a inflamação, o estresse oxidativo, bem como o perfil lipídico (Ahuja *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2014).

Apesar de já bastante pesquisada, e do grande número de estudos demonstrando sua atividade anti-inflamatória em várias condições, os mecanismos pelos quais Caps pode exercer esses efeitos, especialmente na aterosclerose, ainda não estão completamente esclarecidos, e os dados disponíveis ainda se mostram deveras controversos.



Figura 3: Estrutura química da Capsaicina

Inicialmente, acreditava-se que todas as ações farmacológicas associadas à Caps tinham origem na sinalização desencadeada pela sua ligação a seu principal ligante endógeno, o Receptor de Potencial Transitório Vanilóide do tipo 1 (TRPV1), como ocorre em neurônios sensoriais, nos quais TRPV1 foi inicialmente descoberto

(Caterina *et al.*, 1997; Su *et al.*, 1999; Tominaga e Tominaga, 2005; Vercelli *et al.*, 2015).

TRPV1 é conhecido por ser um canal de cátions não seletivo transmembrana, o qual pode ser ativado por uma série de estímulos endógenos, como calor, prótons, acidez ($\text{pH} < 5,9$) por determinados metabólitos lipídicos, ou por agonistas exógenos, como a capsaicina. Caps é o principal agonista exógeno de TRPV1, sendo que a ligação Caps-TRPV1 leva à ativação desse receptor, o que gera um influxo de Ca^{2+} , desencadeando, assim, uma série de respostas celulares e efeitos fisiológicos (Zhu *et al.*, 2011).

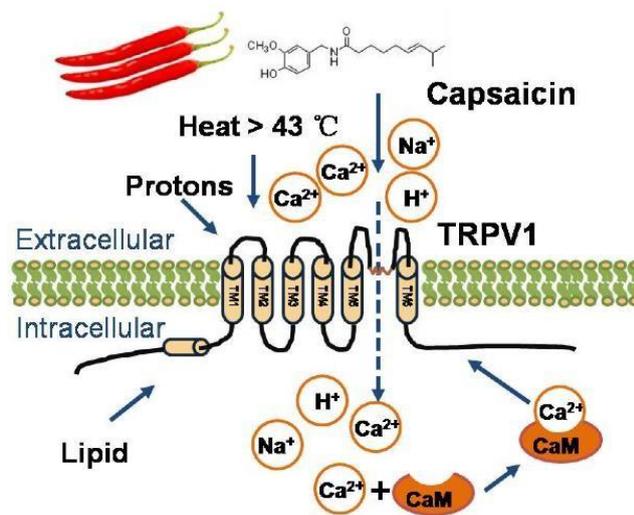


Figura 4: Estrutura e fisiologia de TRPV1: canal composto por seis domínios transmembrana. Entre os domínios 5 e 6, encontra-se a região formadora de poros, por onde se dá a entrada de íons. TRPV1 pode ser ativado por uma série de diferentes estímulos, tais como: calor ($>43^{\circ}\text{C}$), acidez ($\text{pH} < 5,9$), voltagem e certos metabólitos lipídicos. Adicionalmente, Capsaicina, principal agonista exógeno de TRPV1, também pode ativá-lo, desencadeando um influxo de cálcio e vários efeitos fisiológicos subsequentes (Sun *et al.*, 2016).

Além de mediar um aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} , a ativação de TRPV1 também gera a liberação de neuropeptídeos, tais como substância P (SP), peptídeos relacionados ao gene da calcitonina (PRGC) e somatostatina, os quais têm sido relacionados na literatura à ateroproteção. Wang e colegas demonstraram que a deleção de TRPV1 prejudica a recuperação pós-isquêmica em corações perfundidos, exacerba a inflamação e afeta o remodelamento cardíaco após infarto do miocárdio em camundongos (Wang e Wang, 2005). Adicionalmente, estudos prévios demonstraram que neuropeptídeos tais como PRGC e somatostatina podem levar à

TRPV1^{-/-}. Além disso, verificaram que a ativação crônica de TRPV1 por Caps reduziu lesões ateroscleróticas na aorta de animais ApoE^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica, mas não naquelas derivadas de camundongos ApoE^{-/-}/TRPV1^{-/-} (Ma *et.al.*, 2011).

Em adição, Zhao e colaboradores demonstraram a expressão de TRPV1 em células espumosas presentes em lesões ateroscleróticas das aortas de animais ApoE^{-/-} e observaram ainda que a exposição de macrófagos derivados da medula óssea à LDLox levou a um aumento da expressão de TRPV1 nessas células. Além disso, relataram redução do acúmulo de lipídeos induzido por LDLox quando as células foram tratadas com agonistas de TRPV1 (evodiamina e capsaicina), e um aumento quando a cultura celular foi tratada com capsazepina (CZE), um conhecido antagonista de TRPV1. Adicionalmente, a resposta inflamatória induzida por TNF foi aliviada por agonistas de TRPV1 enquanto foi exacerbada pelo antagonista CZE (Zhao *et.al.*, 2013). Outros trabalhos também relacionam os efeitos de Caps em minorar a aterosclerose com a ativação de seu receptor. O grupo de Li e colegas constatou que a ativação de TRPV1 por Caps em CML, as quais também podem gerar células espumosas, tem um potencial em regular a geração dessas células. Em 2017, Wang Y. e colaboradores relataram que a ativação de TRPV1 por Caps suprime a resposta inflamatória em células endoteliais via ativação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Wang *et al.*, 2017).

Contudo, apesar de uma gama de resultados sugerindo um efeito TRPV1-dependente de Caps na doença aterosclerótica, a literatura também disponibiliza uma série de dados demonstrando que a ação cardioprotetora de Caps pode ser mediada por mecanismos de sinalização independentes da ativação de TRPV1, o que indicaria o envolvimento de mecanismos e vias de sinalização alternativos, os quais podem envolver fatores de transcrição ou receptores nucleares associados à regulação de genes pró-inflamatórios, tais como fator nuclear kappa B (NFkB) e receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPAR) (kim *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2015).

O grupo Kim demonstrou pela primeira vez, em 2003, que Caps inibiu eficientemente a produção de PGE2 por macrófagos peritoneais murinos, e esse efeito permaneceu mesmo em células tratadas com CZE, antagonista de TRPV1. Os autores sugeriram então que a ação anti-inflamatória de Caps pode ocorrer através de mecanismos alternativos e não somente por intermédio daqueles dependentes da

ativação desse receptor (kim *et.al.*, 2003). Após esse trabalho, muitos outros investigaram o papel de Caps em células envolvidas na aterosclerose usando inibidores de TRPV1, animais nocautes para esse receptor ou ainda células conhecidas por não o expressarem, obtendo resultados os quais também indicaram que Caps pode exercer seus efeitos anti-inflamatórios atuando por vias distintas daquelas mediadas pela ativação de TRPV1.

Nesse sentido, Park e colegas, usando a linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7, as quais reconhecidamente não expressam TRPV1, mostraram que Caps inibiu significativamente a produção de TNF por essas células após estímulo com LPS. Constataram ainda que a exposição simultânea dos macrófagos a Caps e agonistas de PPAR γ resultou numa inibição mais forte da produção de TNF em comparação às células que receberam apenas o tratamento com Caps. Esse trabalho mostrou também que os efeitos observados foram revertidos com o uso de antagonista específico de PPAR γ , o que indica que a ação anti-inflamatória de Caps nessas células pode ser induzida pela ativação desse receptor nuclear. Os autores sugerem que Caps poderia atuar como um agonista direto de PPAR γ , ativando-o e, através dele, mediando efeitos fisiológicos. Mais recentemente, Jing Tang e colaboradores também revelaram que, em macrófagos THP-1 estimulados por LPS, Caps foi eficiente em reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e concluíram que esse efeito foi, pelo menos em parte, mediado pelo aumento da expressão de LXR- α dependente da ativação de PPAR γ (Park *et.al*, 2004; Tang *et.al*, 2015).

Considerando-se os potenciais efeitos de Caps para atenuar parâmetros inflamatórios relacionados ao estabelecimento e complicações da aterosclerose, assim como a falta de consenso evidenciada na literatura em relação aos mecanismos de ação envolvidos nesses processos, justifica-se avaliar não só o potencial dessa substância em minorar a aterosclerose, bem como investigar quais as vias de sinalização poderiam estar envolvidas nessas ações.

3. Justificativa

A inflamação tem papel crucial desde as fases iniciais da doença aterosclerótica e, tendo-se em vista a potencial capacidade anti-inflamatória da capsaicina, justifica-se investigar os efeitos do tratamento dietético com esse composto na evolução da aterosclerose. Como os dados na literatura em relação ao(s) seu(s) possível(eis) mecanismo(s) de ação são divergentes e contraditórios, justifica-se também avaliar por quais vias Caps pode atuar para induzir a melhora da aterosclerose.

4. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da ingestão de capsaicina nos parâmetros de inflamação e de evolução da lesão aterosclerótica em animais nocautes para a apoproteína E (ApoE^{-/-}), e, caso esses efeitos possam vir a ser demonstrados, averiguar quais seriam as possíveis vias de sinalização envolvidas nesse processo.

5. Objetivos Específicos

5.1 In vivo:

Observar, comparando-se em camundongos ApoE^{-/-} e controles (CT), os efeitos da ingestão de capsaicina nos seguintes parâmetros:

- Estado nutricional;
- Perfil lipídico e glicêmico de ambos os grupos;
- Mudanças quantitativas (área) ou qualitativas (perfil inflamatório) em áreas de lesão aterosclerótica;
- Efeito de Caps no estado inflamatório sistêmico.

5.2 In vitro:

- Investigar o papel de Caps na internalização de LDLox por macrófagos da linhagem RAW 264.7, os quais não expressam TRPV1, e por aqueles derivados da medula óssea de animais C57BL6 (que expressam esse receptor);
- Quantificar a presença de receptores scavenger de influxo (CD36 e SR-A) e de efluxo de colesterol (ABCA1 e ABCG1), na superfície celular das linhagens celulares supracitadas;
- Investigar a participação dos receptores TRPV1 e PPAR α nos possíveis efeitos de Caps.

6. Materiais e Métodos

In Vivo

6.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados camundongos nocautes para a apoproteína E (ApoE^{-/-}), fêmeas, com 6-8 semanas de idade, os quais foram divididos em quatro grupos, cada um deles contendo de 8 a 10 animais:

- Grupo Controle (CT);
- Grupo Controle Capsaicina (CT+Caps);
- Grupo ApoE
- Grupo ApoE+Caps.

O experimento *in vivo* foi realizado durante um período de cinco semanas, de forma que a dieta e a água foram disponibilizadas *ad libitum*. Na terceira semana, os animais foram submetidos a uma cirurgia de oclusão de carótida (descrita abaixo), com o objetivo de acelerar o processo aterogênico em outro sítio anatômico distinto daquele da aorta, para que se pudesse fazer, assim, a análise dos efeitos de Caps em lesões com diferentes estágios de evolução: desde as mais simples, como aquelas encontradas na aorta, até as mais avançadas, com composição mais complexa, como as geradas na carótida.

O ensaio biológico foi realizado no Biotério Ênio Cardillo Vieira, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em ambiente climatizado, sob temperatura de 26 a 28°C e com ciclo de 12 horas claro e escuro.

Ao término do período experimental, os animais foram anestesiados intraperitonealmente e o sangue foi coletado, pelo plexo inguinal, após jejum noturno. As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 6.000 rpm durante 5 minutos. O soro foi, então, armazenado a - 80° C para análises posteriores.

Após a eutanásia, foi realizada perfusão, utilizando-se salina tamponada com fosfato e, em seguida, foram coletados fígado, coração e aorta, carótida e baço, os quais foram armazenados a -80°C, para análises futuras.

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG), sob o número de protocolo 232/2016.

6.2 Preparo das Dietas

Utilizou-se dieta padrão para camundongos AIN-93M acrescida de 0,75% de colesterol, para acelerar a formação de lesões.

Para a dieta experimental, adicionou-se 0,015% de Capsaicina (Sigma - Lote BCBG3245V). As dietas oferecidas mostraram-se isocalóricas, tendo em vista que a composição das mesmas se distinguiu apenas em relação à capsaicina, composto que não contribui para a constituição calórica da dieta. A composição das dietas utilizadas neste trabalho pode ser vista na **Tabela 1**.

	Dieta Controle (g)	Dieta xperimental(g)
BHT	0,008	0,008
Birtarato de Colina	2,5	2,5
Cistina (Metionina)	1,80	1,80
Mix vitaminas	10,0	10,0
Mix minerais	35,0	35,0
Celulose	50,0	50,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Sacarose	100,0	100,0
Maltodextrina	155,0	155,0
Caseína	140,0	140,0
Amido de Milho	465,692	465,692
Água	300,0	300,0

Colesterol	7,5	7,5
Capsaicina	0	0,15

Tabela 1 – Dietas controle e experimental: composição.

6.3 Cirurgia de Oclusão de Carótida

Esse procedimento foi realizado com o objetivo de maximizar a formação de placa e adiantar o processo de amadurecimento dessas lesões, já que animais ApoE^{-/-} só formam lesões em estágios mais avançados após 14 semanas de vida.

Inicialmente, os animais foram anestesiados com Ketamina (60 a 80mg/kg) e Xilazina (15mg/kg), intraperitonealmente, na dose de 0,1mL/10g animal. Quando necessário, aplicou-se um reforço anestésico, utilizando-se apenas Ketamina a 20mg/kg, na mesma dosagem citada anteriormente. Em seguida, esses animais foram dispostos em decúbito dorsal, depilados na região abaixo do pescoço, onde realizou-se uma pequena incisão.

Após deslocar-se cuidadosamente a camada muscular com pinça, localizou-se a carótida esquerda, inseriu-se o fio cirúrgico por debaixo da mesma e em seguida deu-se um nó, o que levou à obstrução total da artéria mencionada. Finalmente, a camada muscular foi reposicionada em seu local de origem, e fez-se a sutura.

Apesar de a obstrução ser total, em conformidade com experimentos de padronização dessa técnica, previamente realizados no Laboratório de Biologia Vascular (LBV) da UFMG, não se observou nenhum sinal de isquemia cerebral nos animais submetidos a esse processo, provavelmente por um mecanismo compensatório realizado pela carótida direita. Também não se notou morte de tecido nas regiões adjacentes; ao contrário, os vasos responsáveis pela nutrição da parede arterial continuaram vivos e funcionais.

Os animais foram acompanhados diariamente na primeira semana pós- cirurgia e mostraram rápida recuperação, não sendo observada a diminuição da ingestão alimentar ou a perda de peso nem mesmo nos primeiros dias após a intervenção cirúrgica.

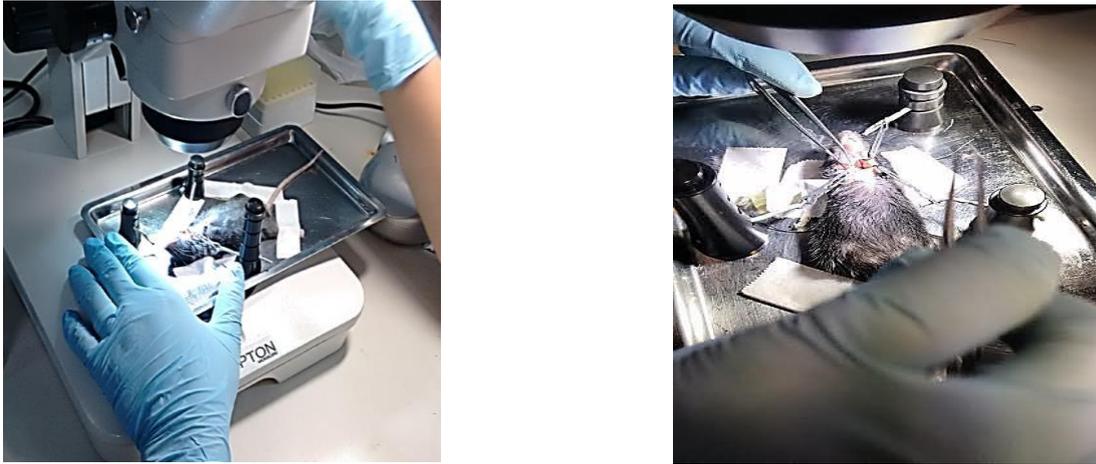


Figura 6: Cirurgia de oclusão de carótida, realizada no Laboratório de Biologia Vascular (LBV) – ICB/UFMG.

6.4 Avaliação do Consumo Calórico

Para a quantificação do consumo alimentar, as dietas ofertadas foram pesadas semanalmente. Pesou-se a quantidade oferecida, bem como a sobra que permaneceu na grade ao final de cada semana. A diferença entre dieta disponibilizada e a sobra não consumida forneceu o consumo semanal de dieta, em gramas. Em seguida, efetuou-se o cálculo das calorias consumidas por cada grupo e ainda por cada animal, em média.

6.5 Avaliação da Evolução Ponderal e do Ganho de Peso Corporal

Os camundongos foram pesados semanalmente para acompanhamento da evolução ponderal, bem como do ganho de peso final. O ganho de peso corporal foi obtido pela diferença entre peso final e peso inicial dos animais, no período de interesse. Esse processo foi executado semanalmente, a fim de se demonstrar a evolução ponderal, tendo sido também realizado nos tempos inicial (semana 1) e final (semana 5) do experimento, para se observar o ganho de peso final.

6.6 Peso Relativo dos Tecidos

A avaliação do peso relativo foi realizada nos seguintes tecidos: fígado, tecido adiposo visceral e baço. Para tanto, os tecidos foram pesados logo após sua retirada e perfusão, o que revelou seu peso absoluto. O peso relativo foi encontrado pela

divisão do peso absoluto de cada tecido pelo peso corporal do animal de origem, aferido no último dia antes da eutanásia.

6.7 Análises Bioquímicas

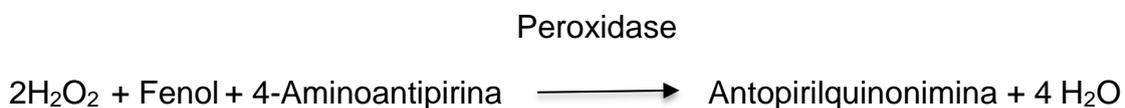
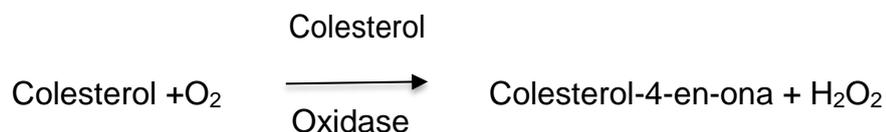
As dosagens dos níveis de Glicose (Glic), Colesterol total (CT), HDL-colesterol (HDL-c) e Triglicerídeos (TG) foram realizadas no soro dos animais. A fração aterogênica foi obtida pela diferença entre CT e HDL-c.

Cada um dos métodos utilizados é descrito a seguir:

6.7.1 Colesterol Total (CT)

O CT foi obtido por método enzimático, por meio da colesterol oxidase (ALLAIN *et. al.*, 1974), utilizando-se kit comercial (Colesterol Liquiform -Labtest, Brasil).

O colesterol total FOI determinado de acordo com as seguintes reações:



O método consiste na hidrólise de ésteres de colesterol pela colesterol esterase, produzindo colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, é oxidado a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Esse último, em presença de fenol e 4-aminoantipirina, e pela ação da peroxidase, produz um composto róseo-avermelhado, a Antopirilquinonimina, que possui absorção máxima no comprimento de onda de 500nm. A intensidade da cor

formada é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra.

As concentrações de colesterol no soro dos animais foram determinadas por um ensaio em microplaca de 96 poços. Resumidamente, 5 µL das amostras de soro foram diluídas em água deionizada na proporção 1:50 em animais WT e 1:200 nos ApoE's, para adequar as leituras de absorvância à variação linear do teste. Em seguida, 100 µL de reagente de colesterol total foram adicionados aos 100 µL de soro diluído. Após um período de incubação de 15 minutos a 37°C, a absorvância foi lida a 492nm em um leitor de microplaca. As dosagens foram realizadas em duplicata.

6.7.2 HDL Colesterol

As concentrações de HDL-c no soro foram obtidas por meio do kit enzimático Labtest (Brasil). O princípio desse método se baseia na precipitação seletiva e quantitativa das lipoproteínas LDL e VLDL pelo ácido fosfotúngstico e por cloreto de magnésio. Após centrifugação (6.000rpm/5 minutos), o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (HDL) é determinado no sobrenadante.

O sobrenadante foi plaqueado (20 µL) em uma microplaca de 96 poços, em duplicata. Em seguida, foram adicionados aos poços 200 µL do reagente de cor de Colesterol Liquiform - Labtest (Brasil). Após incubação de 15 minutos a 37° C, a absorvância foi lida a 492nm.

A fim de se determinar o padrão, plaquearam-se 10 µ L do reagente padrão. Para o cálculo das concentrações do HDL-c, inicialmente determinou-se o Fator de Calibração, através da seguinte equação:

- Fator de calibração = 40/média da Absorvância do Padrão.

Feito isso, seguiu-se o cálculo abaixo, para determinação da concentração de HDL-c, em mg/dL:

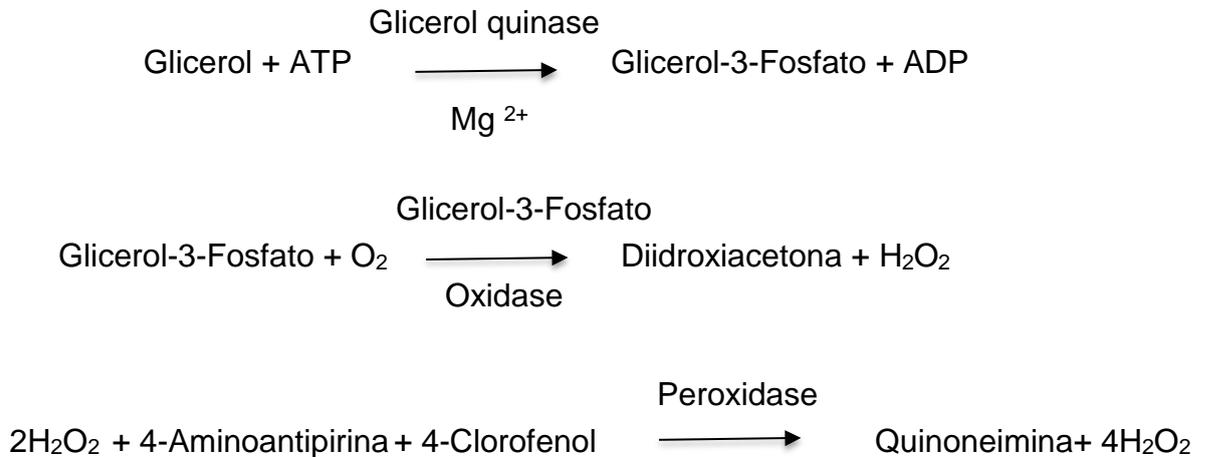
$$\text{HDL} = \text{Absorvância da amostra} \times \text{Fator de calibração}$$

6.7.3 Triglicerídeos (TG's)

TG's foram quantificados a partir da utilização de método colorimétrico, mediante kit enzimático comercial Labtest (Brasil). O princípio baseia-se nas seguintes reações:



Lipoproteína



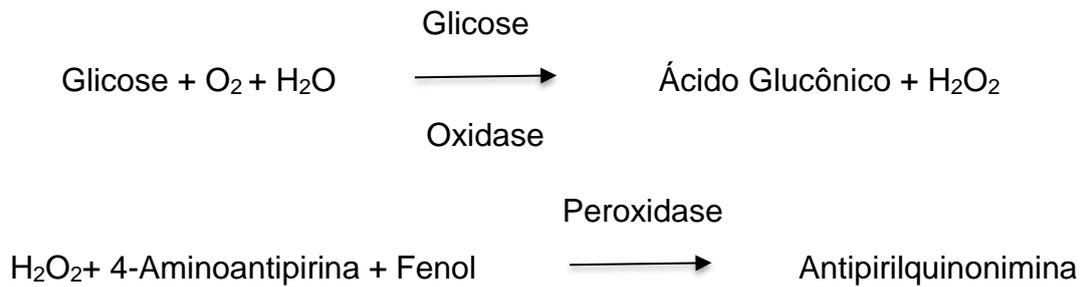
A lipoproteína lipase promove a hidrólise dos triglicerídeos, gerando glicerol que, pela ação da glicerol quinase, é convertido em glicerol-3-fosfato. Esse produto é oxidado em diidroxiacetona fosfato e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), numa reação catalisada pela glicerol-3-fosfato oxidase. A reação seguinte ocorre entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, via peroxidase, produzindo uma substância de cor avermelhada, chamada quinoneimina, a qual possui absorvância máxima em 505 nm. A intensidade da cor observada é diretamente proporcional à concentração de TG na amostra.

Para a quantificação de TG, primeiramente diluíram-se 5 µL de soro em água deionizada, na proporção de 1:25, em animais selvagens e de 1:100 nos ApoE's, a fim de se ajustarem as leituras de absorvância à variação linear do teste. Em seguida, foram adicionados 100 µL da amostra diluída em placa de 96 poços, em duplicata. Então, acrescentaram-se 100 µL de reagente de cor e, após incubação por 15 minutos a 37°C, efetuou-se a leitura a 492nm em leitor de microplaca.

6.7.4 Glicose

A mensuração de glicose sérica foi realizada utilizando-se kit enzimático comercial (Glicose Pap Liquiform, Labstest).

O princípio da técnica baseia-se nas seguintes reações de oxidação:



Primeiramente, a reação catalisada pela glicose oxidase leva à formação de peróxido de hidrogênio, que reage com 4-aminoantipirina e fenol, na presença da peroxidase, produzindo a antipirilquinonimina, um composto de cor avermelhada, com absorvância entre 490 e 520nm. A intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra.

Todo o procedimento foi realizado diretamente numa placa de 96 poços, pipetando-se 2 µL dos padrões e amostras, em triplicata. Em seguida, foram adicionados 200 µL do reagente de glicose em todos os poços e, após incubar por 15 minutos a 37°C e certificar-se de que não houve formação de bolhas, fez-se a leitura no leitor de microplaca, a 492nm. Para calcular a concentração de glicose em mg/dL, aplicou-se a fórmula:

$$\text{Glicose (mg/dL)} = (\text{Abs Amostra}/\text{Abs Padrão}) \times 100$$

6.8 Determinação do conteúdo hepático de Lipídeos

Os lipídios totais hepáticos foram extraídos com o uso de solventes orgânicos, de acordo com o método de Folch *et. al.* (1952).

Cerca de 100mg de fígado foram adicionados a 950 µL de solução de clorofórmio:metanol (2:1), a fim de se permitir a homogeneização, utilizando-se, para tanto, o homogeneizador de tecidos. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 2800 rpm, após adição de 200µL de metanol. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo de ensaio com peso já conhecido e acrescido de 400µL de clorofórmio e mais 320µL de solução de NaCl a 0,73%. Após nova centrifugação por 10 minutos a 2800 rpm, foi desprezada a fase superior, e então a parede de cada tubo

foi lavada três vezes com 300µL de solução de Folch (solução de 3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água e 2% de NaCl a 0,29%). Após cada lavagem, a fase superior foi descartada. Os extratos lipídicos obtidos foram secos em estufa *overnight* a 37°C e os lipídeos, quantificados gravimetricamente.

Esses extratos foram ressuspensos em 500µL de isopropanol para a determinação dos níveis de colesterol total e triglicérides. Para as dosagens do CT e TG no extrato lipídico, seguiu-se com o método enzimático já anteriormente descrito.

6.9 Quantificação da Área de Lesão

6.9.1 Aorta – Coloração em SUDAN IV para Aortas “En Face”

Inicialmente, cada aorta foi cuidadosamente retirada no momento da eutanásia, a partir da válvula aórtica até a bifurcação ilíaca e, em seguida, todas elas foram dissecadas para completa remoção da adventícia. Ao final desse processo, cada aorta foi armazenada em um tubo individual com PBS, sendo todas elas mantidas a 4°C, até a coloração com SUDAN IV.

Durante o processo, as aortas foram distribuídas em placas de Petri devidamente identificadas, as quais foram submergidas em uma solução de etanol 70% por 5 minutos para desidratação e, posteriormente, coradas em uma solução filtrada contendo 0,5% de SUDAN IV, 35% de etanol, e 50% de acetona, por 10 minutos. Em seguida, essas aortas foram descoradas por 5 minutos em solução de etanol 80%, de maneira que apenas as placas de gordura permaneceram coradas, devido à afinidade do SUDAN IV por lipídios (Palinski et. al., 1994). Vale ressaltar que todos esses procedimentos foram efetuados sob agitação, utilizando-se o shaker.

Ao final desse processo, as artérias foram abertas longitudinalmente e, a seguir, as imagens foram capturadas por meio de scanner e digitalizadas em computador. O programa analisador de imagens Image-Pro Plus versão 6.3 (Image-Pro Plus Software, Bethesda Maryland - USA) foi utilizado para obtenção das medidas. O cálculo das lesões nas aortas foi realizado considerando-se a porcentagem de área acometida por lesão em relação à área total da artéria.

6.9.2 Quantificação das lesões na artéria carótida obstruída

As carótidas foram cuidadosamente retiradas no momento da eutanásia e imediatamente incluídas em Tissue Freezing Medium (Jung Tissue Freezing Medium; Leica Microsystems, Wetzlar – Germany) para pronto congelamento. Em seguida, o bloco de tecido congelado foi cortado em criostato (Leica CM 3050 S – Alemanha), em crio-seções de 10µm, a aproximadamente 90 µm de distância uma da outra, a fim de que cada lâmina contivesse cortes representativos de toda a carótida, longitudinalmente.

Os cortes foram então corados com Hematoxilina-Eosina (HE). Esse material foi, a seguir, codificado e submetido à análise morfométrica das lesões. Para isso, foram selecionados 10 cortes por lâmina, amostrando uma extensão média de 900 µm de área analisada, com as estruturas anatômicas referenciais da artéria carótida, que foram então fotografadas (aumento de 10x).

Após obtenção das imagens, realizou-se a quantificação da área de lesão, com o auxílio do software analisador de imagens (Image-Pro Plus versão 6.3 (Image-Pro Plus Software, Bethesda Maryland - USA). O cálculo da lesão média/animal foi feito somando-se todas as medidas obtidas nos 10 cortes de cada lâmina, o que representou o valor da área da lesão final.

6.10 Marcadores de Inflamação

6.10.1 Imunofluorescência: CD36 e MOMA

A presença de CD36, bem como a do infiltrado de monócitos e macrófagos (MOMA) nas lesões da válvula aórtica, foi analisada por imunofluorescência. Brevemente, o procedimento pode ser assim descrito: inicialmente, os cortes foram fixados com formol 10% gelado por 20 minutos, à temperatura ambiente. Após isso, as lâminas foram lavadas com PBS 1x, e então realizou-se a permeabilização e o bloqueio (Triton X-100 a 0,1% e BSA a 4% em PBS 1x), por 1h, à temperatura ambiente. Procedeu-se em seguida à incubação com anticorpo primário, overnight, a 4°C (CD36 camundongo anticamundongo – Santa Cruz; MOMA rato anticamundongo - Bio-Rad). No dia seguinte, após lavar as lâminas novamente com PBS 1x, aplicaram-se os anticorpos secundários (FITC coelho anticamundongo – Santa Cruz; Alexa Flúor

647 cabra antirrato – BD Pharmigen). Seguiu-se, então, à incubação por 2h, no escuro, à temperatura ambiente. Finalmente, efetuou-se a preparação das lâminas com meio de montagem contendo DAPI.

Terminado esse processo, seguiu-se a captura das imagens, as quais foram efetuadas utilizando-se o microscópio de fluorescência Nikon Eclipse Ti (USA, 2012), no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG (aumento 10x). A intensidade de fluorescência foi analisada com auxílio do software Image-J, utilizando-se a extensão FIJI Win 32. O conteúdo de CD36 e MOMA presente na lesão foi expresso como a intensidade de fluorescência de cada marcador, por grupo.

6.10.2 Quantificação enzimática de NAG e MPO

6.10.2.1 Preparo do tecido para dosagem de atividade de NAG e MPO

Foram pesados 20mg de tecido hepático, aos quais adicionaram-se 380 μ L de buffer 1 (NaCl a 0,1M, Na₃PO₄ a 0,02M e EDTA 0,015M – pH=4,7). A seguir, procedeu-se à homogeneização tecidual, utilizando-se homogeneizador de tecidos.

Após centrifugação (10.000 rpm, 10 min., 4°C), adicionou-se solução salina gelada (NaCl 0,2%), seguida por adição de solução salina acrescida de glicose (NaCl 1,6% + Glicose 5%) num volume de 1,5mL de salina para cada 100mg de tecido, para ambas as soluções. Em seguida, a mistura foi submetida à nova centrifugação (10.000 rpm, 10 min., 4°C), e, após descarte do sobrenadante, acrescentou-se buffer 2 (Na₃PO₄ a 0,05M e HETAB 0,5% - pH=5,4), no mesmo volume previamente utilizado para o buffer 1. Após rápida homogeneização no vortex, alíquotou-se metade do volume para cada dosagem e armazenou-se a -80°C, até a dosagem de atividade enzimática.

6.10.2.2 NAG

A uma das alíquotas de homogenato, adicionou-se uma solução salina gelada (0,9% NaCl+Triton X-100 0,1%), num volume correspondente a 2mL de solução para cada 100mg de tecido e, após rápida homogeneização no vortex, seguiu-se a centrifugação (3000 rpm, 10 min, 4°C).

ÁVILA, D.L.

Foram adicionados, então, 100µL de sobrenadante em microplaca de 96 poços, em duplicata, e em seguida fez-se adição de mais 100 µL de solução de substrato (0,008 g de p-nitrofenil-N-acetil-D-glicosamida para cada mL de tampão citrato/fosfato - 100mL de ácido cítrico 0,1M + 155mL de Na₂HPO₄ - pH=4,5). Essas amostras foram incubadas a 37°C, durante 10 minutos. Após esse período, foram acrescentados a essas mesmas amostras 100 µL de tampão glicina a 0,2M (quantidades iguais de glicina 0,8M + NaCl 0,8M + NaOH 0,8M - pH=10,6) e realizou-se, a seguir a leitura em leitor de microplaca a 400nm. O resultado final foi corrigido pela concentração de proteína no tecido, medida no homogenato, de acordo com o método de Lowry *et. al.*, 1951.

6.10.2.3 MPO

Inicialmente, o homogenato aliquoteado foi congelado em nitrogênio líquido. Então, fez-se descongelamento em água por três vezes consecutivas, seguido por centrifugação (10000 rpm, 15 min.)

Logo após, foram adicionados 25 µL do sobrenadante obtido em microplaca de 96 poços, em duplicata, aos quais foram acrescentados mais 25 µL do substrato 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB: 3,845 mg de TMB para cada mL de DMSO. A placa foi então incubada por 5 minutos, a 37°C. Ao final desse período, adicionaram-se 100 µL de H₂O₂ 0,002% e seguiu-se nova incubação, por igual período. Após essa etapa, a reação foi parada pela adição de 100 µL de H₂SO₄, e então as amostras foram lidas em leitor de microplaca, a 450nm. O resultado final foi corrigido pela concentração de proteína no tecido, medida no homogenato, de acordo com o método de Lowry *et. al.*, 1951.

6.10.3 Quantificação de citocinas por ELISA

Foram pesados 20mg de tecido hepático, aos quais foram adicionados 200 µL de tampão de extração de citocinas, o que foi seguido por uma centrifugação a 10000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi então utilizado nas dosagens, realizadas pelo método ELISA, com kit comercial Biolegend, como descrito a seguir:

Inicialmente, os anticorpos de captura para TNF, IL-1β e IL-6 foram diluídos em coating buffer (8,4g de NaHCO₃, 3,56g de Na₂CO₃ em 1L de água deionizada), enquanto os anticorpos de captura para IL-10 foram diluídos em PBS, de acordo com

especificações do fabricante. 100 µL de cada anticorpo diluído foram adicionados às respectivas microplacas Nunc (Thermo Fisher) e incubados *overnight*, em geladeira (2 a 8 °C).

No dia seguinte, após quatro lavagens com wash buffer (PBS + 0,05% de Tween 20), foi realizado o bloqueio, pela adição de 200 µL de solução diluente (PBS + 1% BSA), seguido por incubação durante 1 hora, em temperatura ambiente, sob agitação a 500 rpm em shaker de placa. Após 4 lavagens com wash buffer, seguiu-se o preparo dos padrões por diluição seriada em solução diluente, segundo instruções do fabricante.

100 µL de padrões e amostras (diluídas 100x) foram pipetados em placa Nunc, em duplicata e incubados por mais 2 horas, em temperatura ambiente. Findo este prazo, foram adicionados os anticorpos de detecção, diluídos em solução diluente, conforme indicações do fabricante, seguindo-se uma nova incubação, por 1 hora, em temperatura ambiente, sob agitação. Após quatro lavagens para retirada do anticorpo de detecção, fez-se a adição de 100 µL da solução de enzima avidina-HRP e seguiu-se uma nova incubação, por mais 30 minutos, sob agitação. Ao final desse prazo, foram adicionados às amostras 100 µL de solução de substrato (TBM). As placas foram incubadas até o desenvolvimento da cor desejada, o que foi seguido pela adição da solução de parada (H₂SO₄ a 1M). A absorbância foi lida a 450nm, dentro de até 15 minutos.

6.11 Avaliação do rolamento e adesão de leucócitos – Microscopia

Intravital

Inicialmente, os animais foram submetidos à anestesia, através da aplicação intraperitoneal de Ketamina (60 a 80mg/kg) e Xilazina (15mg/kg), na dose de 0,1mL/10g animal. Quando se fez necessário, foi aplicado um reforço anestésico, utilizando apenas Ketamina a 20mg/kg, na mesma dosagem usada anteriormente.

Em seguida, posicionou-se o animal em decúbito lateral, e fez-se uma pequena incisão na região onde se localiza o intestino delgado. As alças intestinais foram cirurgicamente expostas e afixadas, de forma que os vasos da microcirculação se tornassem visíveis. Após isso, o animal foi levado ao Centro de Aquisição de Imagens (CAPI) da UFMG, onde foi injetado com Rodamina 6G, um marcador de leucócitos

não tóxico, por via intravenosa. Em seguida, o mesmo foi disposto sob o microscópio de fluorescência (Apotome.2 Zeiss), onde realizou-se a aquisição das imagens obtidas na veia mesentérica: especificamente naquelas com diâmetro variando entre 100 e 150 μ m. Para isso, utilizou-se a câmera de vídeo (AxioCam 503Mono, Zeiss - Alemanha). Essas imagens foram então transmitidas diretamente para um computador, onde foram registradas e analisadas (Software Zein, Zeiss - Alemanha). Os vídeos tiveram duração de 1 minuto, aproximadamente.

Interações entre leucócitos e endotélio foram analisadas pela contagem do número de leucócitos rolantes ou aderidos ao vaso, após análise de 1 minuto de vídeo, em três regiões diferentes (topo, meio e final da artéria), num campo de área demarcada pelo posicionamento de um retângulo de 200x250 μ m na tela do vídeo. Leucócitos nitidamente visíveis e em movimento pelo endotélio, seja na periferia ou centro, desde que estando dentro do campo delimitado pelo retângulo posicionado na tela, foram considerados como estando em rolamento. Para investigar as interações de adesão, consideraram-se como aderidos leucócitos estáticos por pelo menos 30 segundos. Os resultados foram expressos como número de células rolando/aderidas por campo.



Figura 7: Microscopia Intravital para marcação de leucócitos.

In Vitro

6.12. Isolamento da LDL plasmática

A LDL nativa de humanos (LDL, $d = 1,019-1,063\text{g/ml}$) foi isolada a partir do plasma de doadores saudáveis, através da ultracentrifugação, a qual separa as várias lipoproteínas presentes no plasma por um gradiente de densidade sequencial,

conforme descrito por Chung e colaboradores, (1986). Resumidamente, o sangue foi coletado de voluntários saudáveis, não fumantes, e imediatamente centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos. Após a coleta do plasma, a esse foram adicionados os seguintes conservantes e inibidores de proteases: aprotinina (5µL/mL), benzamidina 2mM (5µL/mL), solução de azida sódica 5% e clorafenicol 0,1% (10µL/mL), solução de clorafenicol 0,25% (20µL/mL) e PMSF 0,5 mM (0,5µL/mL).

A seguir, a densidade do plasma foi ajustada para 1,21g/ml pela adição de brometo de potássico (KBr) sólido, seguida por suave agitação, até a completa dissolução desse sal. A solução de plasma foi, então, distribuída em tubos de polipropileno de 10 mL, aos quais foi adicionada uma solução de KBr de densidade 1,006, a fim de gerar um gradiente descontínuo de densidade, até completar o volume final do tubo. Finalmente, o plasma foi ultracentrifugado a 50.000 rpm por duas horas e meia a 4°C em ultracentrífuga Sorvall Ultra pro-80/DU Pont, utilizando-se o rotor fixo 875T.

Após a centrifugação, a fração de LDL foi coletada por sucção utilizando-se uma seringa de 1mL. A LDL coletada foi então dialisada em solução de tampão fosfato (PBS, pH 7,4), por um período de 24 horas, a 4°C, no escuro, sendo que nesse período foram realizadas duas trocas do tampão. A concentração de proteína da LDL foi então determinada pelo método de Lowry *et. al.*, 1951.

Ao final desse processo, o material foi armazenado em geladeira, a 4°C, protegido da luz, por um período máximo de 30 dias.

6.13 Marcação LDL-Dil e Oxidação da LDL-Dil

Parte da LDL a ser usada nos experimentos de citometria de fluxo (descritos adiante) foi previamente marcada com Dil, um corante lipofílico de membrana, a fim de quantificar o conteúdo intracelular de LDL em macrófagos após incubação com essa LDL marcada. A padronização desse protocolo baseou-se naquele desenvolvido por Lian e colaboradores (2008).

A LDL foi diluída 4x em água mili-Q, e então foram adicionados 50µL de Dil, derivado de uma solução estoque de 3mg/mL (em DMSO), para cada mg de LDL. Logo após, fez-se a incubação *overnight*, a 37°C, no escuro e sob agitação. Ao final do período de incubação, a LDL previamente marcada foi submetida à oxidação por adição de cloreto de cobre (CuCl₂) a 1mM, num volume necessário para se chegar a

concentração final de 5 μ M, durante 4h, a 37°C, também sob agitação e proteção da luz. Ao fim desse prazo, a reação de oxidação foi parada com a adição de EDTA 0,5M.

Por fim, a LDL diluída, devidamente oxidada e marcada (LDLox-Dil), foi submetida à nova ultracentrifugação (50.000 rpm, 2:30hs), a fim de se descartar o excesso de Dil e íons cobre, derivados dos processos de marcação e oxidação. Para tanto, aos tubos com LDLox-Dil, adicionou-se uma solução de EDTA a 0,5M a uma concentração final de 0,24mM, até completar o volume final do tubo. Finalmente, recolheu-se, utilizando-se uma seringa de 1mL, a LDLox-Dil, a qual foi então submetida à diálise, por mais 24hs. Antes de ser utilizada nos experimentos de citometria, efetuou-se a filtração dessa LDL marcada, em filtro de 0,22 μ M.

6.14 Soluções utilizadas nos ensaios de Citometria de Fluxo

6.14.1 Solução Estoque de Capsaicina

Para os ensaios experimentais, foi preparada uma solução estoque de Caps a uma concentração de 1mM (N-vanililnonanamida - Capsaicina - Sigma-Aldrich, pureza \geq 97%) diluída em uma solução de NaCl a 1,8% e etanol, na proporção de 1:1. Em seguida, essa solução foi filtrada em filtro estéril de 0,22 μ m e armazenada a 4°C, por até 90 dias.

As concentrações utilizadas experimentalmente foram obtidas pela pipetagem dessa solução estoque diretamente nos poços das placas de citometria.

6.14.2 Solução estoque de Capsazepina (CZE)

Capsazepina (Alomone Labs), um antagonista de TRPV1 amplamente utilizado pela literatura, foi diluída em DMSO, a uma concentração final de 1mM (solução estoque). A seguir, foi filtrada em filtro estéril de 0,22 μ m e armazenada a -20°C, por até 30 dias. A concentração utilizada nos ensaios foi de 10 μ M.

6.14.3 Solução estoque de GW9662

A solução estoque de GW9662 (Santa Cruz), um antagonista irreversível e seletivo de PPAR α , também foi preparada diluindo-se o reagente em DMSO, a uma concentração final de 0,1mM. Após ser filtrada em filtro de 0,22 μ m, a referida solução foi armazenada a -20°C, por até 60 dias. A concentração utilizada nos ensaios foi de 5 μ M.

6.15 Culturas Celulares de Macrófagos

A fim de se verificar se a modulação da formação de células espumosas por Caps ocorre de forma dependente ou não de TRPV1, e ainda se PPAR γ pode exercer um papel relevante nesse processo, foram utilizadas duas diferentes linhagens de macrófagos murinos: a linhagem RAW 264.7, a qual reconhecidamente não expressa TRPV1, e a de células derivadas da medula óssea de camundongos, as BMDM (Bone Marrow Derived Macrophages), que mantêm a expressão desse receptor.

Células BMDM foram extraídas em ambiente estéril (fluxo laminar), diretamente da medula óssea derivada do fêmur e tíbia de camundongos C57BL-6 e depositadas num tubo Falcon gelado contendo meio RPMI sem soro bovino fetal (SBF). Após centrifugação a 200 x g, por 10 min., a 4^oC, as células foram ressuspensas em aproximadamente 20 mL de meio RPMI 20/30, (meio RPMI acrescido de 30% de meio condicionado de leucócitos - LCM) com o objetivo de promover a diferenciação de monócitos em macrófagos.

Em seguida, pipetaram-se-se 3,5 x 10⁶ células em uma placa de Petri às quais foram adicionados 5mL de meio RPMI 20/30. As células foram mantidas em estufa umidificada com CO₂ a 5%, a 37^oC, por sete dias, sendo que, no quarto dia, efetuou-se a troca do meio.

Após esse período, as placas foram lavadas com PBS gelado, a fim de se removerem as células não aderidas, quais sejam, monócitos não diferenciados. Os macrófagos remanescentes na placa foram desaderidos por meio de movimentos repetidos de sucção e dispensa de uma solução gelada de EDTA a 10mM (em PBS), utilizando-se, para tanto, aproximadamente 3mL de solução, até que não fosse possível observar, macroscopicamente, células aderidas. Terminado esse processo, as células foram acondicionadas em tubo Falcon acrescido com aproximadamente 15mL de meio RPMI sem soro e foram centrifugadas a 1500 rpm, por 10 min. O pellet contendo os macrófagos foi então ressuspensado em cerca de 30 mL de meio, dessa vez suplementado com 5% de SBF, para fornecer a HDL necessária, como já citado, para o efluxo de colesterol.

6.16 Citometria de fluxo

A captação de LDLox-Dil, bem como a expressão dos receptores scavenger de influxo CD36 e SRA e aqueles de efluxo, tais como ABCA1 e ABCG1, foram

detectados na superfície das duas linhagens celulares de macrófagos murinos aqui utilizadas, quais sejam RAW 264.7 e BMDM, por citometria de fluxo.

Para tanto, foram semeadas em placas de 96 poços (fundo em U) de 5×10^5 a 1×10^6 células/poço, em meio DMEM (linhagem RAW 264.7) ou RPMI (BMDM). Vale notar que ambos os meios utilizados nos ensaios, para as diferentes culturas celulares (DMEM ou RPMI), foram suplementados com 5% de SBF, a fim de fornecer uma quantidade de HDL mínima para viabilizar o efluxo de colesterol.

Posteriormente, as células foram pré-incubadas com $10 \mu\text{M}$ de Capsazepina, antagonista de TRPV1, ou com $5 \mu\text{M}$ de GW9662, antagonista de PPAR α , por 1 hora.

Após lavagem das placas com meio sem soro, as células foram então incubadas com Caps, nas concentrações de $1 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ e $10 \mu\text{M}$, por 2 horas. Depois de nova lavagem para retirada de Caps, elas foram submetidas ao estímulo com LDLox-Dil, a $50 \mu\text{g/mL}$, por 4 horas. Findo esse prazo, as células foram centrifugadas a 1500 rpm, por 5 minutos. Procedeu-se então à marcação de receptores de superfície celular, tanto os de influxo como os de efluxo, incubando-se, por um período de 30 minutos, à temperatura ambiente, as células com anticorpos específicos para as respectivas proteínas analisadas.

Os anticorpos primários utilizados foram:

- Anti-CD36 (camundongo anticamundongo, Santa Cruz)
- Anti-SR-A (cabra anticamundongo, Santa Cruz).

Em seguida, as mesmas foram lavadas duas vezes com PBS-Wash e incubadas durante 30 minutos adicionais com os respectivos anticorpos secundários:

- Alexa Flúor 647 (cabra anticamundongo, Cell Signaling);
Alexa 647 (coelho anticabra, Santa Cruz).

O mesmo procedimento foi realizado para marcação dos receptores de efluxo, sendo que, para tanto, foram utilizados como anticorpos primários:

- Anti-ABCA1 (camundongo anticamundongo, Novus Biologicals)
- Anti-ABCG1 (coelho anticamundongo, Novus Biologicals)

Após as células serem submetidas a duas lavagens com PBS Wash, os seguintes anticorpos secundários foram adicionados:

- Alexa Flúor 647 (cabra anticamundongo)
- CFL 647 (burro anticoelho, Santa Cruz).

Ao fim do processo de marcação, elas foram lavadas por mais 2 vezes e em seguida fixadas com 2% de paraformaldeído/PBS durante 30 minutos, em temperatura ambiente.

A leitura foi realizada usando-se o citômetro FACS Calibur™, do Centro de Laboratórios Multiusuários do ICB-UFMG (CELAM), utilizando-se os filtros FL-2 e FL-4, para Dil e os anticorpos conjugados com sondas 647, respectivamente.

A aquisição de dados foi efetuada fazendo-se o uso do software BD CellQuest Pro, e a delimitação da população celular foi realizada usando-se os parâmetros de tamanho e complexidade interna (parâmetros FSC e SSC, respectivamente). Foram adquiridos de 10.000 a 15.000 eventos por amostra. Os dados foram calculados como a porcentagem de fluorescência das populações distribuídas sob a forma de dot-plots bidimensionais.

Para análise dos dados adquiridos no citômetro de fluxo, foi utilizado o software FlowJow v10.0.6 (Tree Star Inc., EUA).

6.17 Análise Estatística

Efetuaram-se as análises utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego California - USA). Os dados foram verificados quanto à hipótese nula de distribuição Gaussiana através dos testes de Kolmogorov-Smirnov (considerando-se um valor de $p > 0,05$).

A comparação estatística entre os dados dos quatro grupos obtidos nos ensaios *in vivo* foi realizada por ANOVA one-way, seguida por pós-teste de comparações múltiplas de Tukey, para dados paramétricos. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de comparações múltiplas de Dunns.

Ao se compararem apenas grupos ApoE^{-/-} entre si, no caso de medidas realizadas diretamente nas lesões ateroscleróticas ou nas análises de ganho ponderal, utilizou-se Teste t de Student não pareado para dados paramétricos ou Mann-Whitney para os não paramétricos.

Nos experimentos *in vitro*, os dados foram submetidos ao mesmo teste de normalidade utilizado para dados *in vivo*, mas nos primeiros, utilizou-se ANOVA Dunns, respectivamente, para dados paramétricos e não paramétricos, comparando-se sempre os grupos tratados com os controles de cada ensaio, ou dois grupos

equivalentes (CT ou tratados com Caps) entre as mesmas linhagens submetidas ou não aos antagonistas.

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando valores de $p \leq 0,05$.

7. Resultados Comentados

- Experimentos *in vivo*:

7.1 Ingestão Calórica e Composição Corporal

A análise da Fig. 8-A demonstra que não houve diferença quanto à ingestão calórica entre os grupos avaliados, indicando que as alterações que possam ser encontradas quanto ao peso não se devem a diferenças na ingestão alimentar.

Apesar de a ingestão ter sido semelhante entre os grupos, o ganho de peso foi menor nos animais recebendo capsaicina, comparados aos seus respectivos controles (Fig. 8-B).

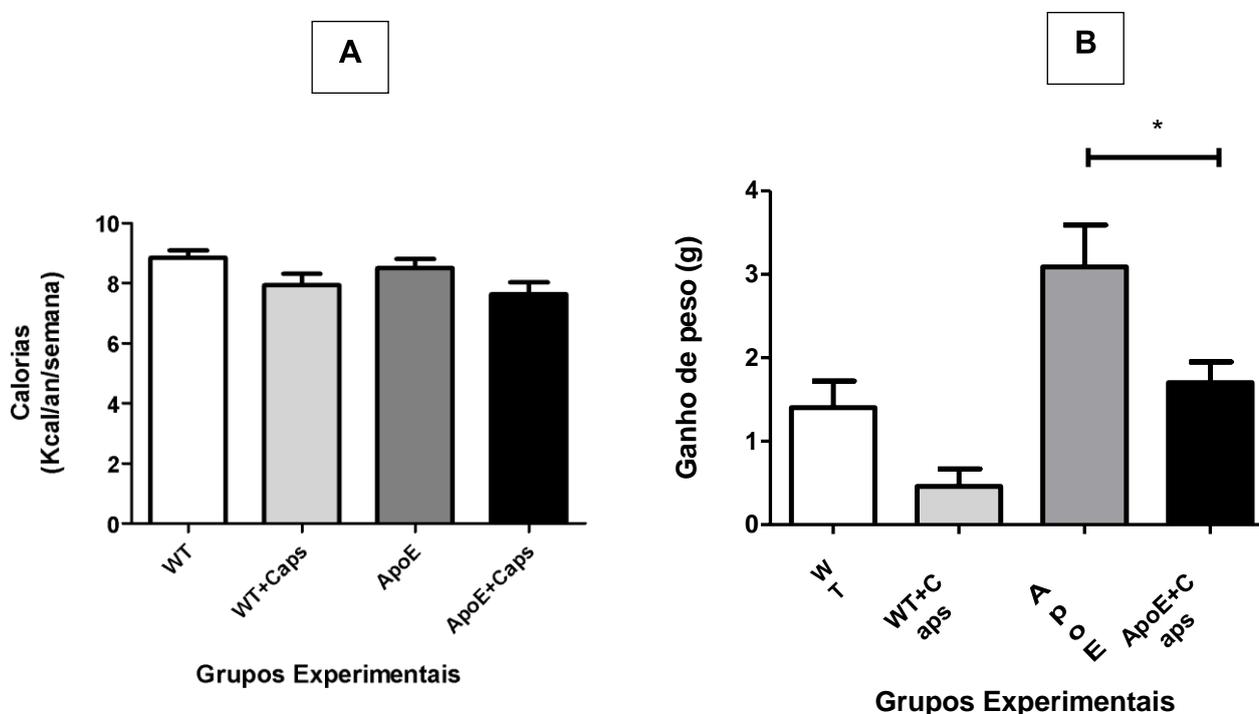


Figura 8: **A** - Ingestão calórica e ganho de peso (**B**) de camundongos C57BL-6 (WT e WT+Caps) e ApoE^{-/-} (ApoE e ApoE+Caps) durante 5 semanas de intervenção com dieta padrão (AIN-93M + 0,75% de colesterol) ou experimental (AIN-93M + 0,75% de colesterol + 0.015% de Caps). Dados apresentados como média \pm desvio padrão (DP). * Estatisticamente diferente (Test t) de seu respectivo controle.

7.2 Peso Relativo dos Tecidos

A seguir, avaliou-se também o peso relativo de determinados tecidos corporais relacionados ao metabolismo de gorduras e à inflamação, tais como: tecido adiposo visceral, tecido hepático e baço (Fig. 9).

Não foi observada diferença quanto ao peso relativo do tecido hepático entre os grupos.

Já em relação ao baço, observa-se que o volume tecidual é proporcionalmente maior no grupo ApoE, em relação aos animais selvagens, o que pode ser indicativo de uma maior atividade imunológica no tecido desses animais. Embora o tratamento com Caps não tenha reduzido o volume do baço no grupo ApoE+Caps, em relação a seu controle ApoE, o volume tecidual desse grupo foi semelhante ao encontrado nos animais selvagens.

Em concordância com a redução do ganho de peso corporal observada nos animais recebendo a dieta experimental, Caps levou a uma redução do peso do tecido adiposo visceral, em relação aos seus controles.

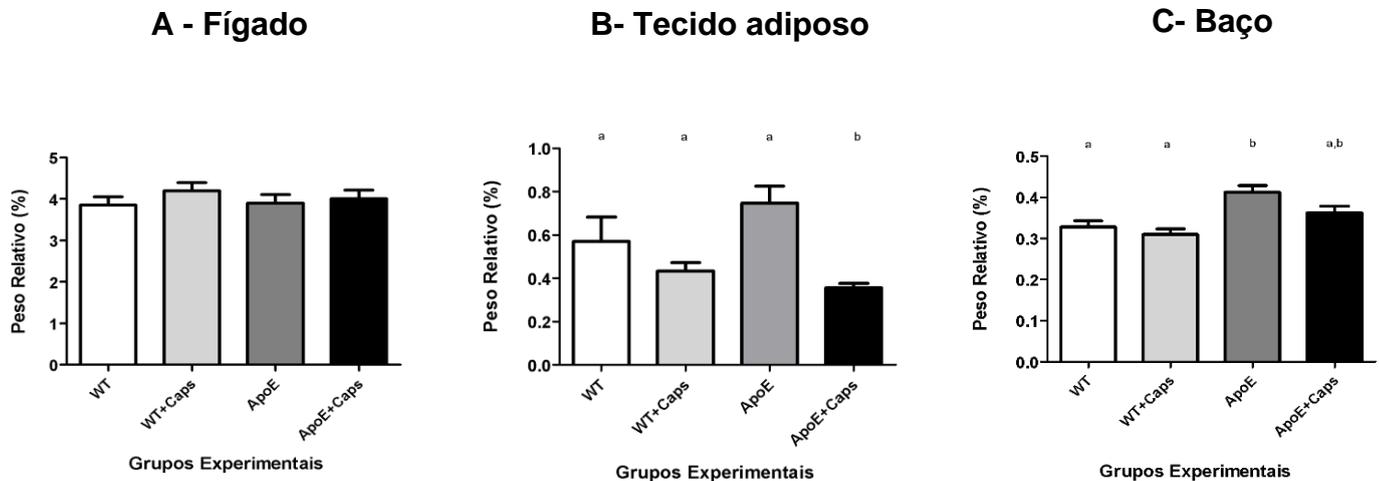


Figura 9: Peso relativo do fígado, tecido adiposo visceral e baço de animais selvagens ou APOE nocautes recebendo dietas padrão ou experimental, ao final de 5 semanas de intervenção dietética. **A** – Peso relativo do tecido hepático. **B** – Peso relativo do tecido adiposo visceral. **C** - Peso relativo do baço. Dados apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

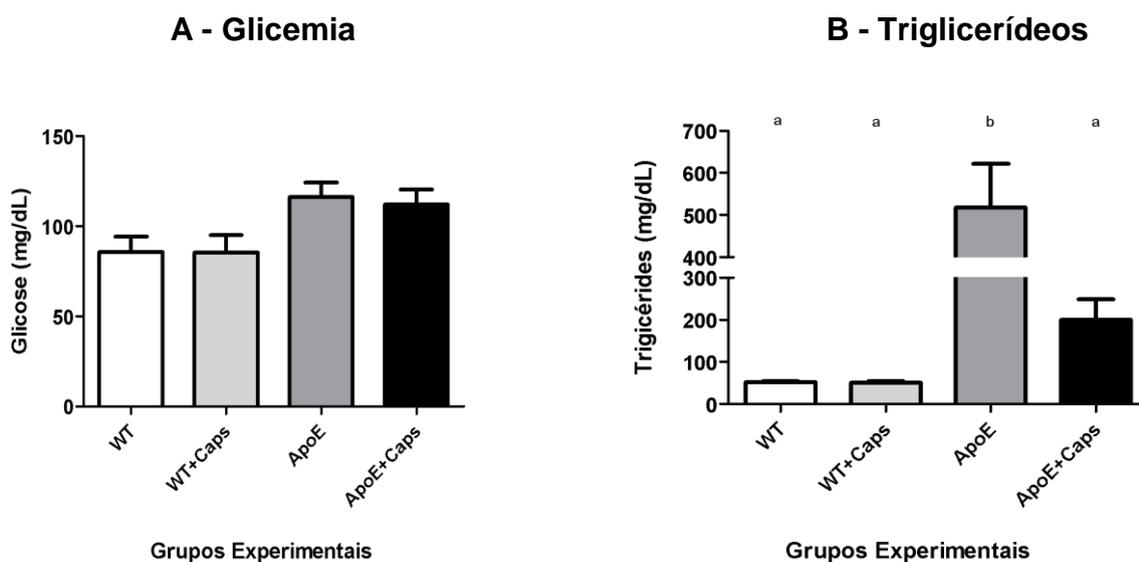
7.3 Análises Bioquímicas:

7.3.1 Glicemia e Perfil lipídico:

Não foram observadas diferenças em relação aos níveis de glicose (Fig. 10-A) entre os dois grupos, mas a ingestão de Caps reduziu os níveis séricos de triglicerídeos (Fig. 10-B).

O tratamento com Caps também se mostrou eficiente em reduzir tanto os níveis de Colesterol Total como os de Colesterol não HDL (nc-HDL), ao final das cinco semanas de intervenção dietética (Fig. 10-C e 10- D). Esses dados demonstram que Caps foi eficiente em melhorar o perfil lipídico, notadamente em relação à fração aterogênica.

Não foram observadas alterações em relação aos níveis de colesterol HDL entre os grupos (Fig. 10-E).



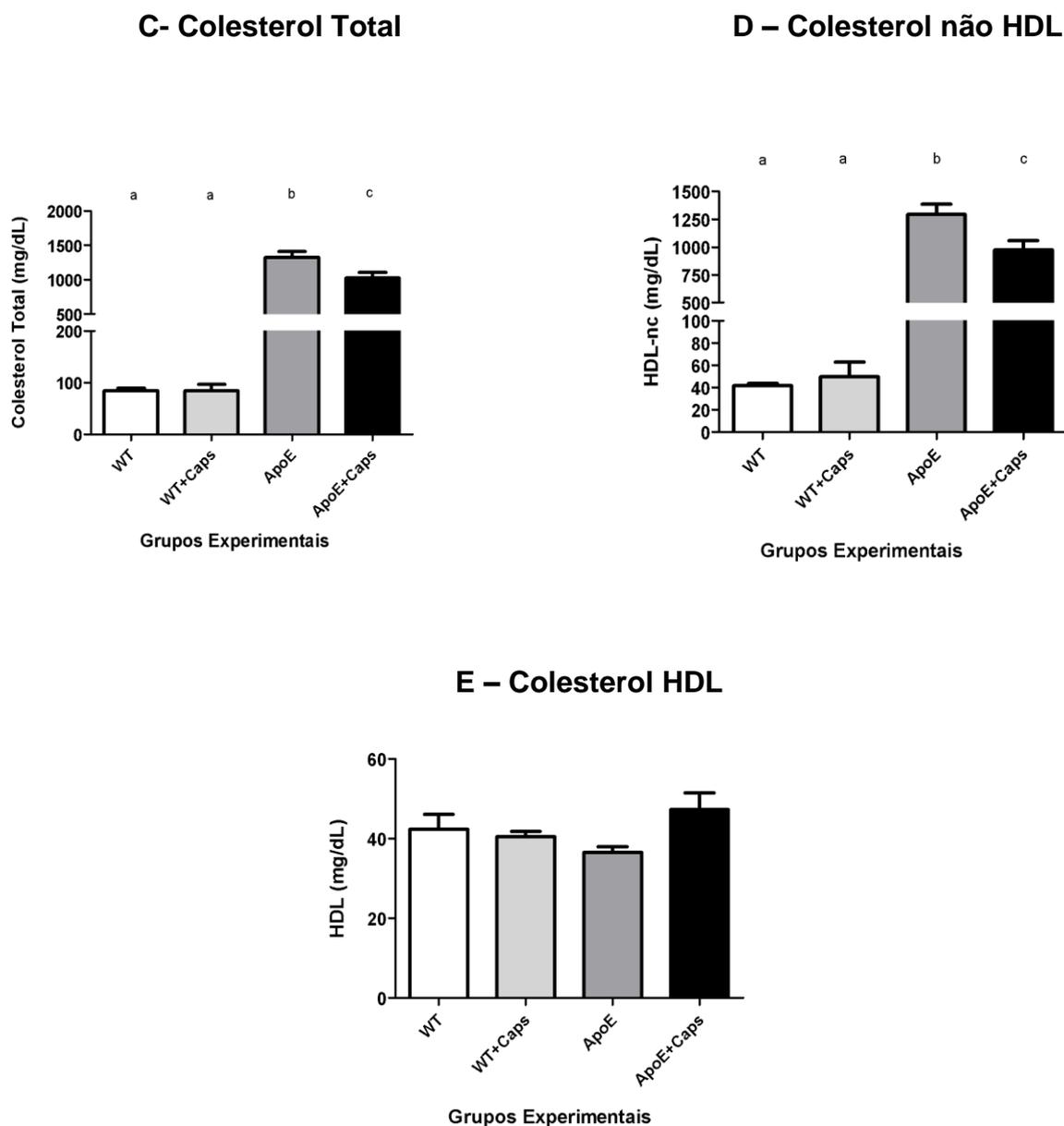


Figura 10: Glicemia e perfil lipídico de animais selvagens e nocautes para a apoproteína E alimentados por cinco semanas com dietas padrão (AIN-93M + 0,75% de colesterol) ou experimental (AIN-93M + 0,75% de colesterol + 0.015% de Caps). **A** – Glicemia de jejum ; **B** – Níveis séricos de Triglicerídeo; **C** – Níveis plasmáticos de Colesterol Total; **D** – Níveis sanguíneos de HDL-nc; **E** – Níveis séricos de HDL-c. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

7.4 Determinação do conteúdo lipídico do Fígado

Levando-se em conta que todos os quatro grupos de animais receberam uma dieta suplementada com colesterol, seguiu-se à avaliação do conteúdo hepático de lipídeos. Para atingir esse objetivo, foi mensurado o conteúdo de lipídeos totais, bem

como o das frações de colesterol total e de triglicérides, no fígado dos animais (Fig. 11).

Embora tenha se mostrado efetiva em regular os níveis de lipídeos séricos, esse efeito não foi observado no tecido hepático, no qual Caps não foi eficiente em reduzir o conteúdo de lipídeos totais, nem das frações de colesterol total e triglicérides.

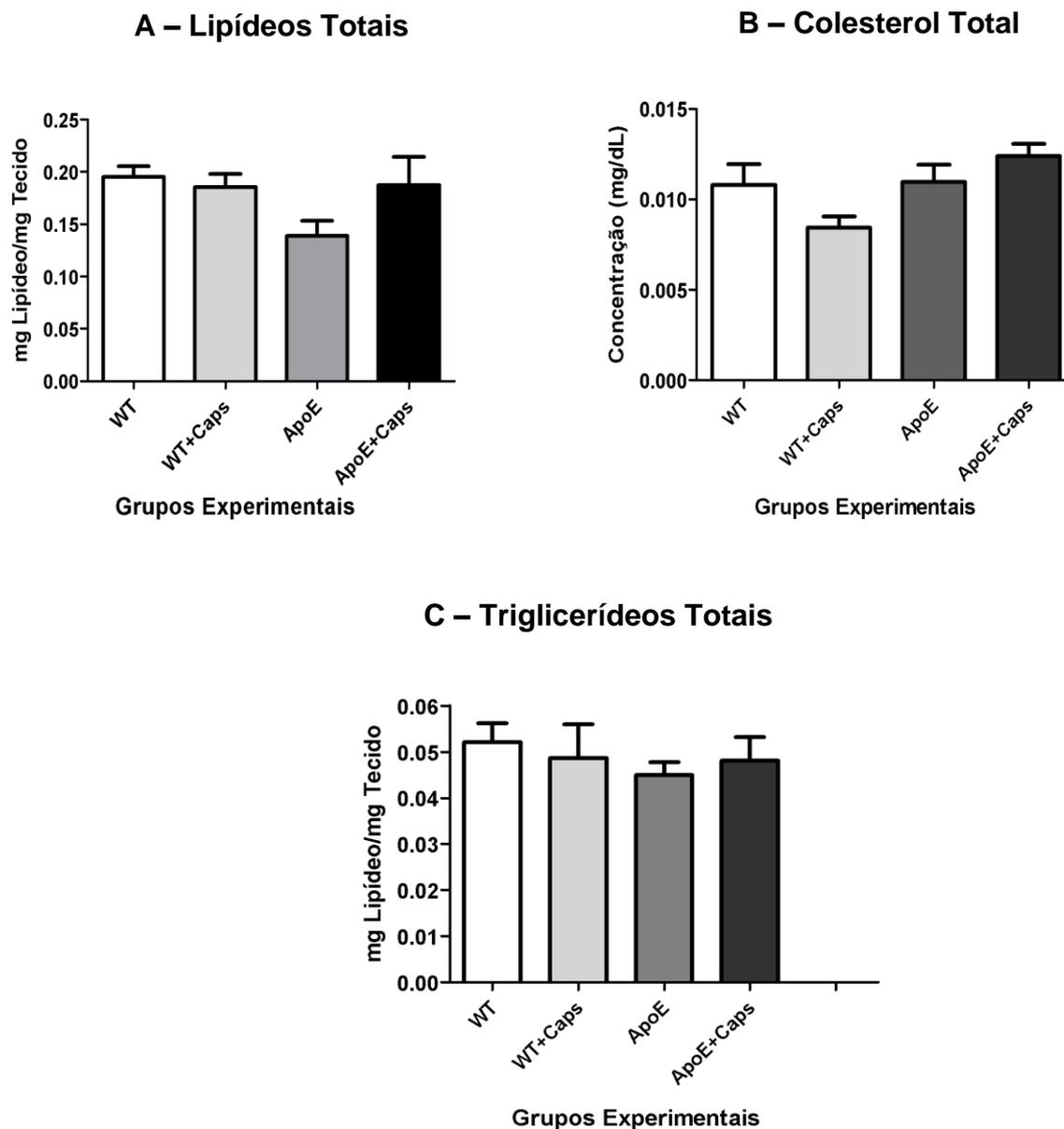


Figura 11: Determinação do conteúdo hepático de lipídeos totais e das frações de colesterol total e de triglicérides em animais selvagens e nocautes para a apoproteína E, após cinco semanas de intervenção dietética. **A** – Conteúdo de Lipídeos Totais; **B** – Conteúdo de Colesterol Total; **C** – Conteúdo de Triglicérides. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

7.5 Mensuração da área de tecido acometida por lesão

O desenvolvimento da aterosclerose foi avaliado por meio da quantificação da área de lesão nas artérias aorta e carótida, essa última após ser submetida à cirurgia de oclusão.

Salienta-se que os dados referem-se apenas aos grupos ApoE^{-/-}, tendo em vista que camundongos selvagens não desenvolvem lesões ateroscleróticas (Kapourchali *et al.* 2014; (Emini Veseli *et al.*, 2017).

7.5.1 Aorta

A área de tecido acometida por lesão foi avaliada primeiramente na artéria aorta, pelo método coloração de aortas *En Face*, usando-se o corante lipofílico SUDAN-IV (Fig. 12).

É possível notar que o tratamento com Caps foi eficaz em reduzir a porcentagem de tecido acometido por lesões, notadamente no arco aórtico, o local comumente mais afetado (Fig. 12-B).

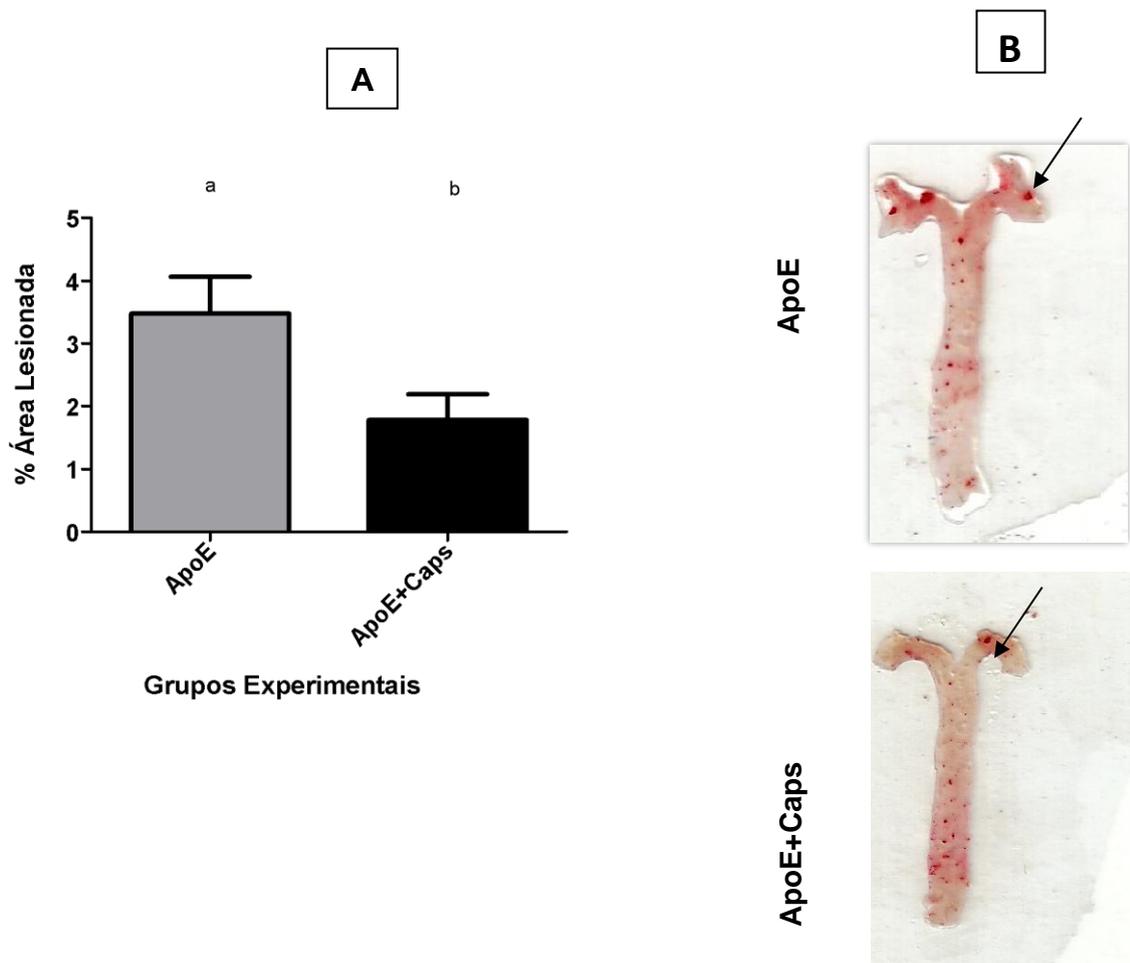


Figura 12: Porcentagem da área de tecido aórtico acometido por lesões ateroscleróticas em camundongos ApoE^{-/-}, após cinco semanas de intervenção dietética com ou sem Caps. **A** -% da área de tecido lesionada; **B** – Imagens representativas de aortas de animais tratados ou não com Caps, após serem submetidos a coloração com SUDAN-IV. Setas pretas indicam lesões ateroscleróticas. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

7.5.2 Carótida

Tendo em vista que as lesões formadas na aorta usualmente apresentam um menor grau de complexidade (estrias gordurosas), procedeu-se à avaliação da área de lesão na artéria carótida obstruída cirurgicamente, a qual representa um grau mais avançado de aterosclerose.

A análise da Fig. 13 nos permite concluir que, assim como visto na aorta, a intervenção dietética com Caps foi efetiva em atenuar a formação de lesões ateroscleróticas também na artéria carótida.

Esses dados, analisados em conjunto, suportam a ideia de que Caps pode exercer um papel ateroprotetor, na medida em que sua ingestão crônica foi eficiente em retardar a formação de lesões ateroscleróticas, tanto em estados iniciais, como em lesões usualmente vistas na artéria aorta, como naqueles mais avançados, como demonstrado na artéria carótida.

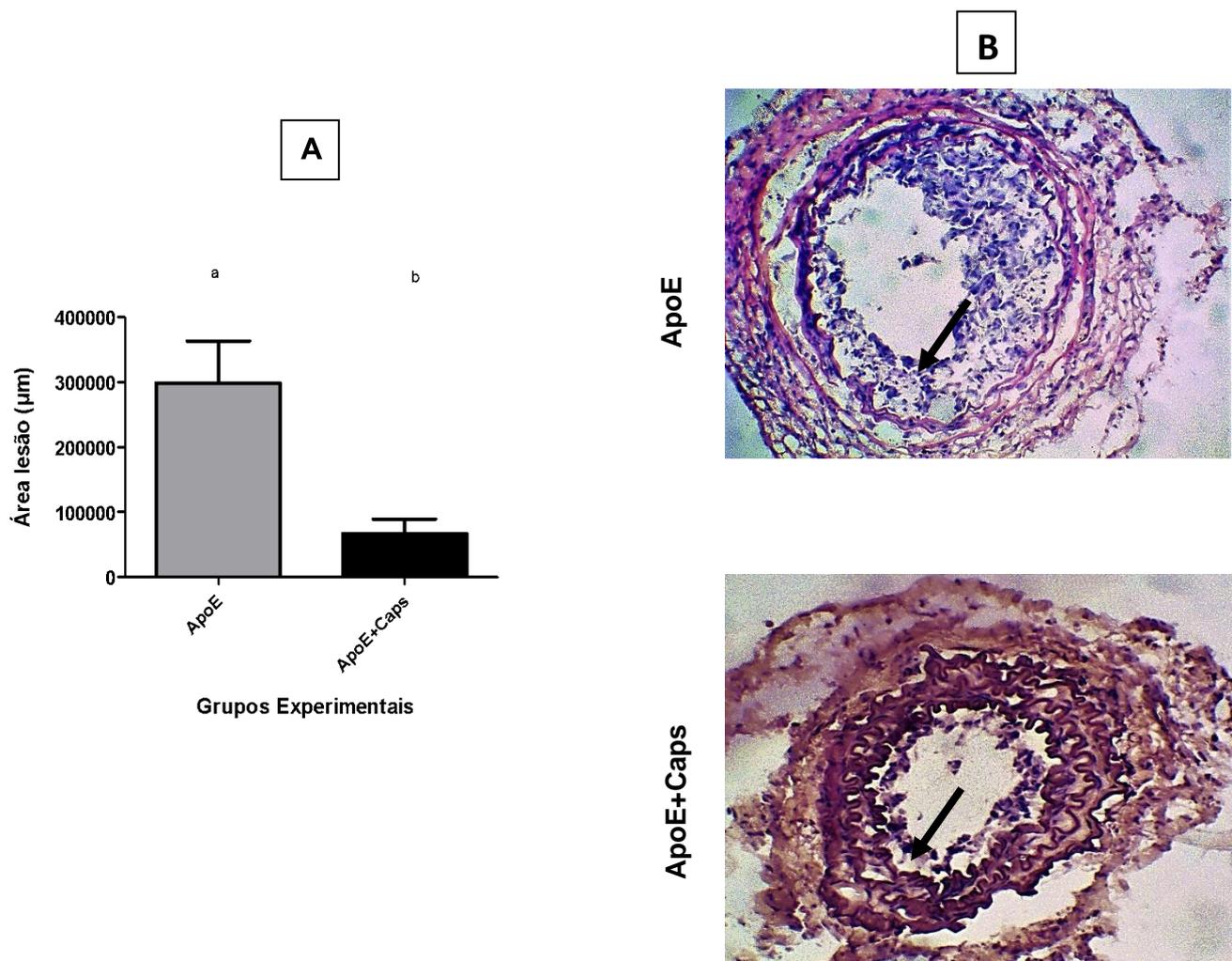


Figura 13: Área de tecido acometido por lesões ateroscleróticas na artéria carótida de camundongos ApoE^{-/-}, após cinco semanas sob dietas padrão (AIN93M + 0,075% de colesterol) ou experimental (AIN93M + 0,075% de colesterol+ 0,015% de Caps). **A** - Área de tecido acometido por lesões; **B** - Imagens representativas de carótidas de animais tratados ou não com Caps, após coloração H/E. Setas pretas indicam lesões ateroscleróticas. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

7.6 Mensuração de Parâmetros Inflamatórios

Com o propósito de investigar o papel de Caps na inflamação crônica decorrente da doença aterosclerótica procedeu-se à avaliação do efeito desse fitoquímico em relação a determinados marcadores de inflamação ateroscleróticos.

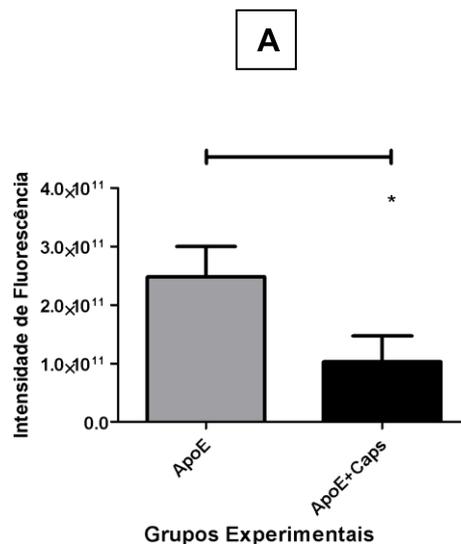
Para tanto, investigou-se o efeito da ingestão de Caps em marcadores inflamatórios diretamente na lesão (MOMA e CD36), por imunofluorescência, assim como no tecido hepático, órgão central envolvido no metabolismo de colesterol. Nesse tecido, realizou-se a quantificação não apenas da atividade de enzimas preditoras do conteúdo de células inflamatórias, tais como: n-acetilglicosaminidase (NAG) de

macrófagos e mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos, bem como de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-6 e IL-1 β , e da citocina anti-inflamatória IL-10.

7.6.1 Quantificação de MOMA

O conteúdo de células inflamatórias importantes para a formação da lesão aterosclerótica, como monócitos e macrófagos, foi mensurado diretamente na lesão (artéria carótida), por imunofluorescência.

Pode-se perceber, pela análise da Fig. 14, que os animais os quais receberam uma dieta suplementada com Caps apresentaram um menor conteúdo de monócitos/macrófagos nas lesões ateroscleróticas da artéria carótida. Esse dado leva a crer que Caps pode atuar reduzindo o recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão, ou ainda agindo diretamente nas células espumosas, modulando sua formação pelo controle das vias de influxo ou efluxo de colesterol.



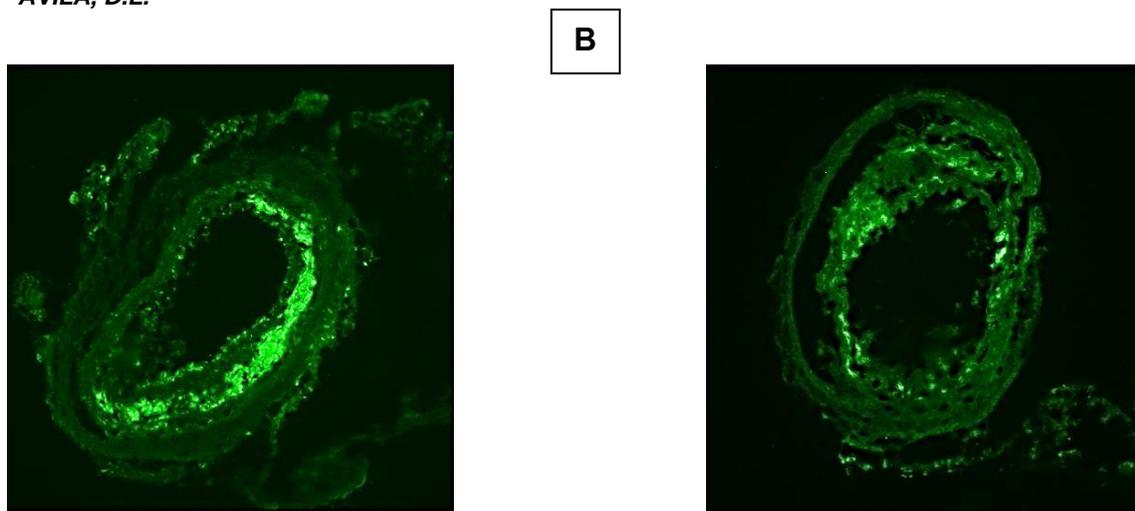


Figura 14: Quantificação do conteúdo de monócitos e macrófagos (MOMA) na artéria carótida de camundongos ApoE^{-/-} alimentados com dietas padrão (AIN93M + 0,075% de colesterol) ou experimental (AIN93M + 0,075% de colesterol+ 0,015% de Caps) durante cinco semanas. **A** - Intensidade de Fluorescência para marcadores de monócitos e macrófagos (MOMA); **B** – Imagens representativas de imunofluorescência de carótidas após ensaio para marcação de MOMA. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

7.6.2 Quantificação de CD36

Além da quantificação do conteúdo de MOMA, realizou-se, de forma conjunta, a mensuração de outro marcador de inflamação na aterosclerose: o receptor scavenger CD36, um dos principais responsáveis pela captação de partículas LDL modificadas oxidativamente.

A análise da Fig. 15 demonstra que os animais que receberam Caps dietética reduziram de forma significativa o conteúdo de CD36 nas lesões da carótida., dando força à hipótese de que Caps pode exercer um papel ateroprotetor devido a seu potencial anti-inflamatório, demonstrado por sua capacidade em modular tanto o conteúdo de células inflamatórias presentes na lesão (Fig. 14), como o do receptor de influxo CD36.

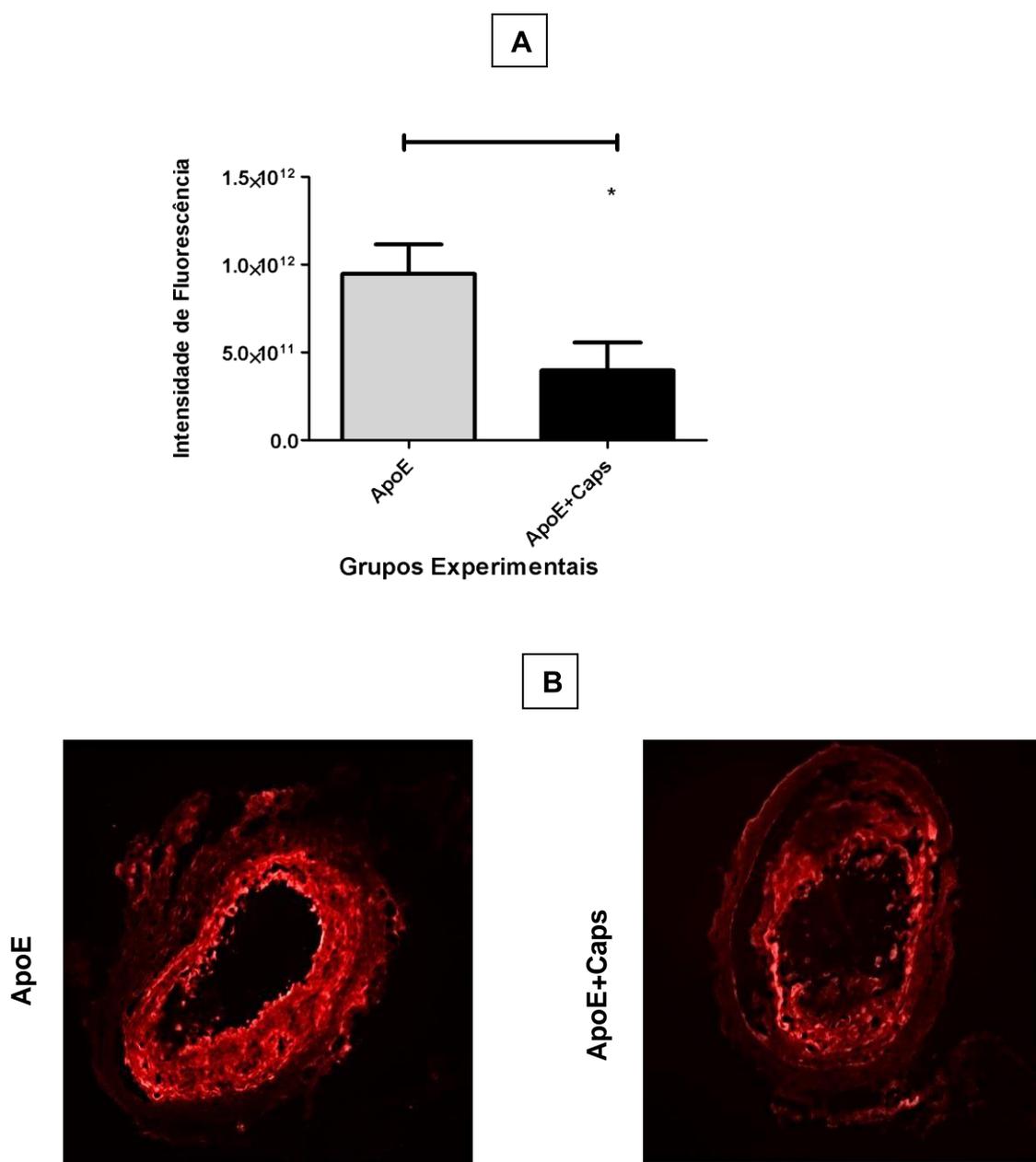


Figura 15: Quantificação do conteúdo de receptores CD36 na artéria carótida de camundongos ApoE^{-/-}, após receberem, por cinco semanas, dietas padrão (AIN93M + 0,075% de colesterol) ou experimental (AIN93M + 0,075% de colesterol+ 0,015% de Caps). **A** - Intensidade de Fluorescência (CD36); **B** – Imagens representativas de imunofluorescência para CD36 em carótidas de animais tratados ou não com Caps. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

7.6.3 Mensuração da atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG) e Mieloperoxidase (MPO)

A fim de se avaliar a capacidade anti-inflamatória de Caps de forma sistêmica, analisou-se o efeito desse composto na atividade das enzimas NAG e MPO, preditoras

da presença tecidual de macrófagos e neutrófilos, respectivamente, no tecido hepático, órgão central do metabolismo de colesterol (Fig. 16).

Caps dietética mostrou-se eficaz em reduzir a atividade enzimática das duas enzimas avaliadas, demonstrando que, nos animais que receberam uma dieta suplementada com capsaicina, há uma menor presença hepática tanto de macrófagos, como de neutrófilos. Além disso, nota-se que o grupo ApoE^{-/-} tratado com Caps apresentou níveis de NAG e MPO similares àqueles encontrados nos animais selvagens. Esses dados corroboram os que foram encontrados na carótida (Fig. 14) e reforçam a tese de que Caps não só possui uma atividade anti-inflamatória, como também a de que essa ação é sistêmica e não apenas local.

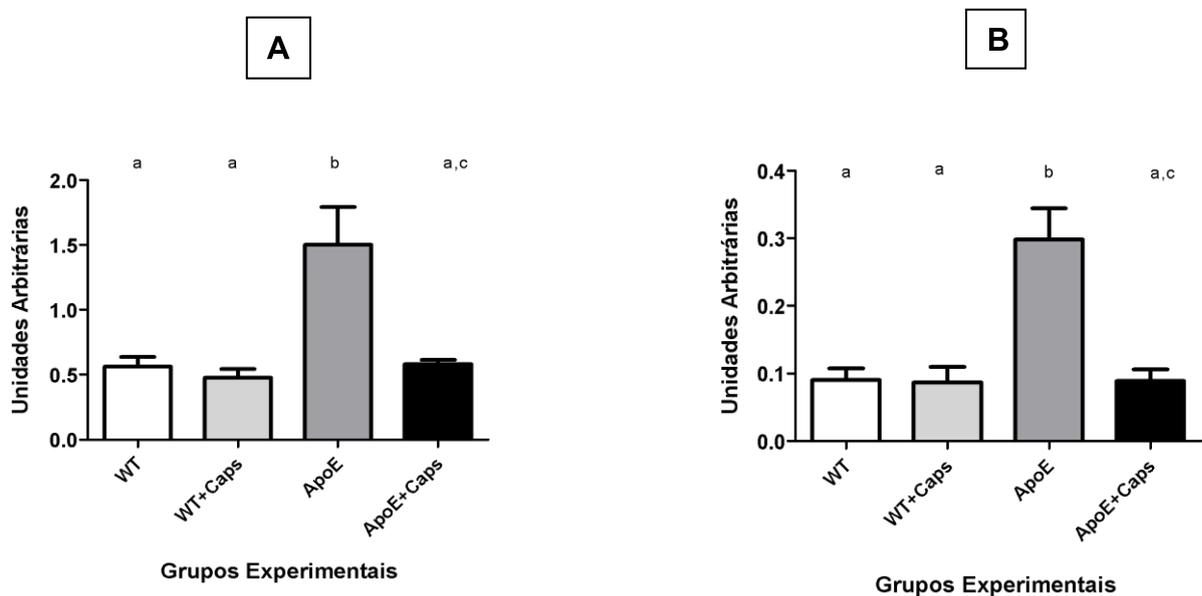


Figura 16: Quantificação da atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG) e mieloperoxidase (MPO) no tecido hepático de animais selvagens e nocautes para a apoproteína E, após cinco semanas de intervenção dietética. **A** - Atividade de NAG; **B** – Atividade de MPO. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

7.6.4. Avaliação de citocinas no fígado

Além da determinação da atividade enzimática de NAG e MPO, a investigação da capacidade anti-inflamatória de Caps se deu pela medida direta de citocinas pró e anti-inflamatórias no tecido hepático (Fig. 17).

Caps foi eficiente em diminuir as concentrações tanto de TNF como de IL-1 β no fígado, embora não tenha alterado as concentrações de IL-6 e IL-10. Nota-se ainda

ÁVILA, D.L.

que, como ocorreu para NAG e MPO, os níveis dessas duas primeiras citocinas foram bastante similares àqueles encontrados em animais selvagens.

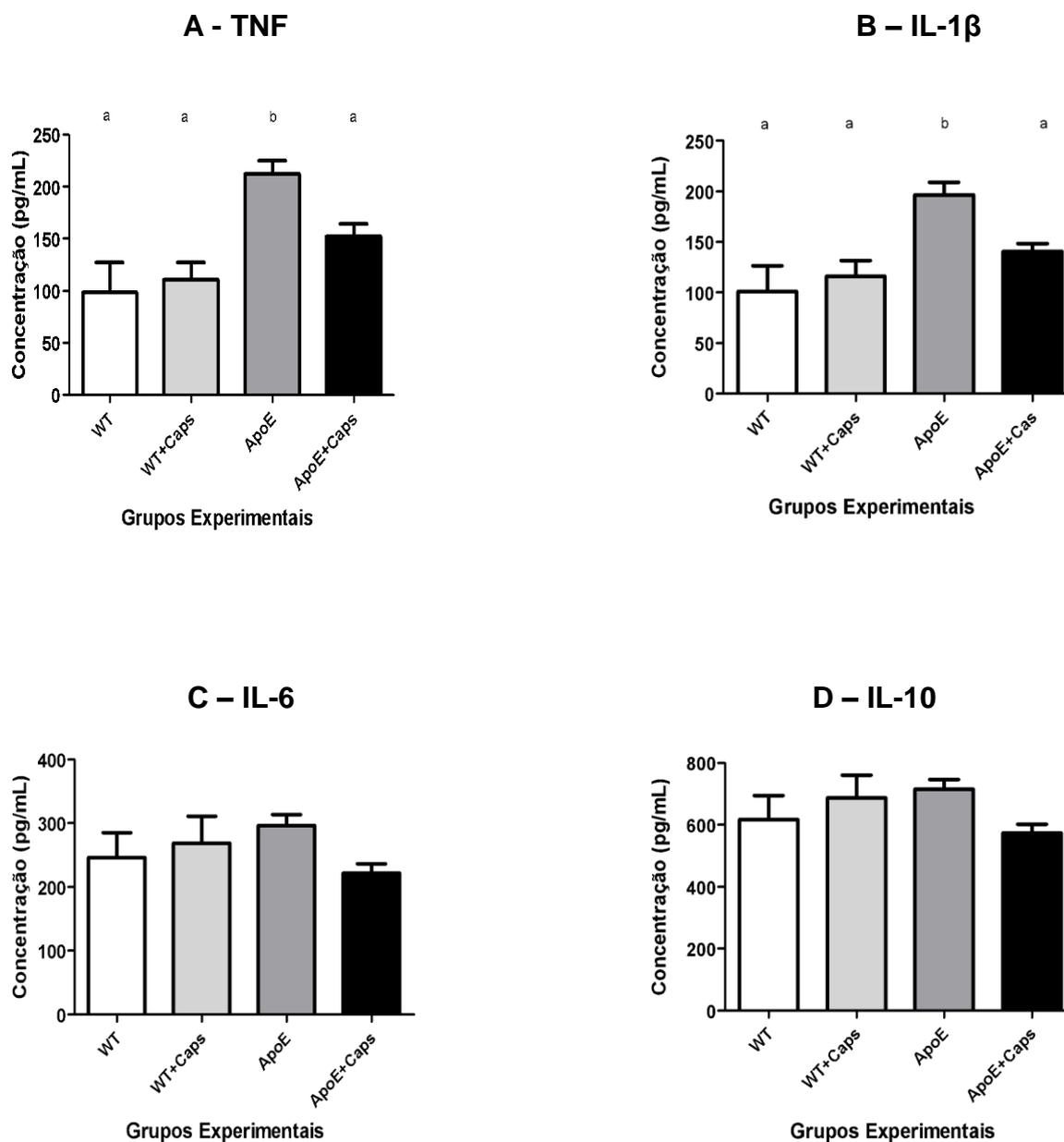


Figura 17: Quantificação de citocinas no tecido hepático de animais selvagens e nocautes para a apoproteína E, após cinco semanas recebendo dietas padrão (AIN-93M + 0,075% de colesterol) ou experimental (AIN-93M + 0,075% de colesterol + 0,015% de Capsaicina). **A** - TNF; **B** - IL-1 β ; **C** - IL-6; **D** - IL-10. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

7.7 Avaliação do rolamento e adesão de leucócitos

Sabe-se que o recrutamento de monócitos constitui-se num dos passos cruciais para o início e progressão do processo aterosclerótico. Dessa forma, a fim de investigar se Caps poderia interferir também nesse processo e certificar-se, portanto, de sua capacidade em exercer uma atividade anti-inflamatória em diferentes parâmetros de inflamação observados nas distintas fases da condição aterosclerótica, buscou-se avaliar o rolamento e adesão de leucócitos marcados com Rodamina 6G, um marcador de leucócitos em geral, na veia mesentérica de animais ApoE^{-/-}, tratados ou não com Caps.

Caps reduziu significativamente tanto o rolamento quanto a adesão de leucócitos na veia mesentérica de animais ApoE^{-/-}, como se pode perceber pela análise da Fig. 18 o que, junto com os demais dados, indica um papel ateroprotetor desse princípio ativo, decorrente de sua capacidade anti-inflamatória sistêmica, a qual poderia interferir em diferentes parâmetros de inflamação contribuidores para o surgimento e evolução da doença aterosclerótica.

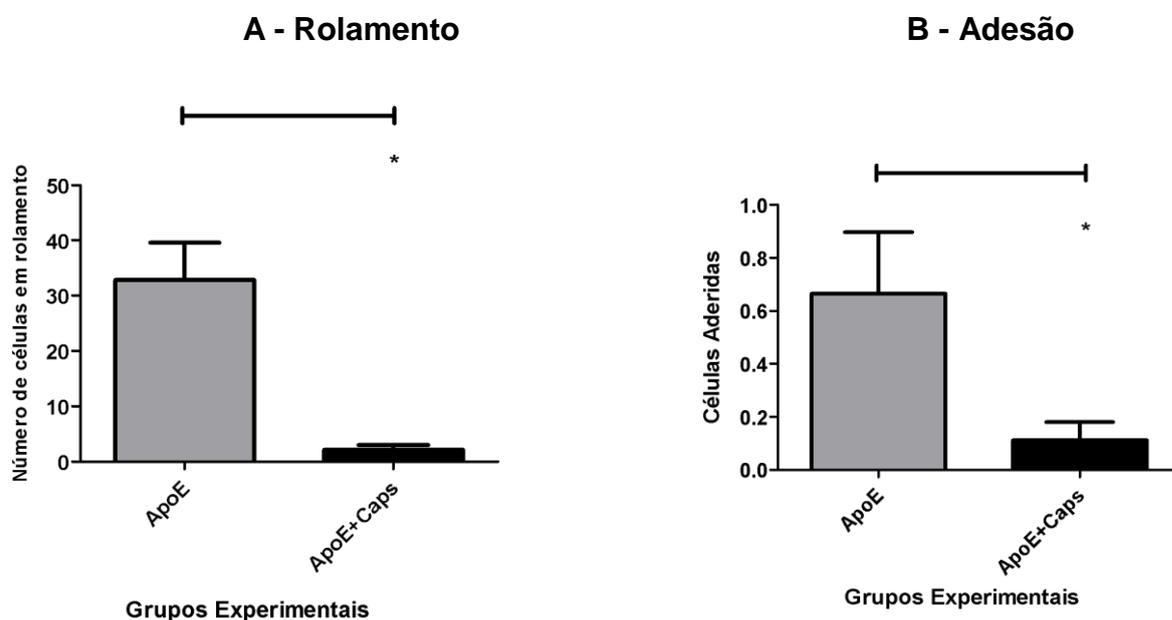


Figura 18: Avaliação do rolamento e adesão de leucócitos marcados com rodamina 6G na veia mesentérica de animais ApoE^{-/-}, após cinco semanas de intervenção dietética (dieta padrão ou experimental). A - Rolamento; B - Adesão leucocitária. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

- Experimentos *in vitro*

7.8 Investigação das vias ativadas por Caps envolvidas na redução do processo inflamatório

O conjunto de dados *in vivo* indicam que Caps é capaz de atenuar a evolução do processo aterosclerótico em animais nocautes para a apoproteína E, o que é demonstrado, em última instância, pela menor área de lesão, tanto na aorta como na carótida dos animais recebendo Caps dietética.

A análise dos dados também sugere que esse efeito deve-se, pelo menos em parte, à capacidade anti-inflamatória desse composto, que pode atuar de forma sistêmica, reduzindo a resposta inflamatória envolvida na formação e evolução das lesões ateroscleróticas.

Sendo assim, sabendo-se que a formação de células espumosas é parte importante no desenvolvimento do processo aterosclerótico e da inflamação crônica inerente a ele, deu-se prosseguimento à investigação dos efeitos de Caps na formação dessas células, a fim de determinar se o potencial anti-inflamatório dessa substância é dependente da ativação de seu receptor TRPV1, ou se envolve vias alternativas.

Para isso, foram utilizadas duas diferentes linhagens de macrófagos murinos: a linhagem RAW 264.7, a qual reconhecidamente não expressa TRPV1, e a de macrófagos derivados da medula óssea de animais C57BL6 (BMDM's), a qual expressa o referido receptor.

Linhagem RAW 264.7

7.8.1 Receptores de influxo de colesterol: CD36 e SR-A

7.8.1.1 Expressão de CD36 de superfície e conteúdo intracelular de LDL

Em células RAW 264.7, cultivadas na presença de LDLox, o pré-tratamento com Caps reduziu de forma significativa as populações CD36-/Dil+ e CD36+/Dil+, o que sugere uma redução da captação de LDLox (Fig. 19).

Apesar da redução da população duplo positiva, o tratamento com Caps aumentou a população simples positiva para CD36, já que induziu a migração de células do quadrante 2 (Q2) para o quadrante 1 (Q1). Assim, células que antes eram positivas

para os dois marcadores, após o tratamento com Caps, continuaram a expressar CD36, embora isso não se tenha traduzido em aumento do conteúdo de LDL intracelular. Ao se analisar a soma de todas as células positivas para esse marcador (populações CD36+/Dil- e CD36+/Dil+), pode-se notar que o tratamento com Caps induziu um aumento da expressão desse receptor (Fig. 19-C), a despeito de uma redução da carga celular de LDLox.

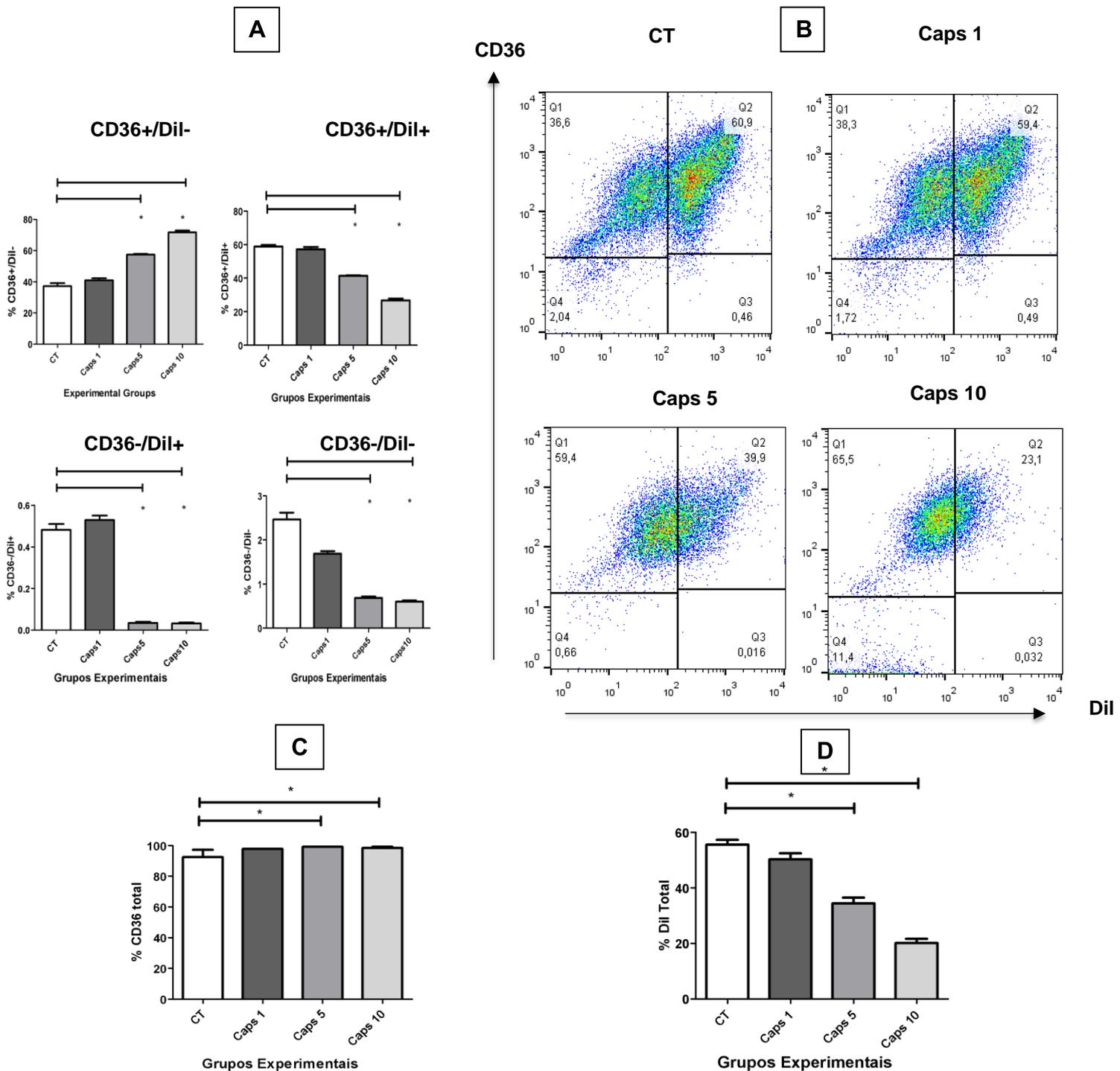


Figura 19: Citometria de fluxo na linhagem celular RAW 264.7 para avaliação das vias de influxo de colesterol: análise da expressão de superfície do receptor scavenger CD36 e do conteúdo intracelular de LDLox marcada com a sonda lipofílica Dil. **A** - % de cada população por quadrante; **B** – Gráficos dot plot representativos para cada grupo. **C** - % total das populações positivas para CD36. **D** - Células Dil+ obtidas nos dois ensaios de influxo. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

7.8.1.2 Expressão de SR-A de superfície e conteúdo intracelular de LDL

O comportamento das células marcadas com SR-A e Dil foi semelhante àquele já observado para células marcadas com CD36 (Fig. 20): Caps reduziu as populações positivas para Dil (SR-A-/Dil+ e SR-A+/Dil+), indicativo de diminuição do conteúdo de LDL celular, enquanto induziu uma migração celular de Q2 para Q1, levando a um aumento da população simples positiva para SR-A (SR-A+/Dil-). A análise da Fig. 20-C demonstra que o tratamento com Caps provocou um aumento da porcentagem de células expressando SR-A, a exemplo do que ocorreu pra CD36.

Ou seja, embora essas células apresentem um aumento na expressão dos receptores scavenger de superfície, Caps levou a uma redução do conteúdo celular de LDLox nessas culturas (Fig. 19-D). Os dados sugerem assim que, na linhagem celular RAW 264.7, o efeito de Caps em atenuar a carga lipídica intracelular não se dá pela regulação das vias de influxo, mas provavelmente pelas de efluxo de colesterol.

7.8.2 Receptores de efluxo de colesterol: ABCA1 E ABCG1

7.8.2.1 Expressão de ABCA1 de superfície e conteúdo de LDLox intracelular

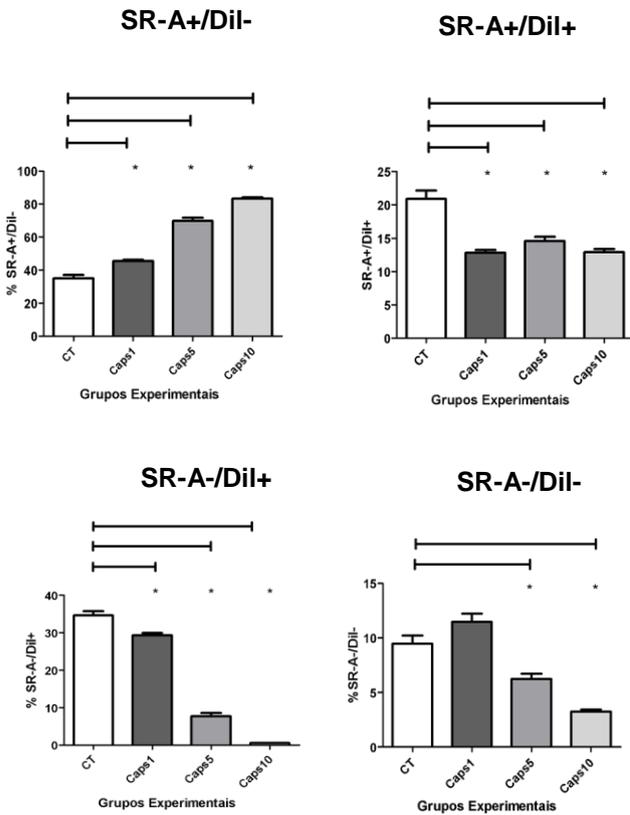
Caps não alterou a população ABCA1+/Dil-, mas provocou um incremento da população duplo positiva (ABCA1+/Dil+), ao mesmo tempo em que reduziu a população ABCA1-/Dil+ (Fig. 21).

Logo, Caps gerou uma migração da população celular de Q3 (população ABCA1-/Dil+) para Q2 (ABCA1+/Dil), induzindo a expressão de ABCA1 em células que antes eram, em sua maioria, positivas apenas para Dil.

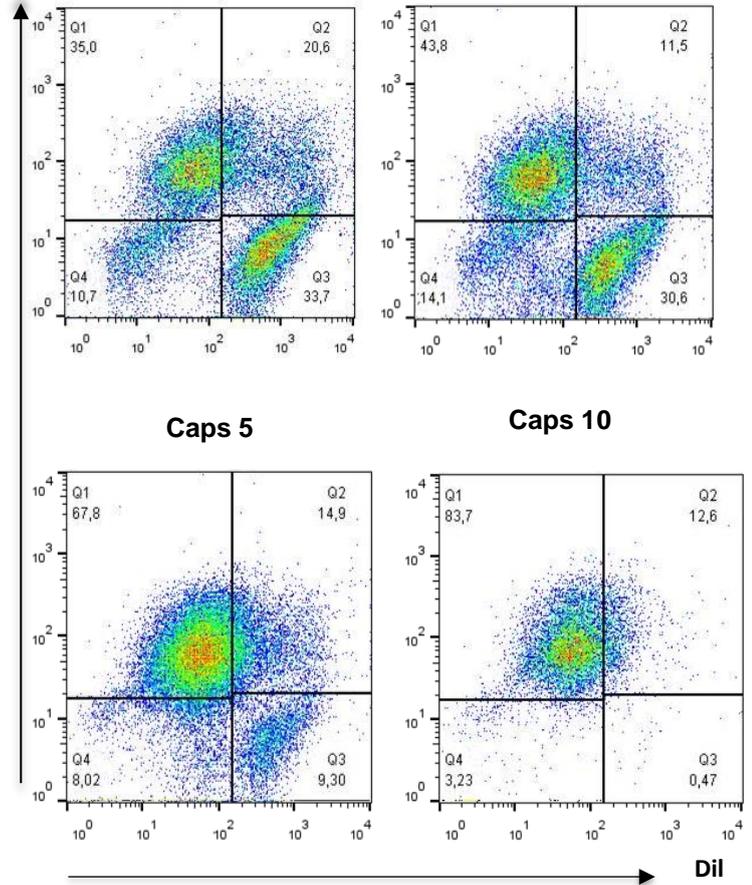
Ao se analisar a porcentagem total de células expressando ABCA1, nota-se que o tratamento com Caps induziu um aumento da ordem de duas vezes nesse parâmetro (Fig. 21-C), ao mesmo tempo em que reduziu o conteúdo intracelular de LDLox-Dil (Fig. 21-D).

A

B



SR-A



C

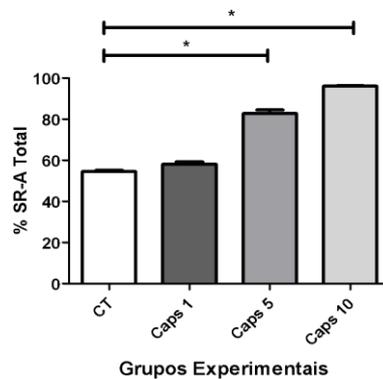


Figura 20: Citometria de fluxo na linhagem celular RAW 264.7 para avaliação das vias de influxo de colesterol: análise da expressão de superfície do receptor scavenger SR-A e do conteúdo intracelular de LDLox marcada com a sonda lipofílica Dil. **A** - % de cada população por quadrante; **B** - Gráficos dot plot representativos para cada grupo. **C** - % total das populações positivas para SR-A. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

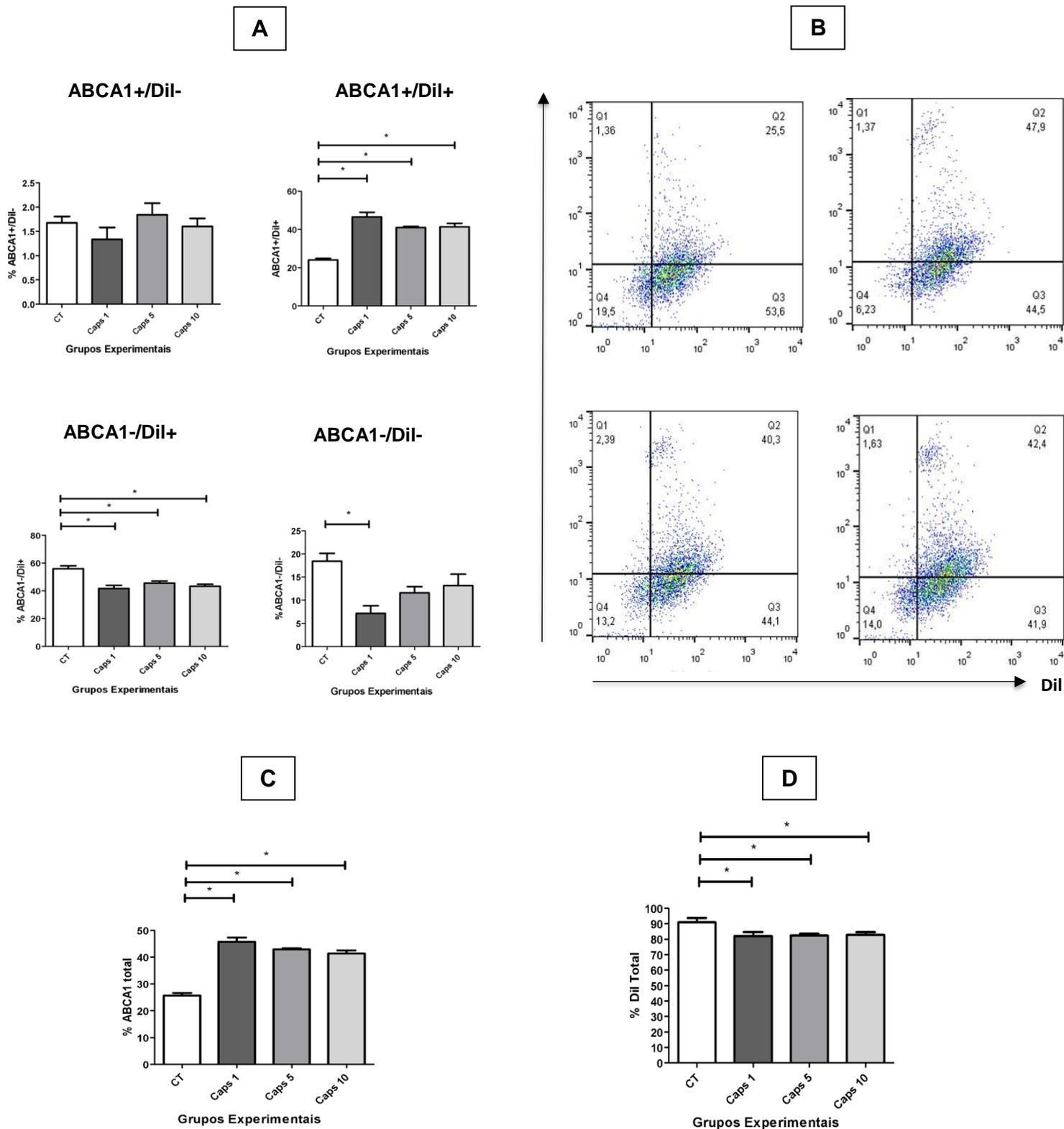


Figura 21: Citometria de fluxo na linhagem celular RAW 264.7 para avaliação das vias de efluxo de colesterol: análise da expressão de superfície do receptor cassete ABCA1 e do conteúdo intracelular de LDLox marcada com a sonda lipofílica DiI. **A** - % de cada população por quadrante; **B** – Gráficos dot plot representativos para cada grupo. **C** - % total das populações positivas para ABCA1. **D** - Células DiI+ obtidas nos dois ensaios de efluxo. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

7.8.2.2 Expressão de ABCG1 de superfície e conteúdo de LDLox intracelular

Nesse caso, verifica-se que Caps gerou um aumento tanto na população simples positiva para ABCG1 (ABCG1+/Dil-), quanto na duplo positiva (ABCG1+/Dil+). Ao mesmo tempo, provocou uma diminuição da população ABCG1-/Dil+ (Fig. 22). Nota-se ainda um aumento da população duplo negativa (ABCG1-/Dil-), dados sugestivos de uma indução da expressão de ABCG1 por Caps. Além disso, em células expostas ao pré-tratamento com esse composto, percebe-se um aumento na porcentagem de células expressando esse receptor cassete de efluxo, tal como ocorreu em relação à ABCA1.

Desse modo, ao se avaliar os receptores de efluxo na linhagem RAW 264.7, observa-se que Caps provocou um aumento tanto na expressão de ABCA1 como na de ABCG1 e também reduziu o conteúdo celular de LDLox. Esses resultados, analisados em conjunto, indicam que, na linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7, Caps pode contribuir para modular a formação de células espumosas via indução da expressão de receptores de efluxo de colesterol. Os dados também sugerem que, nessas células, essa ação de Caps é independente da ativação de TRPV1, uma vez que esse receptor não é expresso nessa linhagem celular.

7.8.2.3 Expressão de receptores de Efluxo em culturas tratadas com antagonista de PPAR γ (GW9662)

Tendo em vista que o efeito de Caps no efluxo de colesterol se dá de forma independente de sua ligação a TRPV1, nosso próximo passo foi investigar a participação de PPAR γ , outro possível receptor ativado por Caps, nesse processo. Para tanto, utilizou-se o antagonista seletivo de PPAR γ , GW9662, e avaliou-se novamente o papel de Caps na expressão de ABCA1 e ABCG1 de superfície.

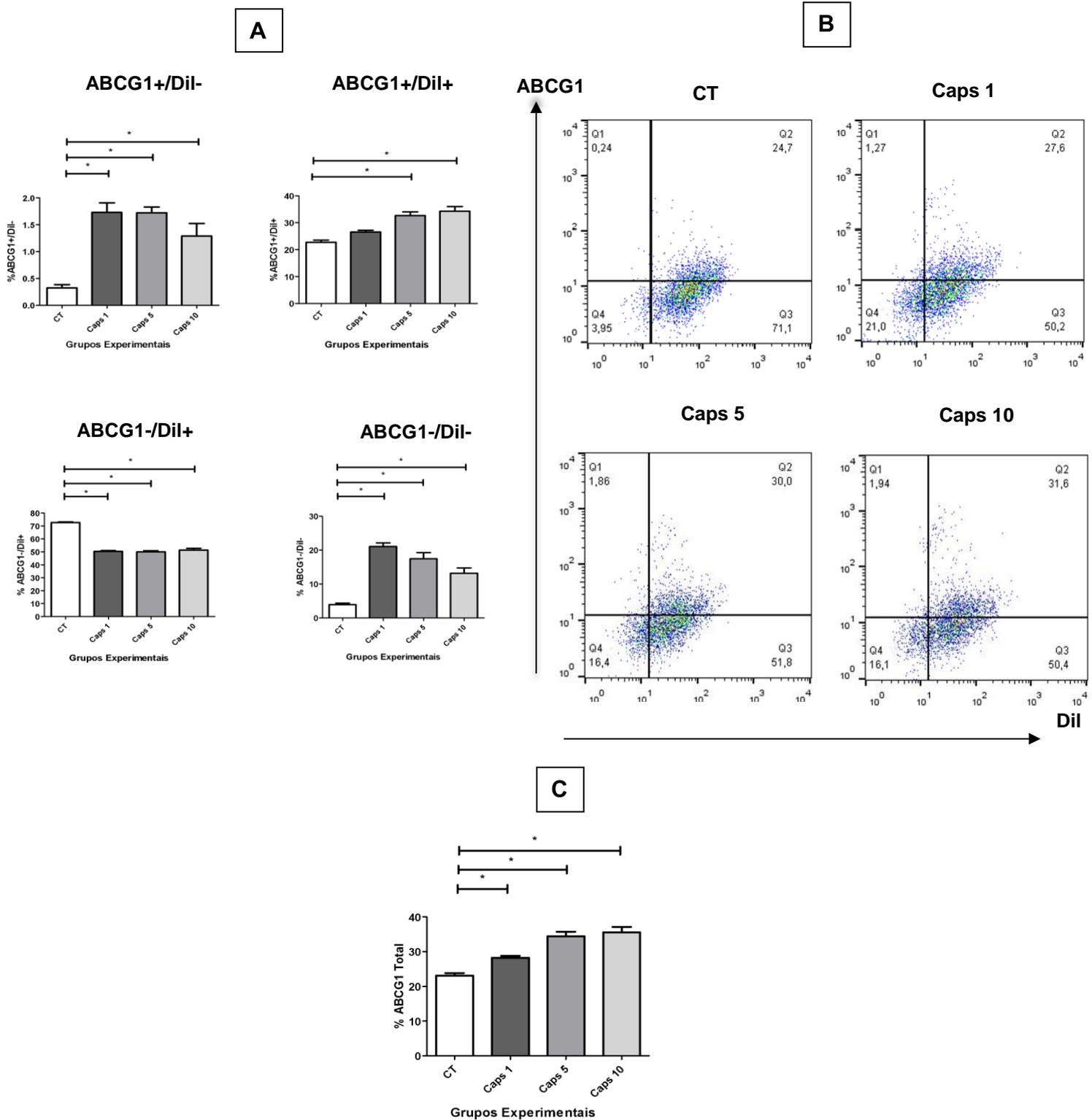
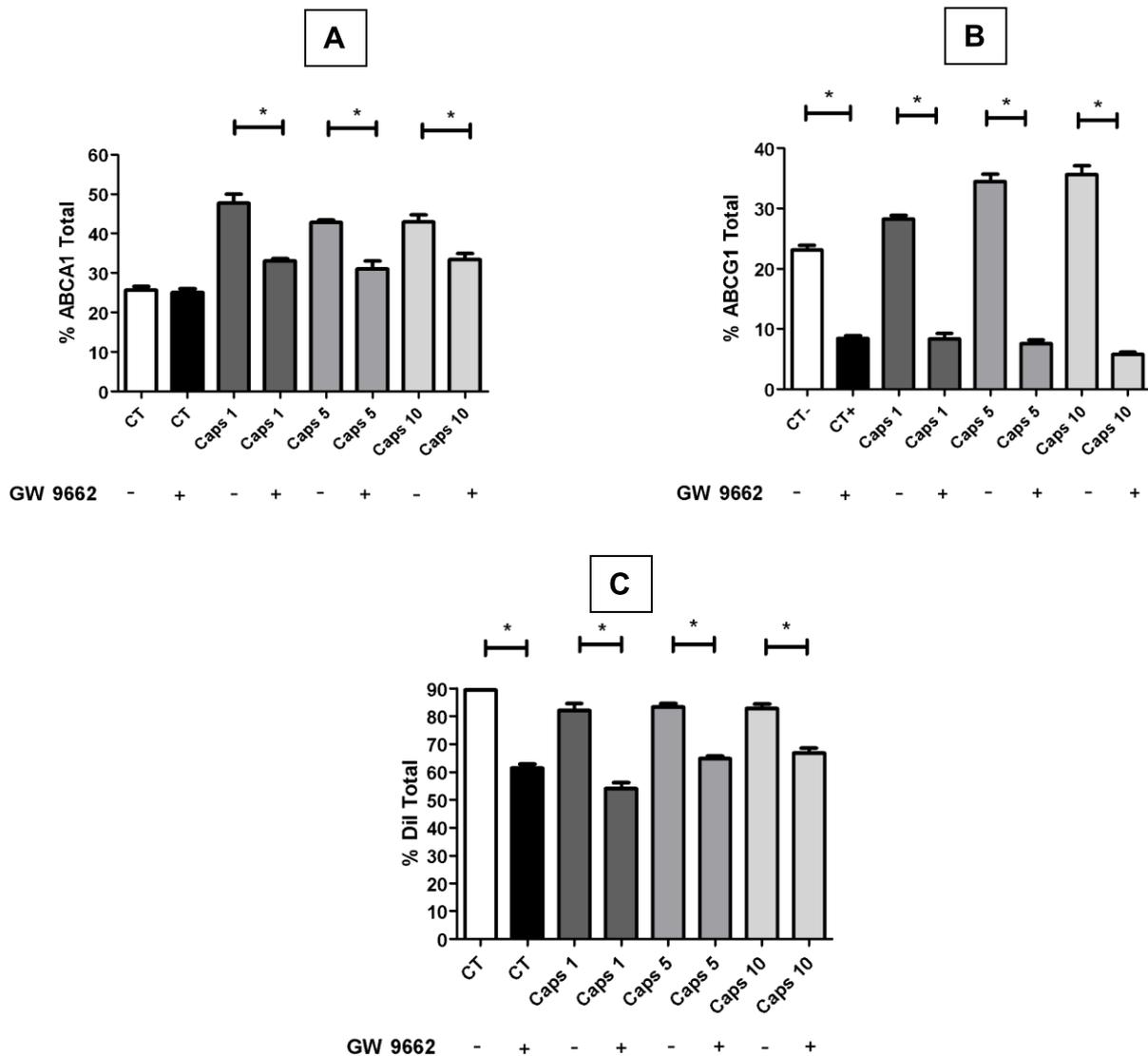


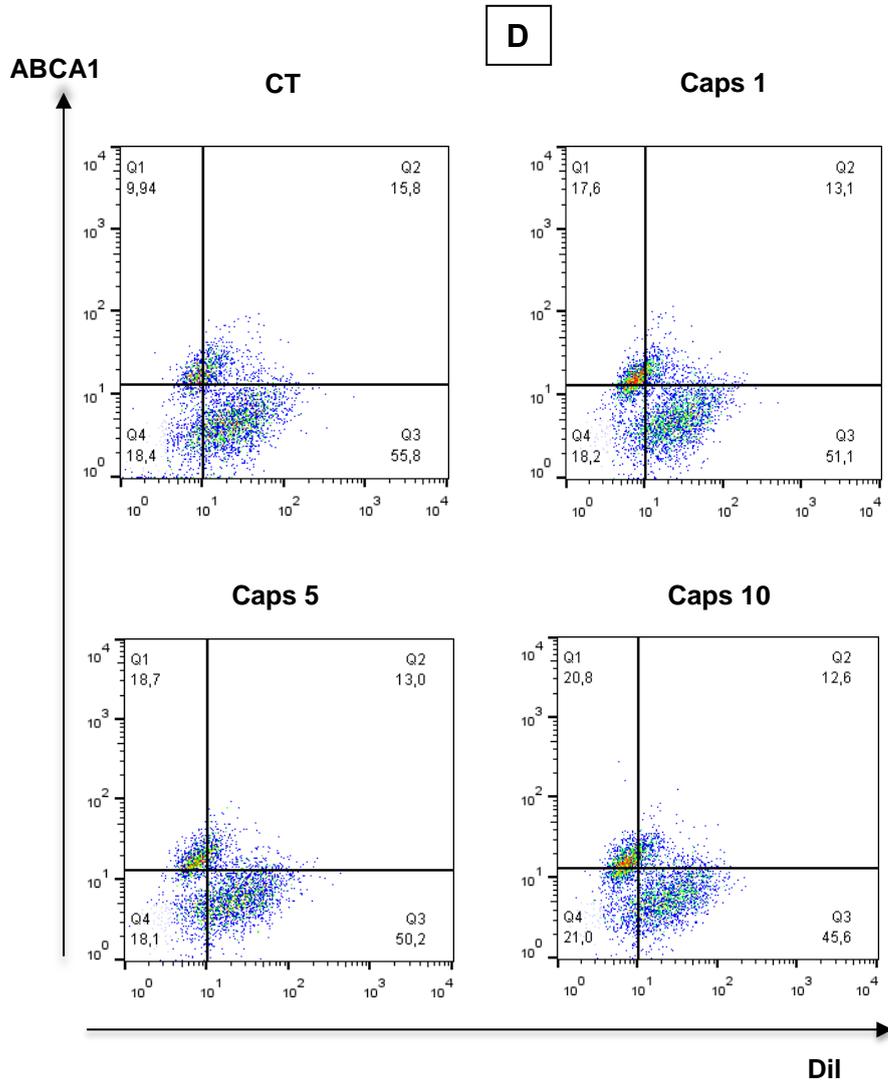
Figura 22: Citometria de fluxo na linhagem celular RAW 264.7 para avaliação das vias de efluxo de colesterol: análise da expressão de superfície do receptor cassete ABCG1 e do conteúdo intracelular de LDLox marcada com a sonda lipofílica Dil. **A** - % de cada população por quadrante; **B** – Gráficos dot plot representativos para cada grupo. **C** - % total das populações positivas para ABCG1. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

7.8.2.4 Comparação entre expressão de receptores de efluxo e teor de LDL intracelular em células sem e com antagonista de PPAR γ (GW9662)

A comparação das culturas tratadas com Caps na presença ou ausência de GW9662 revela que o antagonismo da ação de PPAR γ reverte o efeito desse composto em induzir tanto a expressão de ABCA1 (Fig. 23-A) como a de ABCG1 (Fig. 23-B). No primeiro, a reversão é parcial; já no segundo, há reversão total: os níveis de ABCG1 nos grupos tratados são semelhantes àqueles apresentados pelo grupo CT, onde não há ação de Caps.

Apesar de os dados mostrarem o envolvimento da via PPAR γ na indução da expressão de receptores de efluxo mediada por Caps, com o antagonismo desse receptor nuclear observou-se uma redução no conteúdo celular de LDLox-Dil em todos os grupos, inclusive no controle (Fig. 23-C).





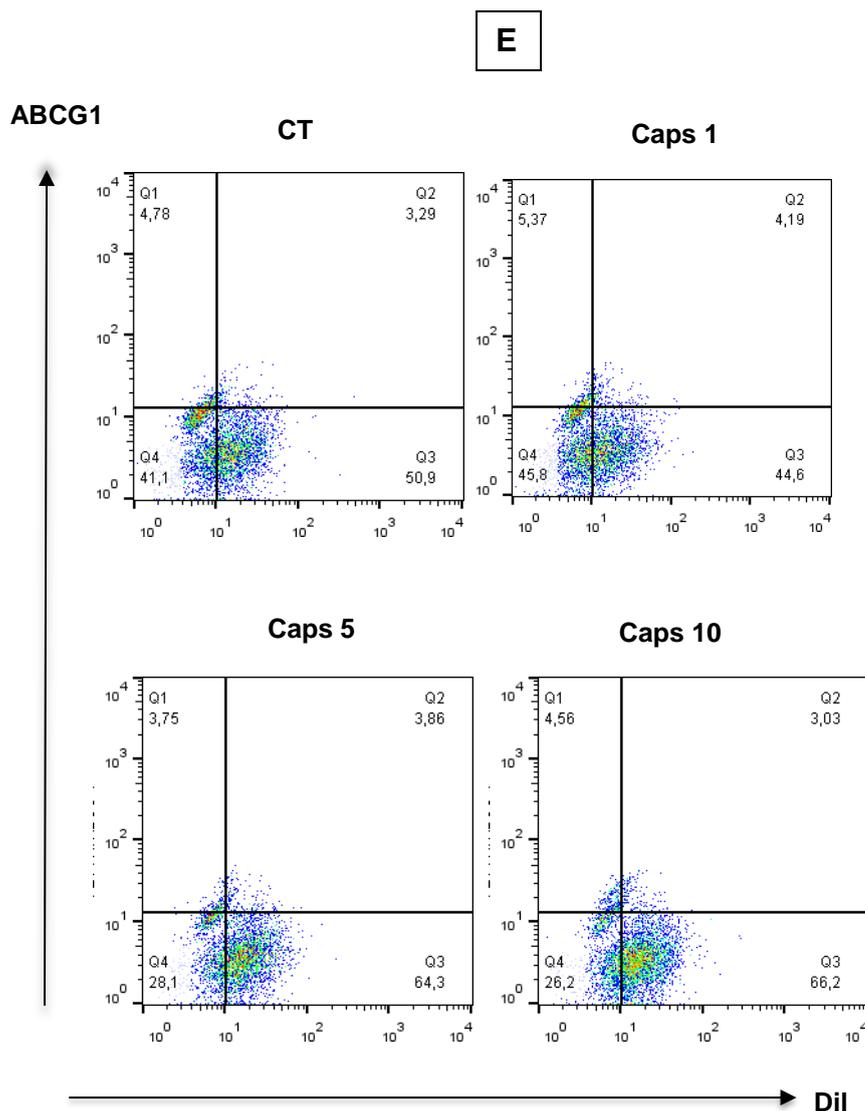


Figura 23: Citometria de fluxo na linhagem celular RAW 264.7 para avaliação das vias de efluxo de colesterol em culturas tratadas ou não com antagonista de PPAR γ (GW9662). **A** - Comparação da % total das populações positivas para ABCA1, em culturas com e sem GW9662; **B** - Comparação da % total das populações positivas para ABCG1, em culturas com e sem GW9662; **C** - Comparação da % total de células Dil+ obtidas nos dois ensaios de efluxo, em culturas com e sem GW9662; **D**- Gráficos dot splot representativos para células estimuladas com LDLox-Dil e expostas a GW9662 marcadas com anticorpo anti-ABCA1; **E** – Gráficos dot splot representativos para células estimuladas com LDLox-Dil e expostas a GW9662 marcadas com anticorpo anti-ABCG1. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

Células BMDM

Buscando-se avaliar se, em células que expressam TRPV1, esse receptor transmembrana poderia exercer qualquer papel na regulação das vias de influxo e/ou efluxo de colesterol, e se, mesmo em sua presença, Caps continuaria exercendo alguma ação através de PPAR α , investigou-se o efeito desse fitoquímico na expressão de receptores de influxo CD36 e SR-A, bem como nos de efluxo ABCA1 e ABCG1, na presença e/ou ausência de atividades de TRPV1 ou PPAR α , com o propósito de determinar a possível capacidade de Caps em estimular cada uma dessas vias metabólicas, bem como a relevância de cada uma delas na regulação das vias de influxo e efluxo de colesterol em células que expressam ambas as proteínas.

7.8.3 Receptores de influxo de colesterol: CD36 e SR-A

7.8.3.1 Expressão de CD36 de superfície e conteúdo intracelular de LDL

A presença de TRPV1 ativo mudou o perfil celular da linhagem BMDM, em comparação à RAW 264.7, a qual não expressa esse receptor (Fig. 19). Em macrófagos derivados da medula óssea, o tratamento com Caps não apenas deixou de ocasionar um aumento na população CD36+/Dil-, como até acarretou uma redução populacional, no grupo Caps 10 (Fig. 24).

Além disso, conquanto tenha sido possível observar-se uma redução da população duplo marcada CD36+/Dil+, isso não se deu pelo aumento simultâneo da população CD36+/Dil-, como visto anteriormente em células RAW 264.7, mas pelo aumento da população duplo negativa. Ademais, pela análise da Fig. 24-C, nota-se que o tratamento com Caps não induziu aumento na expressão de CD36, a exemplo do que ocorreu na linhagem RAW264.7 e provocou até mesmo uma redução da expressão desse receptor, como visto no grupo tratado com 10 μ M de Caps. Ademais, nota-se que o tratamento continuou sendo efetivo em reduzir a carga lipídica celular.

Esses dados sugerem que a ativação de TRPV1 por Caps pode provocar uma redução na captação de LDL em decorrência do menor conteúdo de CD36 de superfície observado nessas células.

7.8.3.2 Expressão de SR-A de superfície e conteúdo intracelular de LDL

Em relação ao scavenger SR-A, a presença de TRPV1 também provocou mudanças no perfil celular semelhantes às demonstradas para CD36, quando se compara com as células sem TRPV1 (Fig. 20). Em macrófagos derivados da medula

óssea, o tratamento com Caps continuou a estimular uma redução da população duplo positiva (SR-A+/Dil+), sem provocar, no entanto, um aumento simultâneo na população SR-A+/Dil-, como visto na linhagem RAW 264.7. Na realidade, pode-se observar que uma proporção muito pequena das células encontra-se em Q1 (Fig. 25). Além disso, é possível perceber que uma parte considerável das mesmas é negativa para ambos os marcadores. Destaca-se ainda que o tratamento com Caps levou a uma redução do número de células expressando SR-A (Fig. 25-C), ao contrário do que se notou na linhagem RAW 264.7 (Fig. 20-C).

Juntos, esses dados pressupõem que a presença de TRPV1 ativo impede o aumento do conteúdo de receptores scavenger de superfície observado em células sem a expressão desse canal transmembrana, sugerindo uma regulação da captação de LDLox por Caps via TRPV1, possivelmente pela modulação dos níveis celulares de receptores de influxo CD36 e SR-A.

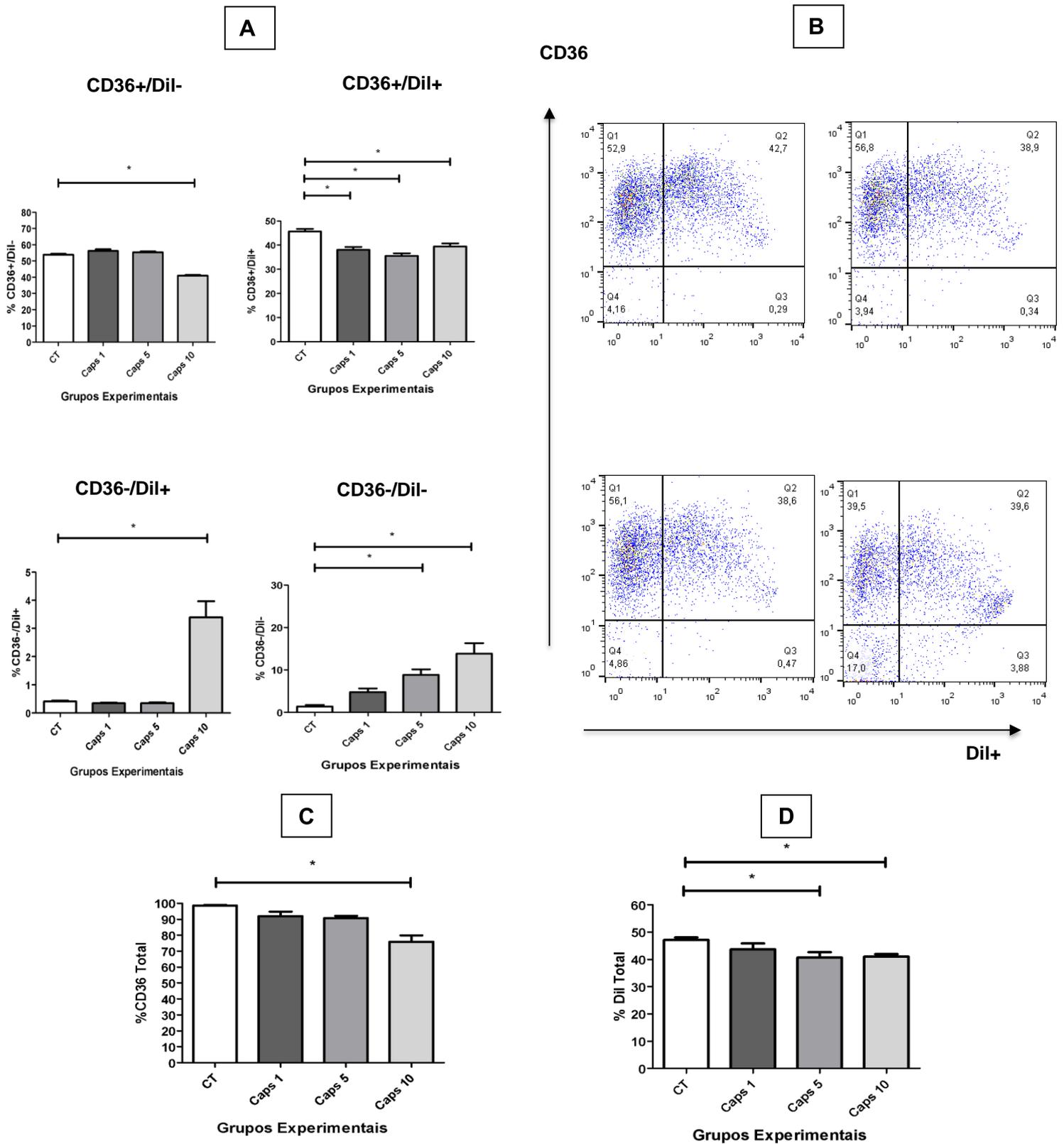
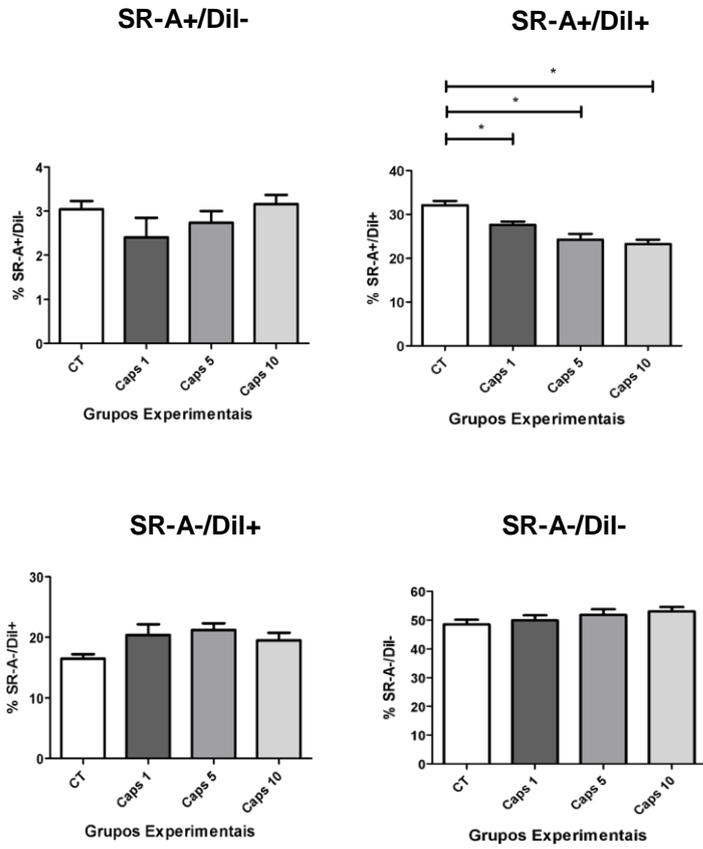
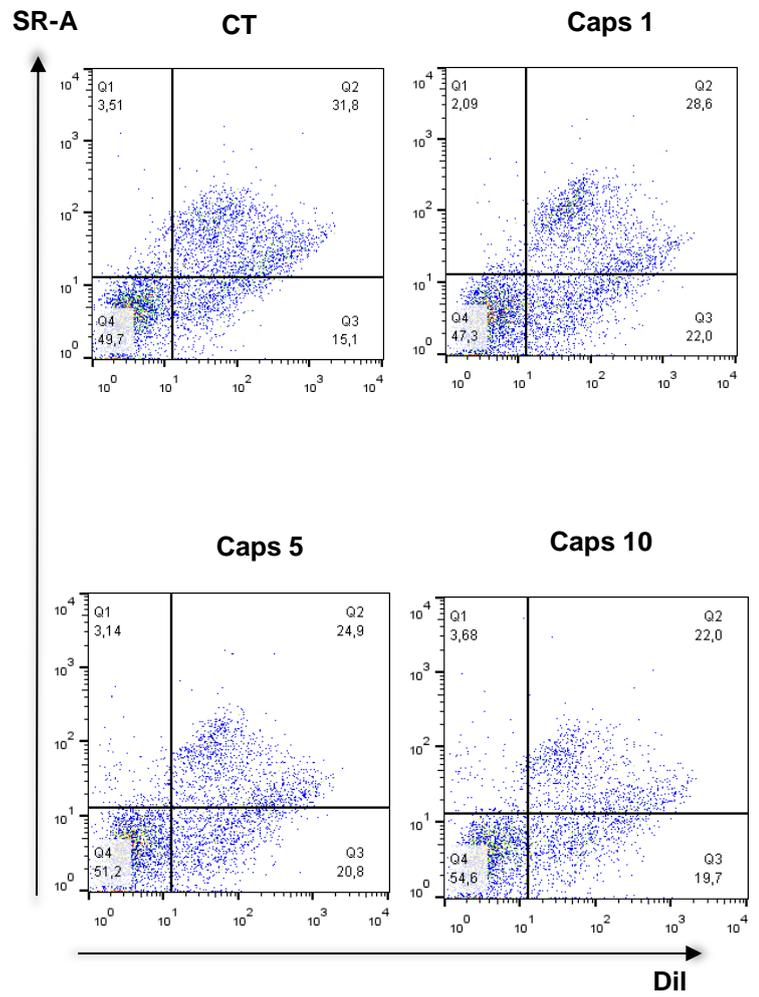


Figura 24: Citometria de fluxo em células BMDM's para avaliação da expressão de CD36 e do teor celular de LDLox marcada com a sonda lipofílica Dil: **A** - % de cada população por quadrante; **B** – Gráficos dot plot representativos para cada grupo; **C** - % total das populações positivas para CD36. **D** - Células Dil+ obtidas nos dois ensaios de influxo. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

A



B



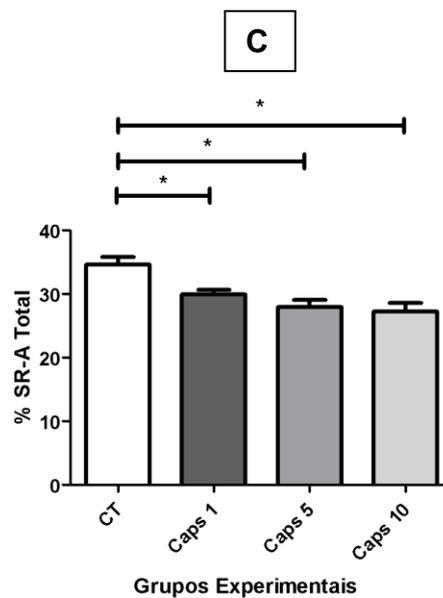


Figura 25: Citometria de fluxo em células BMDM's para avaliação da expressão de SR-A e do teor celular de LDLox marcada com a sonda lipofílica Dil: **A** - % de cada população por quadrante; **B** – Gráficos dot plot representativos para cada grupo; **C** - % total das populações positivas para SR-A. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

Expressão de receptores de Influxo em culturas tratadas com antagonista de TRPV1 (CZE)

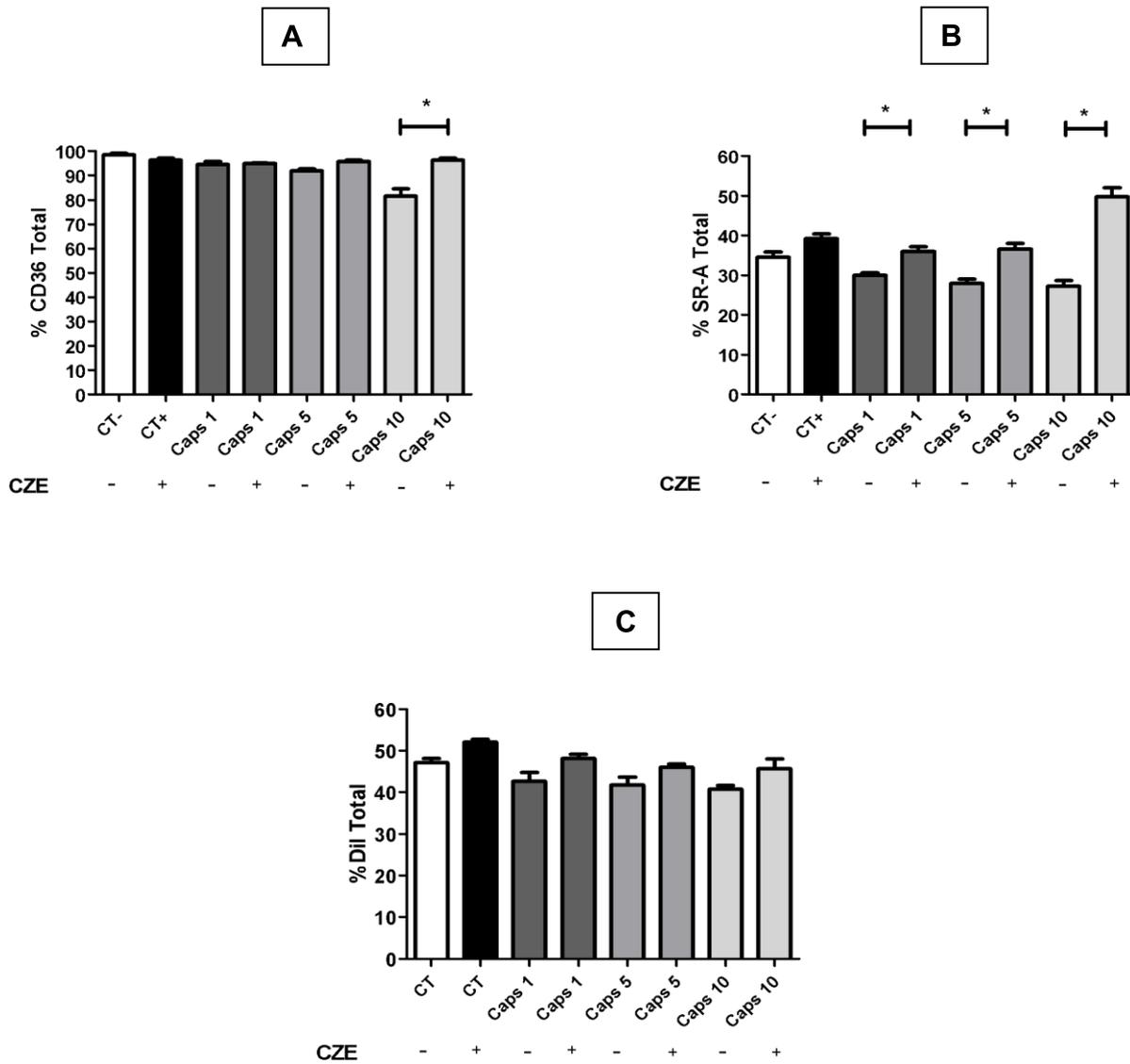
Com o intuito de confirmar o papel de TRPV1 nas vias de influxo de colesterol mediadas por CD36 e SR-A, foram investigados os efeitos de Caps nessas vias, em culturas tratadas com antagonista de TRPV1: capsazepina.

7.8.3.3. Comparação entre teor total de receptores de influxo e LDL intracelular em células com e sem a presença do antagonista de TRPV1 (CZE)

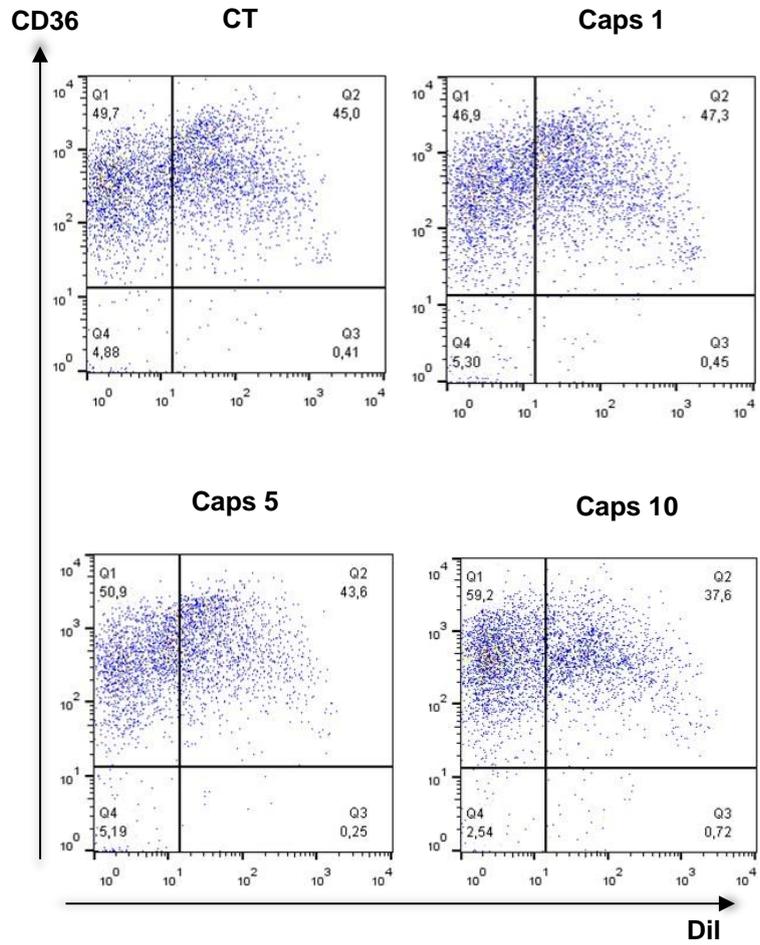
Com a adição de CZE, o efeito de Caps em mediar uma redução na expressão de CD36 e SR-A de superfície, como visto anteriormente em células derivadas da medula óssea sem qualquer antagonismo de TRPV1, é revertido (Fig. 26). É possível até mesmo notar um aumento do conteúdo proteico de SR-A, no tratamento com 10 μ M de Caps (Fig.26-B).

A despeito disso, não se percebe diferença quanto aos níveis celulares de LDLox-Dil nas culturas com e sem antagonismo de TRPV1, o que sugere que, na falta de atividade desse receptor, Caps ainda pode modular a carga de colesterol celular pela

ativação de vias de efluxo que independem da sinalização mediada por TRPV1, como já demonstrado na linhagem celular RAW 264.7.



D



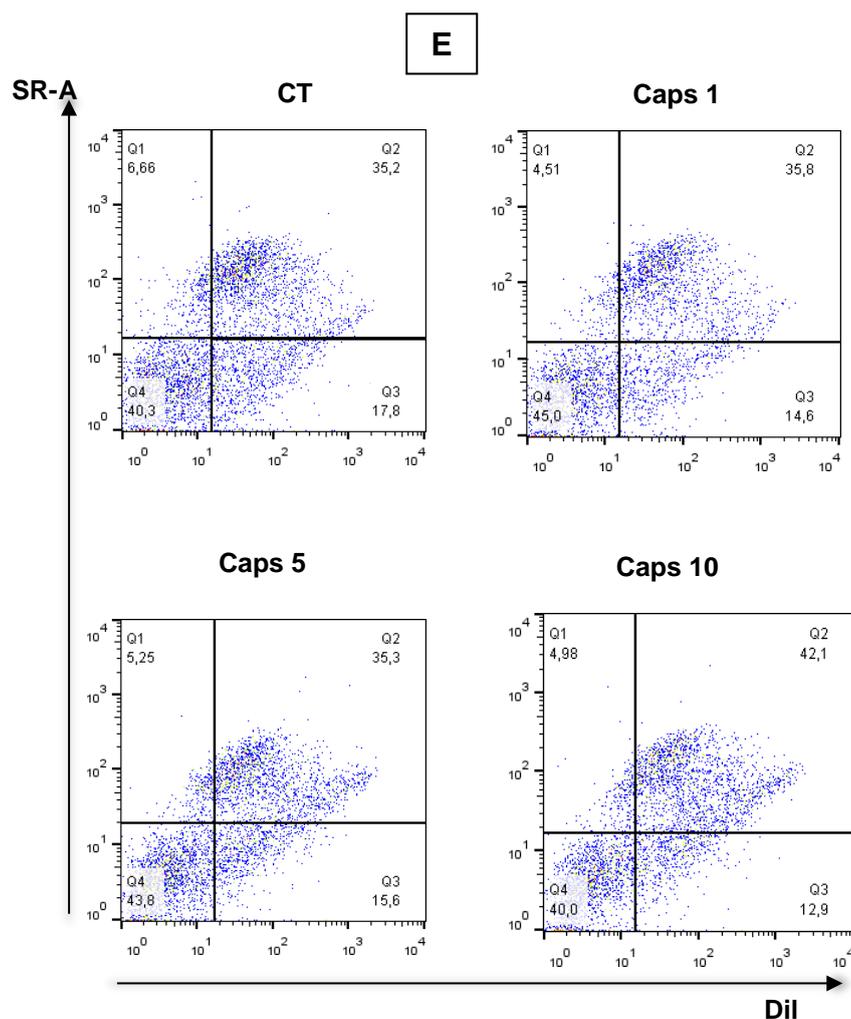


Figura 26: Citometria de fluxo na linhagem celular BMDM para avaliação das vias de influxo de colesterol em culturas tratadas ou não com antagonista de TRPV1 (CZE). **A** - Comparação da % total das populações positivas para CD36, em culturas com e sem CZE; **B** - Comparação da % total das populações positivas para SR-A, em culturas com e sem CZE; **C** - Comparação da % total de células Dil+ obtidas nos dois ensaios de influxo, em culturas com e sem CZE; **D** - Gráficos dot splot representativos para células estimuladas com LDLox-Dil e expostas a CZE marcadas com anticorpo anti-CD36; **E** - Gráficos dot splot representativos para células estimuladas com LDLox-Dil e expostas a CZE marcadas com anticorpo anti-SR-A. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

Expressão de receptores de Influxo em culturas tratadas com antagonista de PPAR γ (GW9662)

Com o objetivo de avaliar se PPAR γ poderia interferir nas vias de influxo de colesterol, investigaram-se os efeitos de Caps nessas vias em culturas tratadas com o antagonista de PPAR γ (GW9662).

7.8.3.4. Comparação entre teor total de receptores de influxo em células com e sem a presença do antagonista de PPAR γ (GW9662)

A Fig. 27 demonstra claramente que a falta de atividade de PPAR γ contribui de forma marcante para reduzir a porcentagem de células expressando tanto CD36 como SR-A, já que esse é um efeito visto em todos os grupos, inclusive nos CT.

A análise conjunta de todos os dados que investigaram a atuação de Caps e o papel de cada via metabólica por ela induzida no influxo de colesterol permite concluir que esse composto pode atuar tanto via TRPV1 quanto via PPAR γ . Enquanto o primeiro está relacionado à redução da expressão dos receptores scavenger de influxo CD36 e SR-A e, conseqüentemente, ao controle da captação de LDLox, o último não exerce qualquer papel na modulação dessas vias celulares de influxo, podendo provocar até mesmo uma indução da captação celular de colesterol por estimular a expressão tanto de CD36 como de SR-A.

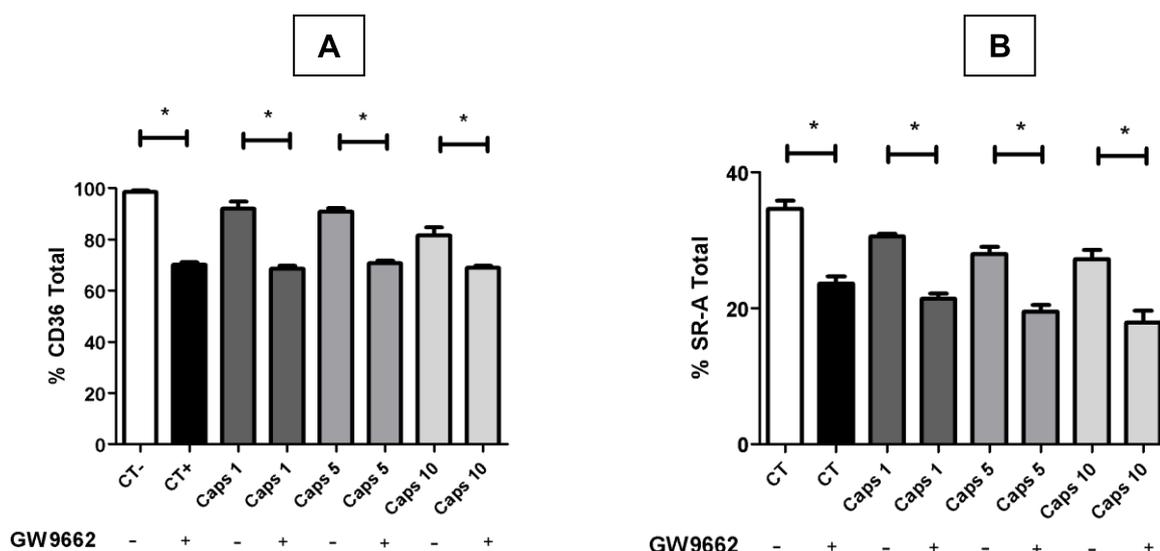


Figura 27: Citometria de fluxo na linhagem celular BMDM para avaliação das vias de influxo de colesterol em culturas tratadas ou não com antagonista de PPAR γ (GW9662). **A** - Comparação da % total das populações positivas para CD36, em culturas com e sem GW9662; **B** - Comparação da % total das populações positivas para SR-A, em culturas com e sem GW9662.

7.8.4 Conteúdo de receptores de efluxo de colesterol: ABCA1 e ABCG1

Apesar de os dados disponíveis até aqui já demonstrarem que, na presença de TRPV1, Caps pode atuar na modulação da formação de células espumosas pela regulação do influxo de colesterol, como na linhagem celular RAW 264.7, verificou-se também um efeito estimulatório desse fotoquímico nas vias de efluxo celular, a fim de melhor esclarecer o papel de cada via (TRPV1 ou PPAR γ) no efluxo de colesterol, investigou-se, em seguida, a expressão dos receptores cassete de efluxo ABCA1 e ABCG1 em células derivadas da medula óssea, na presença ou não dos antagonistas de TRPV1 ou PPAR γ .

7.8.4.1 Expressão de ABCA1 de superfície e conteúdo intracelular de LDL

Inicialmente, avaliou-se o efeito de Caps na expressão de ABCA1 e ABCG1 em culturas com TRPV1 e PPAR γ totalmente funcionais.

A Fig. 28 mostra o efeito de Caps em células derivadas da medula óssea marcadas com ABCA1 e estimuladas com LDLox-Dil. Nessas células, Caps, nas concentrações de 5 e 10 μ M, induziu uma migração da população ABCA1-/Dil+ (em Q3) em direção a Q1 e Q2, o que levou a um aumento da população celular simples positiva para ABCA1 (ABCA1+/Dil-) e também da duplo marcada (ABCA1+/Dil+). Esse resultado sugere um efeito estimulatório de Caps na expressão desse receptor de efluxo.

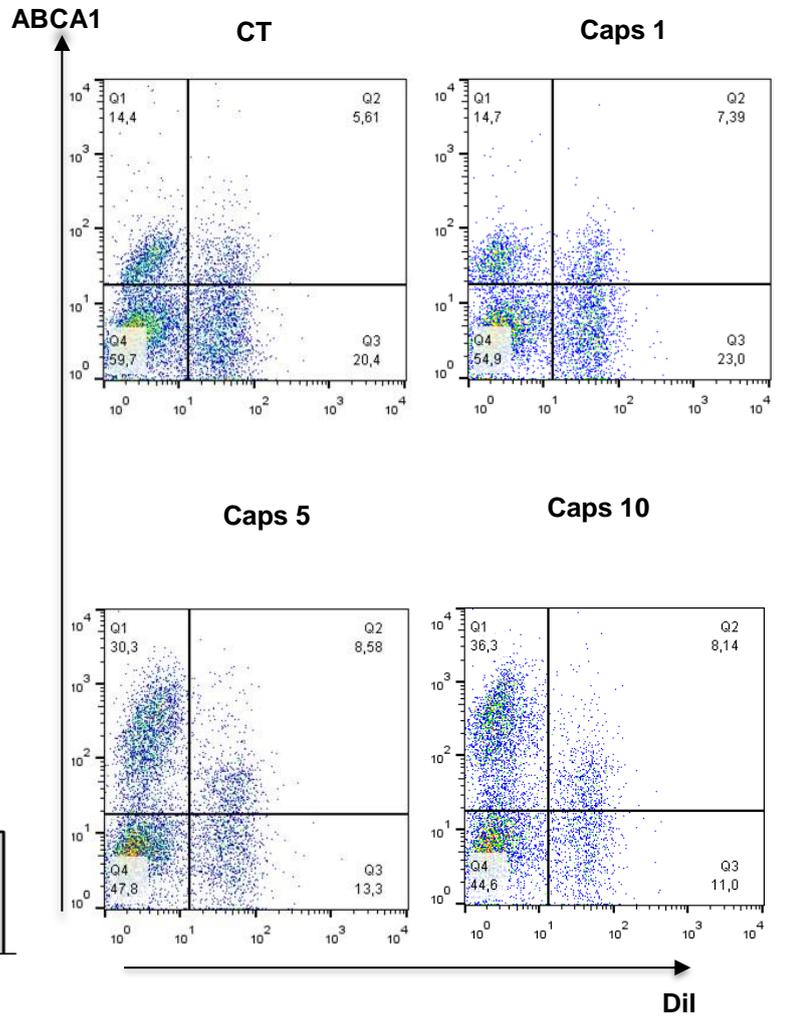
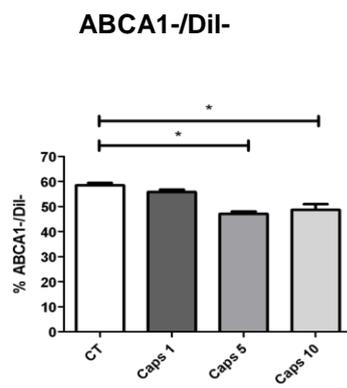
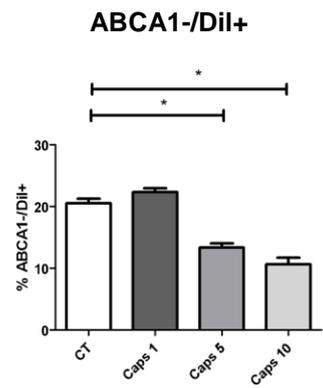
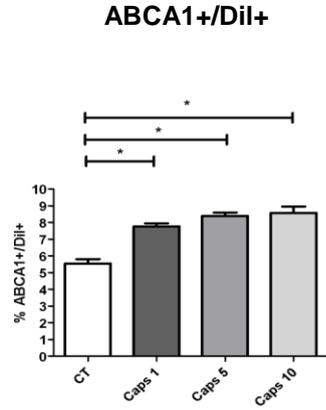
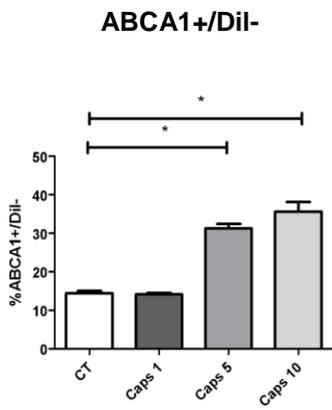
Ao mesmo tempo em que sinalizam serem capazes de aumentar a expressão de ABCA1, os grupos Caps 5 e Caps 10 reduzem a população simples positiva para Dil (ABCA1-/Dil+).

É possível perceber ainda um percentual significativo de células sem qualquer marcação (ABCA1-/Dil-), as quais não estão captando LDLox, em culturas que expressam, concomitantemente, TRPV1 e PPAR γ , o que não é observado na linhagem RAW 264.7, a qual não expressa TRPV1 e apresenta um percentual bem menor de células sem captar LDLox.

As Fig. 28-C e D confirmam o papel de Caps em induzir a redução da carga celular de LDLox, bem como a sua ação estimulatória em relação a ABCA1 também em células BMDM.

A

B



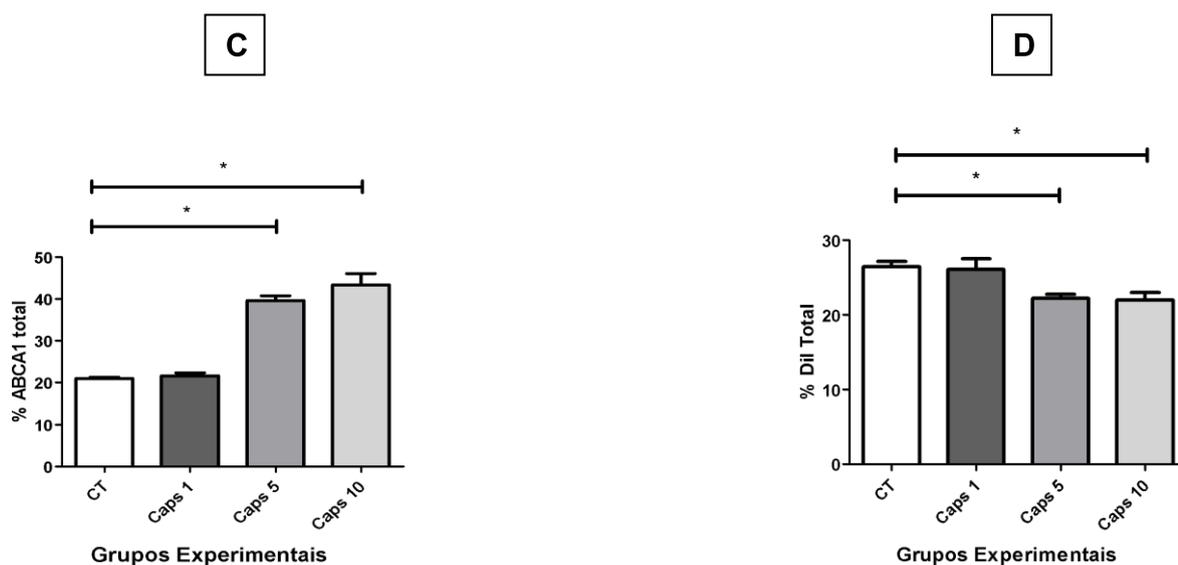


Figura 28: Citometria de fluxo em células BMDM's para avaliação da expressão de ABCA1 e do teor celular de LDLox marcada com a sonda lipofílica Dil: **A** - % de cada população por quadrante; **B** – Gráficos dot plot representativos para cada grupo; **C** - % total das populações positivas para ABCA1. **D** - Células Dil+ obtidas nos dois ensaios de efluxo. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

7.8.4.2 Expressão de ABCG1 de superfície e conteúdo intracelular de LDL

Ao avaliar os efeitos de Caps sobre a expressão de ABCG1 em células BMDM, observa-se que o composto não é capaz de exercer sobre esse receptor cassete de efluxo o mesmo efeito estimulatório demonstrado em relação a ABCA1 (Fig. 29).

Ao contrário, os tratamentos com 5 e 10 μ M reduzem a população ABCG1+/Dil- e não há alteração na população duplo positiva (ABCG1+/Dil+), sendo que na concentração de 1 μ M vê-se até uma redução nesse grupo populacional. Ademais, a análise da Fig. 29-C demonstra claramente que a exposição das células a Caps, em diferentes concentrações, reduz a expressão de ABCG1.

Como esses efeitos são diferentes daqueles encontrados na linhagem RAW 264.7, na qual notou-se um aumento da expressão de ABCG1 após exposição à Caps, pressupõe-se que, em células derivadas da medula, esse composto poderia atuar estimulando o efluxo via ABCA1, provavelmente por vias distintas daquelas já demonstradas na primeira linhagem celular

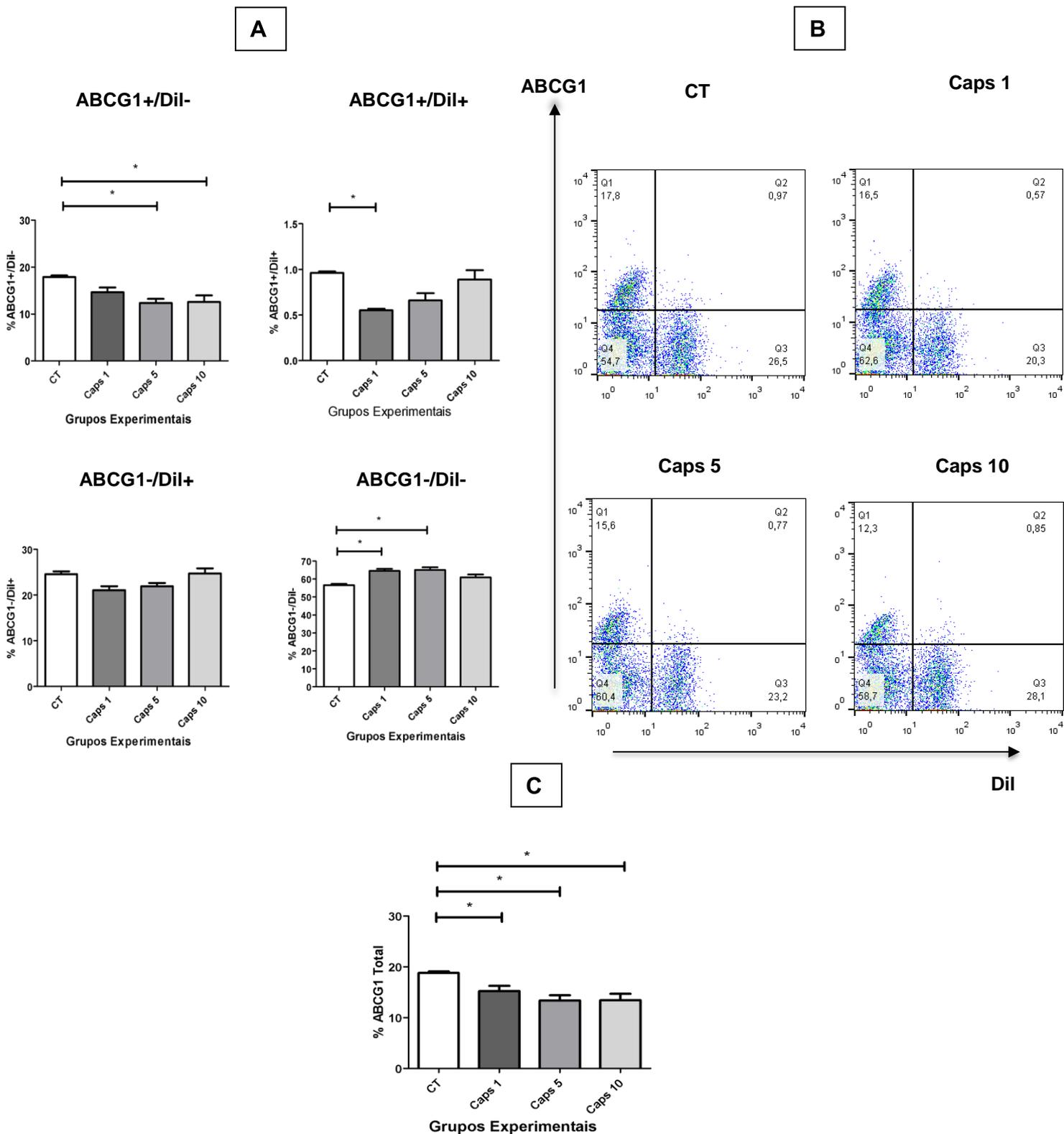


Figura 29: Citometria de fluxo em células BMDM's para avaliação da expressão de ABCG1 e do teor celular de LDLox marcada com a sonda lipofílica Dil: **A** - % de cada população por quadrante; **B** – Gráficos dot plot representativos para cada grupo; **C** - % total das populações positivas para ABCG1. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

Expressão de receptores de Efluxo em culturas tratadas com antagonista de TRPV1 (CZE)

Com o intuito de verificar se TRPV1 poderia estar envolvido na regulação do efluxo de colesterol em células BMDM, investigou-se a expressão de ABCA1 e ABCG1 nessas células previamente expostas à ação do antagonista de TRPV1: CZE.

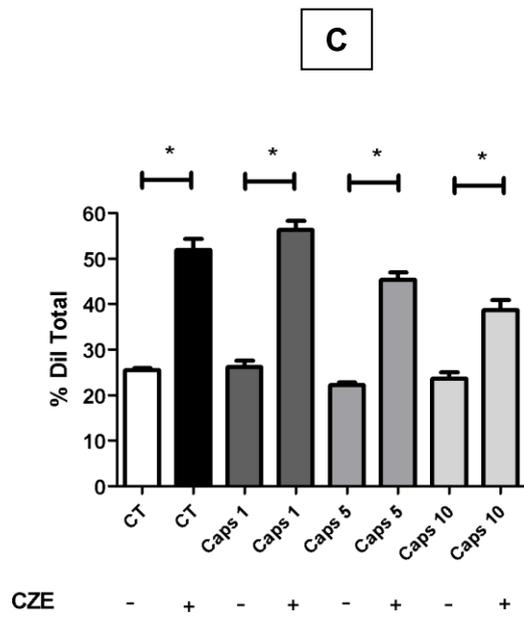
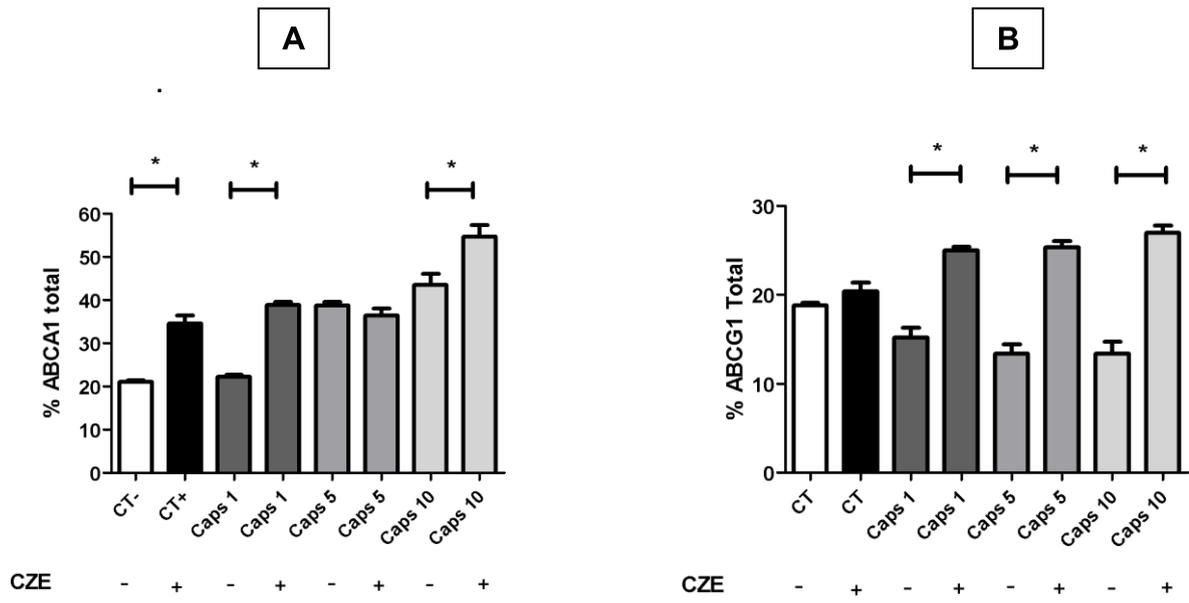
7.8.4.3 Comparação entre teor total de receptores de efluxo e LDL intracelular em células com e sem a presença do antagonista de TRPV1 (CZE)

É possível notar que, mesmo na ausência de atividade de TRPV1, Caps manteve a capacidade em induzir a expressão de ABCA1, efeito que parece ser independente desse fitoquímico, haja vista observar-se um aumento dessa expressão também no grupo não tratado (CT), em relação ao grupo CT da cultura sem antagonismo (Fig. 30-A).

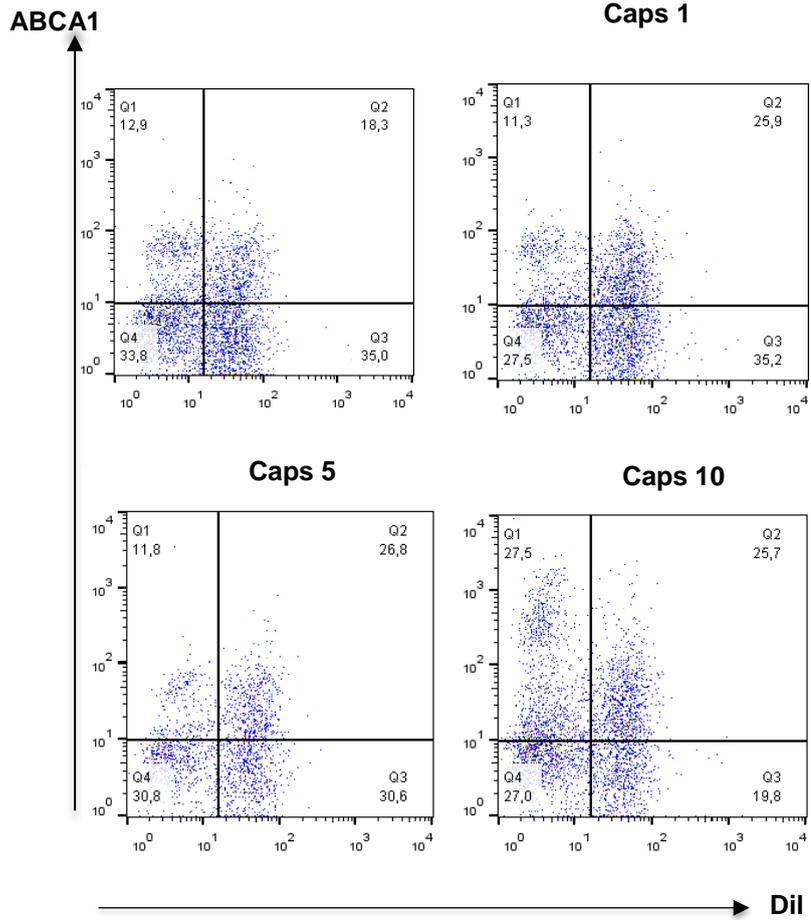
Já em relação a ABCG1, enquanto as células BMDM com TRPV1 funcional demonstraram uma redução do conteúdo proteico desse receptor cassete de efluxo após exposição à Caps, naquelas sem atividade de TRPV1 esse efeito foi revertido, e o composto mostrou-se capaz de provocar um incremento nesses níveis (Fig. 30-B), a exemplo do que foi demonstrado anteriormente na linhagem RAW 264.7.

Todos esses dados sugerem que nas células BMDM, quando TRPV1 não pode ser ativado por Caps, provavelmente esse composto atua via PPAR α , reduzindo a carga celular de LDLox por estimular a expressão de receptores de efluxo de colesterol ABCA1 e ABCG1.

Apesar de, na ausência de atividade de TRPV1, Caps demonstrar capacidade em atuar estimulando as vias de efluxo, é nítido que, nessas células, o teor de LDLox-Dil é consideravelmente maior (Fig. 30-C), dando força à hipótese aqui aventada de que a ativação de TRPV1 por Caps está envolvida na modulação da captação de LDLox por CD36 e SR-A.



D



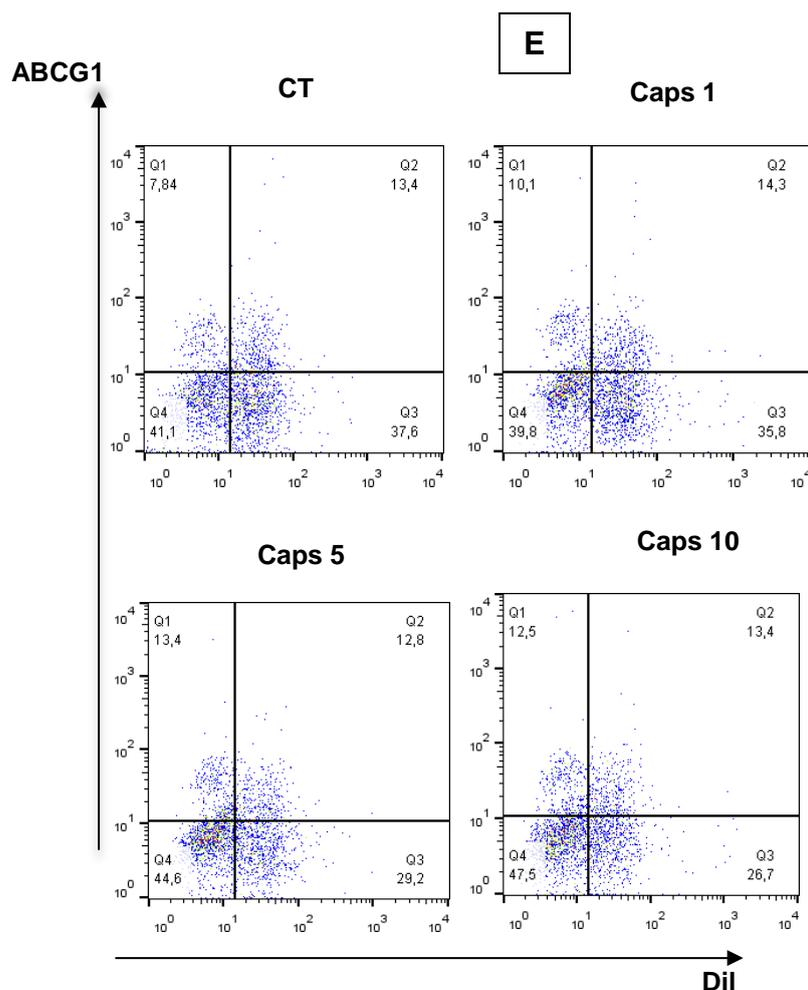


Figura 30: Citometria de fluxo na linhagem celular BMDM para avaliação das vias de efluxo de colesterol em culturas tratadas ou não antagonista de TRPV1 (CZE). **A** - Comparação da % total das populações positivas para ABCA1, em culturas com e sem CZE; **B** - Comparação da % total das populações positivas para ABCG1, em culturas com e sem CZE; **C** - Comparação da % total de células Dil+ obtidas nos dois ensaios de efluxo, em culturas com e sem CZE; **D** - Gráficos dot splot representativos para células estimuladas com LDLox-Dil e expostas a CZE marcadas com anticorpo anti-ABCA1; **E** - Gráficos dot splot representativos para células estimuladas com LDLox-Dil e expostas a CZE marcadas com anticorpo anti-ABCG1. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

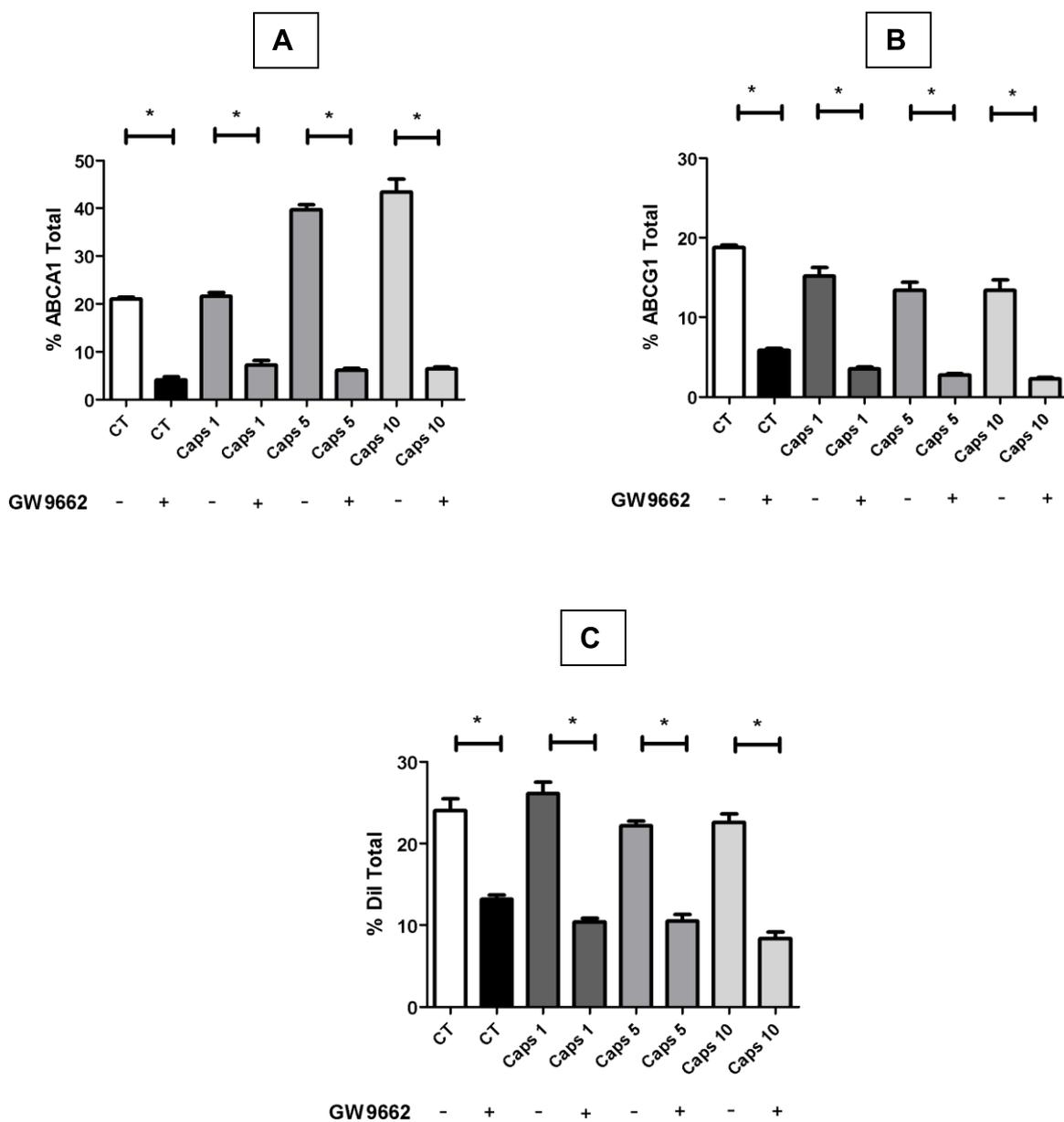
Expressão de receptores de Efluxo em culturas tratadas com antagonista de PPAR γ (GW9662)

Com o propósito de melhor entender o papel de cada via investigada (PPAR γ e TRPV1) no efluxo de colesterol, pesquisou-se o efeito de Caps em células BMDM's previamente expostas ao antagonista do receptor nuclear PPAR γ .

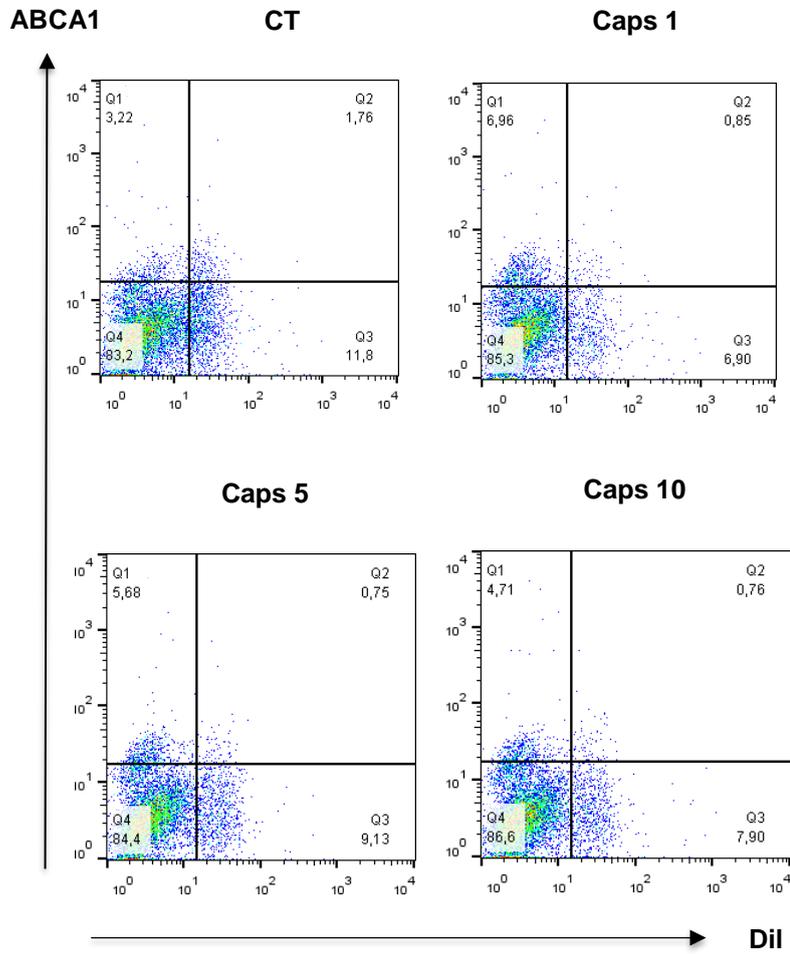
7.8.4.4 Comparação entre teor total de receptores de efluxo e LDL intracelular em células com e sem a presença do antagonista de PPAR γ (GW9662)

Pela análise da Fig. 31, percebe-se nitidamente que, na falta de atividade de PPAR γ , as células apresentam um reduzido conteúdo intracelular de LDLox-Dil, quando comparadas com aquelas sem antagonismos.

Como esperado, em resposta à queda acentuada de LDL intracelular, essas células também apresentam uma menor expressão de ambos os receptores de efluxo, embora a capacidade de Caps em induzir um aumento na expressão de ABCA1 permaneça.



D



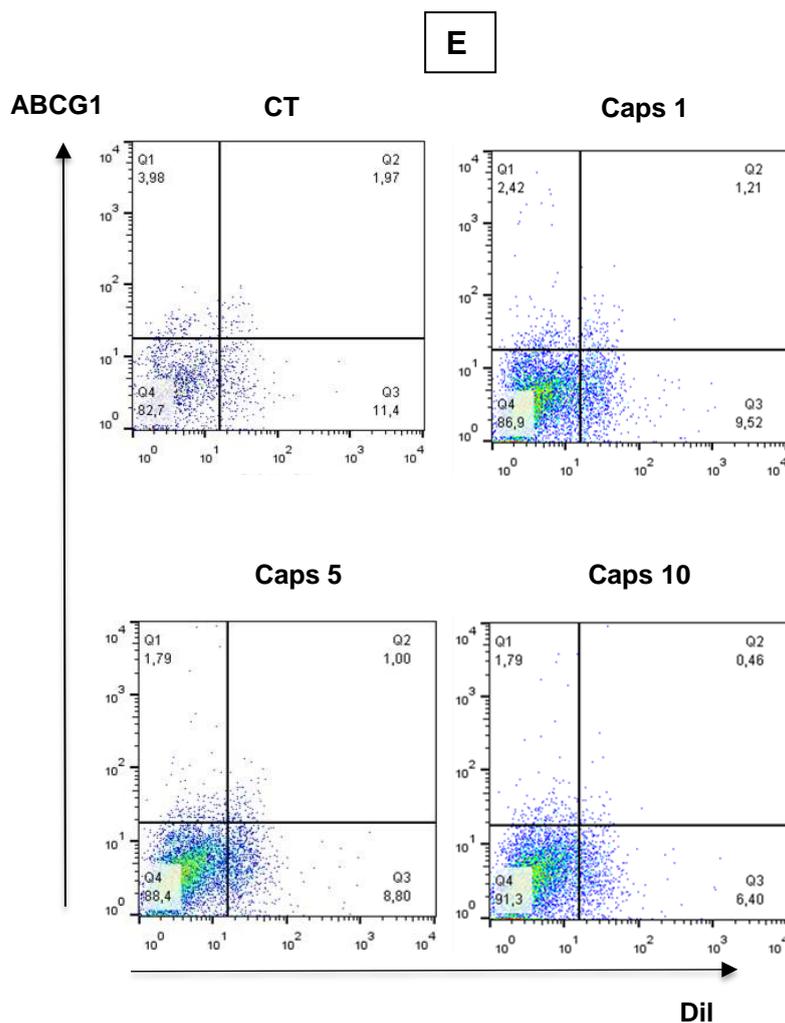


Figura 31: Citometria de fluxo na linhagem celular BMDM para avaliação das vias de efluxo de colesterol em culturas tratadas ou não antagonista de PPAR γ (GW9662). **A** - Comparação da % total das populações positivas para ABCA1, em culturas com e sem GW9662; **B** - Comparação da % total das populações positivas para ABCG1, em culturas com e sem GW9662; **C** - Comparação da % total de células Dil+ obtidas nos dois ensaios de efluxo, em culturas com e sem GW9662; **D** - Gráficos dot plot representativos para células estimuladas com LDLox-Dil e expostas a GW9662 marcadas com anticorpo anti-ABCA1; **E** - Gráficos dot plot representativos para células estimuladas com LDLox-Dil e expostas a GW9662 marcadas com anticorpo anti-ABCG1. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão (DP).

8. Discussão

O presente trabalho propôs-se a avaliar os efeitos da ingestão dietética de capsaicina, principal composto ativo presente nas pimentas do gênero *Capsicum*, em parâmetros inflamatórios relacionados ao surgimento e evolução da aterosclerose. Também foi proposta desta pesquisa colaborar para o esclarecimento das vias de sinalização associadas a esses efeitos, a fim de detectar potenciais alvos metabólicos que possam contribuir para a prevenção dessa condição patológica.

Conquanto haja dados consistentes relacionando a atividade ateroprotetora de Caps com sua capacidade anti-inflamatória, as vias de sinalização envolvidas nesse processo ainda levantam discussão entre pesquisadores, em razão dos resultados controversos a esse respeito, os quais questionam a dependência da sinalização, mediada por Caps, de seu receptor específico: TRPV1. Além disso, apesar de amplamente estudada, em decorrência da gama de propriedades farmacológicas a ela atribuídas, poucos estudos investigaram os efeitos da ingestão de Caps dietética nos parâmetros inflamatórios associados à aterosclerose.

Nesse contexto, alguns trabalhos estudaram as vias induzidas por Caps envolvidas na modulação da formação de células espumosas, marcador característico da aterosclerose, embora utilizando uma única linhagem celular de macrófagos e a combinação de antagonistas de TRPV1 ou de outras vias alvo de pesquisas, como PPAR γ , uma via frequentemente associada ao efluxo de colesterol (Park *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2015). Este estudo pela primeira vez avaliou as vias estimuladas por Caps no influxo e efluxo de colesterol, utilizando para isso duas linhagens celulares distintas de macrófagos: a linhagem celular RAW264.7, a qual não apresenta expressão de TRPV1, bem como macrófagos derivados da medula óssea, os quais expressam tanto TRPV1 quanto PPAR γ . Isso foi feito com o propósito de avaliar, através de comparações entre as distintas linhagens, os efeitos de Caps na ausência ou presença de TRPV1, para enfim tentar esclarecer por qual dessas vias de sinalização Caps exerce sua atividade em macrófagos, como também qual a relevância de cada uma delas na modulação da formação de células espumosas e na contenção da resposta inflamatória crônica inerente à aterosclerose.

Com o propósito de investigar se a ingestão crônica de Caps pode contribuir para atenuar a resposta inflamatória e assim conter a aterosclerose em animais ApoE⁻

^{-/-}, foram avaliados conhecidos fatores de risco associados a essa condição, tais como a ingestão calórica, o ganho de peso e o perfil lipídico de animais recebendo uma dieta aterogênica suplementada com Caps (0,015%), bem como marcadores inflamatórios preditores da progressão da aterosclerose, *in situ* ou em tecidos não acometidos por lesão, capazes de indicar o estado inflamatório geral.

Os dados *in vivo* demonstram que Caps foi efetiva em reduzir o ganho de peso em animais ApoE^{-/-}, bem como o peso relativo do tecido adiposo visceral, sem que, no entanto, tenham sido observadas diferenças quanto à ingestão dietética. Não se encontraram diferenças em relação ao peso relativo do fígado; entretanto, nota-se um aumento do baço entre animais ApoE^{-/-} não tratados, em relação aos selvagens, o que pode denotar uma maior atividade mielopoietica dos animais geneticamente modificados. Apesar de o peso relativo do baço em animais ApoE^{-/-} tratados com Caps não diferir daquele de seus controles, esses animais apresentaram um volume tecidual que foi semelhante ao encontrado nos selvagens, o que parece ser um indício de que essa substância pode exercer algum papel em conter a atividade inflamatória no tecido do baço (Fig. 9).

Conquanto se acredite que o baço seja um reservatório de monócitos não diferenciados em estado estacionário, Robbins e colaboradores demonstraram que esse tecido pode se tornar monocitopoiético durante o desenvolvimento da aterosclerose. Além disso, os autores mostraram que, em animais ApoE^{-/-} alimentados com uma dieta hiperlipídica, observou-se um aumento da população esplênica de células produtoras de IL-3 e do fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos (GM-CSF), e que tanto essa citocina quanto o fator de crescimento GM-CSF foram suficientes para dirigir a mielopoiese de progenitores esplênicos, os quais, após serem expostos a esse ambiente inflamatório, podem não apenas se expandir clonalmente, como originar monócitos de fenótipo pró-inflamatório Ly-6C^{high}, com capacidade de se acumularem abundantemente no ateroma. Essas descobertas indicam, portanto, que locais extramedulares podem apoiar a função hematopoiética da medula óssea e contribuir para a produção de células inflamatórias circulantes as quais irão infiltrar em lesões ateroscleróticas (Robbins *et al.*, 2012). Assim, a ação de Caps em impedir um aumento exacerbado do baço em animais ApoE^{-/-} pode apontar um possível papel desse composto em reduzir a produção e circulação de monócitos com fenótipo aterogênico.

Muitos estudos já demonstraram a relação íntima entre monocitose e níveis de lipídeos plasmáticos (Averill *et al.*, 1989; Huang e Chiang, 2002; Swirski *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2014). Considerando que animais alimentados com Caps demonstraram capacidade em conter o aumento do volume do baço e que isso pode significar uma menor atividade inflamatória tecidual, investigou-se se esse efeito esplênico de Caps poderia ser consequência de uma possível atividade antilipidêmica.

Como demonstrado na Fig. 10, a ingestão de Caps também foi eficiente em melhorar o perfil lipídico dos animais nocautes recebendo dieta suplementada com colesterol: percebeu-se uma redução tanto nos níveis de colesterol total (CT) quanto nos de colesterol não HDL (HDL-nc), bem como naqueles de triglicerídeos, sendo que esses últimos chegaram a níveis próximos dos observados em animais selvagens. Não obstante, os níveis de colesterol HDL permaneceram inalterados após consumo crônico de Caps.

Alguns autores já haviam indicado a capacidade desse composto em melhorar o perfil lipídico de animais apresentando dislipidemia induzida por dieta hiperlipídica. Manjunatha e colaboradores mostraram uma diminuição nos níveis de colesterol total, bem como nos de triglicerídeos em ratos recebendo dieta hiperlipídica suplementada com 0,015% de Capsaicina por 8 semanas (Manjunatha e Srinivasan, 2007). Mais recentemente, Huang W. e parceiros pesquisaram os efeitos da ingestão de diferentes quantidades de capsaicinóides, grupo de componentes pungentes do qual Caps é o principal integrante, e de capsioídes, seus análogos não pungentes, no perfil lipídico de hamsters recebendo uma dieta hiperlipídica (6 semanas) e encontraram que os primeiros, mas não os últimos, melhoraram o perfil lipídico dos animais, levando à redução dos níveis de CT, TG e HDL-nc de uma maneira dose dependente (Huang *et al.*, 2014). Ademais, o grupo de Liang encontrou resultados semelhantes aos supracitados e também aqueles observados no presente trabalho: hamsters recebendo uma dieta rica em colesterol acrescida de diferentes quantidades de capsaicinóides por 6 semanas reduziram níveis de CT, HDL-nc e TG, enquanto os níveis de HDL permaneceram inalterados (Liang *et al.*, 2013). Esses trabalhos reforçam os achados aqui revelados em relação à atividade hipolipidêmica de Caps, a qual pode ter o potencial de impactar positivamente a monocitose característica da aterosclerose e, em última instância, a severidade das lesões ateroscleróticas.

À vista disso, a fim de averiguar se os efeitos de Caps já demonstrados seriam capazes de afetar o desenvolvimento da lesão aterosclerótica, mediu-se a área de

lesão em animais ApoE^{-/-}, em diferentes sítios anatômicos: aorta e carótida. Os dados referentes à aorta mostram que o tratamento com Caps reduziu por cerca de metade a área de tecido acometido por lesão (Fig. 12). Sabe-se que, em animais ApoE^{-/-}, as lesões na aorta aparecem espontaneamente nas primeiras semanas e são mais simples, caracterizadas por estrias gorduras compostas basicamente por células espumosas, que embora não tenham relevância clínica, são precursoras de lesões mais avançadas (Kapourchali *et al.*, 2014). O efeito de Caps em conter o avanço dessas lesões características da aorta pode indicar que seu uso crônico seja efetivo em prevenir a aterosclerose.

Para verificar se esse princípio ativo poderia atuar na doença já instalada, a fim de retardar sua evolução, procurou-se investigar também seu possível papel em lesões representativas daquelas encontradas em fases mais avançadas da aterosclerose. Lesões com maior grau de complexidade foram geradas a partir de uma obstrução mecânica artificial da artéria carótida. Esse processo acarreta mudanças severas nas forças de cisalhamento, já que leva à perda do fluxo laminar, ateroprotetivo e gera um fluxo sanguíneo perturbado. Tais modificações contribuem para a criação de um ambiente ateropropenso, posto que levam à ativação de células endoteliais, as quais passam a apresentar um fenótipo pró-inflamatório, favorecendo assim o desenvolvimento de lesões (Heo *et al.*, 2014; Zimarino *et al.*, 2014). Através desse artifício, foi possível então gerar lesões mais avançadas na artéria carótida e permitir, assim, a investigação dos efeitos de Caps também em lesões características de estágios mais evoluídos da doença aterosclerótica.

Nesse tecido, observou-se que os animais recebendo Caps em sua dieta apresentaram uma área lesionada que se mostrou três vezes menor que aquela encontrada em camundongos ApoE^{-/-} recebendo apenas dieta aterogênica (Fig.13). A análise desses resultados, combinados àqueles já mostrados na aorta, nos permite concluir que Caps pode atuar não apenas em lesões mais simples, mas também efetivamente contribuir para atenuar a formação de lesões ateroscleróticas mais complexas. Além disso, os efeitos de Caps em reduzir conhecidos fatores de risco para a aterosclerose, demonstrados neste trabalho, tais como o peso e o acúmulo de gordura visceral, bem como os níveis de lipídeos séricos contribuem para validar sua capacidade em retardar a formação de lesões ateroscleróticas.

Nesse sentido, cabe notar que outros pesquisadores obtiveram resultados semelhantes aos encontrados por nosso grupo. Ma e colaboradores relataram em

2011 que animais ApoE^{-/-} apresentaram uma redução na carga de lipídeos em lesões ateroscleróticas da aorta descendente após o consumo crônico de uma dieta hiperlipídica suplementada com Caps (0,01%), em relação a seus controles recebendo apenas uma dieta hiperlipídica. Similares resultados foram encontrados no arco aórtico, após análises histomorfológicas (Ma L. *et. al*, 2011). Ademais, Huang e colegas também mostraram que a ingestão de capsaicinóides reduziu tamanho e quantidade de placas ateroscleróticas em hamsters recebendo uma dieta suplementada com colesterol (Huang W. *et. al*, 2014).

Sabendo que a inflamação exerce um papel fundamental nas diferentes fases do desenvolvimento da lesão, avaliou-se então parâmetros inflamatórios que poderiam prever a ação de Caps nesses distintos estágios de evolução da lesão aterosclerótica.

Considerando que o recrutamento de monócitos circulantes para os locais de injúria endotelial é um evento crucial na aterosclerose, haja vista seu papel fundamental como dirigentes de eventos aterogênicos, investigou-se se Caps poderia interferir nesse processo : o composto reduziu tanto o rolamento como a adesão de leucócitos na artéria mesentérica dos animais tratados, em relação a seus controles (Fig. 18). Além disso, diminuiu o infiltrado inflamatório composto por monócitos e macrófagos na lesão da artéria carótida (Fig.14) e também a expressão de receptores de influxo CD36 (Fig. 15), associados à captação descontrolada de LDLox e responsáveis, pelo menos em parte, pelo acúmulo citotóxico de metabólitos lipídicos em células espumosas, instigadores da exacerbação da resposta inflamatória preexistente.

O menor recrutamento de leucócitos induzido por Caps pode ser explicado, pelo menos parcialmente, pela redução da hiperlipidemia, como já demonstrado por estudos prévios que revelaram a existência de uma relação causal entre níveis de monócitos circulantes, hiperlipidemia e gravidade de lesões ateroscleróticas (Yvan-Charvet *et al.*, 2010; Murphy *et al.*, 2011). Adicionalmente, o reduzido conteúdo de monócitos/macrófagos observado nas lesões da carótida certamente está associado ao menor recrutamento celular induzido por Caps.

Os dados obtidos neste trabalho, até aqui discutidos, demonstram, portanto, que Caps reduziu parâmetros inflamatórios relacionados de forma direta a aterogênese, tais como o recrutamento de células inflamatórias e a expressão do

receptor scavenger CD36, ambos intrinsecamente associados à viabilização da

formação de células espumosas. Esses resultados apontam para um papel anti-inflamatório da ingestão crônica de Caps na aterosclerose, haja vista o acúmulo dessas células estar diretamente relacionado à indução de mediadores pró-inflamatórios.

Com o propósito de confirmar se a ingestão crônica de Caps poderia exercer uma ação anti-inflamatória sistêmica, avaliou-se seu efeito em parâmetros inflamatórios no fígado, órgão central para o metabolismo de colesterol. Caps efetivamente reduziu a atividade hepática das enzimas n-acetilglicosaminidase (NAG) e mieloperoxidase (MPO) em animais ApoE^{-/-} tratados, e esses níveis foram similares àqueles encontrados em animais selvagens (Fig.16). A redução das atividades de NAG e MPO induzida por Caps dá ainda mais força à ideia de que esse composto exibe a capacidade de atenuar a resposta inflamatória, tendo em vista que tais são enzimas preditoras dos níveis teciduais de macrófagos e neutrófilos, respectivamente. Além disso, considerando-se o papel de MPO em contribuir para a oxidação de LDLox, sua menor atividade induzida por Caps seria um indicativo de que esse composto poderia atuar minimizando os danos oxidativos mediados por LDLox que induziriam o recrutamento celular, a formação de células espumosas e, conseqüentemente, a resposta inflamatória ocasionada pelo crescente acúmulo de lipídeos nessas células.

Em concordância com esses achados, o consumo de Caps também atenuou a geração das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 β (Fig. 17), sabidamente envolvidas na geração de células espumosas e na expressão de receptores scavenger de influxo de colesterol. Park e colaboradores já demonstravam em 2004 que Caps exibia uma capacidade em inibir a produção de TNF em células RAW264.7 estimuladas com LPS (Park *et al.*, 2004). Mais recentemente, Tang e colegas mostraram que Caps inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 β e IL-6 em macrófagos THP-1 estimulados por LPS (Tang *et al.*, 2015), e outros autores também atestaram que esse fitoquímico pode atuar diretamente sobre macrófagos, inibindo a produção de diferentes citocinas pró-inflamatórias (Takano *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2011). Tais resultados encontram-se em concordância com aqueles obtidos *in vivo* neste estudo e sugerem que Caps reduz a concentração de citocinas pró-inflamatórias, o que culminaria no menor recrutamento de monócitos e expressão de CD6, resultando, conseqüentemente, numa menor área de lesão aterosclerótica.

Conjuntamente, os dados obtidos nos ensaios *in vivo* no presente trabalho apontam para benefícios do uso oral de capsaicina no desenvolvimento da

aterosclerose em camundongos ApoE^{-/-}. Esse efeito tem relação tanto com a sua ação em melhorar a adiposidade e a dislipidemia, conhecidos fatores de risco para a aterosclerose, como também pela sua capacidade em modular a resposta inflamatória crônica inerente a essa condição patológica.

A combinação dos resultados obtidos *in vivo* neste trabalho, bem como aqueles provenientes de ensaios *in vitro* disponíveis na literatura, levam a crer que Caps pode atuar diretamente em monócitos e macrófagos. Em células espumosas, diferentes autores já mostraram que Caps pode agir de forma a restabelecer a homeostase do metabolismo lipídico perdida durante o desenvolvimento da aterosclerose, modulando assim a exacerbação crescente da resposta inflamatória desencadeada pelo acúmulo excessivo de lipídeos intracelulares (Kim *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015). A falta de consenso gira em torno de como ela mediará esse processo.

Nos últimos anos, tem ganhado força a ideia de que a ação de Caps em minimizar o acúmulo de colesterol em células espumosas e a inflamação decorrente desse processo ocorreria de forma independente da ativação de seu receptor específico, TRPV1. A maior parte desses trabalhos sugere que a ação de Caps nessas células ocorre pela regulação das vias de efluxo de colesterol, num processo dependente de LXR- α e PPAR γ (Kim *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2015). Por outro lado, outros pesquisadores apresentaram dados que contrariam essas hipóteses, reafirmando a necessidade da sinalização desencadeada pela ativação de TRPV1 na atuação de Caps em prevenir a formação de células espumosas e, conseqüentemente, a resposta inflamatória (Tsuji *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013).

Considerando-se assim o grande número de dados conflitantes nesse sentido, o presente trabalho propôs-se a avaliar o papel de Caps nos processos acima citados, utilizando para tanto duas diferentes linhagens de macrófagos: a linhagem RAW 264.7, a qual reconhecidamente não expressa TRPV1, e macrófagos derivados da medula óssea, que apresentam a expressão desse receptor. Através da análise comparativa da atuação de Caps sobre as vias de influxo e efluxo de colesterol nas duas diferentes linhagens, pretendeu-se contribuir para elucidar qual das vias de sinalização, se PPAR γ ou TRPV1, teria papel relevante na capacidade desse composto em regular o acúmulo de colesterol em células espumosas.

Inicialmente, investigou-se se, na ausência de TRPV1, Caps poderia agir reduzindo o conteúdo celular de LDLox em macrófagos, e se este efeito teria relação com a sinalização desencadeada pela ativação de PPAR γ . A análise do conteúdo proteico dos receptores de influxo e efluxo em células RAW 264.7 mostrou que Caps, apesar de induzir um aumento na expressão proteica dos receptores CD36 e SR-A, foi efetiva em reduzir a carga celular de LDL e posteriormente verificou-se que esse efeito foi decorrente do aumento da expressão dos receptores de efluxo, ABCA1 e ABCG1.

Como outros trabalhos já haviam sinalizado que a ação de Caps no efluxo poderia estar relacionada com a ativação de vias induzidas por PPAR γ , utilizamos o antagonista seletivo desse receptor nuclear (GW9662) para tentar comprovar o possível envolvimento dessa via na atuação de Caps sob o efluxo celular. Em culturas expostas a GW9662, observou-se uma reversão da ação de Caps, conquanto a adição do antagonista tenha afetado de forma diferente os dois receptores de efluxo: o antagonismo de PPAR γ reduziu a expressão de ABCA1 apenas de forma parcial; já o efeito em ABCG1 foi revertido completamente, sugerindo que, na linhagem de macrófagos RAW 264.7, a expressão desses receptores é parcial (no caso de ABCA1) ou totalmente dependente (no caso de ABCG1) da via PPAR γ .

Nossos resultados relacionam a ativação de PPAR γ à maior expressão não apenas dos receptores cassete de efluxo, como já demonstrado previamente, como também daqueles de influxo, associação que também já foi mostrada por diferentes grupos. Sabe-se que LDLox pode regular tanto a expressão de CD36 como a de SR-A, e parte desses efeitos pode ocorrer em consequência da ligação e ativação de LDLox a PPAR γ . Han e colaboradores mostraram, ainda em 1997, que a exposição de macrófagos murinos da linhagem celular J774 a LDLox aumentou de forma marcante a expressão de CD36, a nível de RNAm, o que foi acompanhado por um aumento nos níveis proteicos dessa proteína (Han *et al.*, 1997). Em 1998, o grupo de Nagy demonstrou que a capacidade de LDLox em aumentar a expressão de CD36 deve-se à sua habilidade em ativar também PPAR γ (Nagy *et al.*, 1998). Ademais, já foi provado que dois metabólitos lipídicos originados da LDL oxidativamente modificada, 13-HODE e 9-HODE, atuam como ligantes de PPAR γ e são potentes ativadores de sua atividade. Assim, a expressão de CD36 e a formação de células espumosas podem ser perpetuadas por um ciclo no qual LDLox dirige sua própria captação: a internalização de LDLox leva à formação de metabólitos, tais como 13-

HODE e 9-HODE , que podem atuar como ligantes de PPAR α e induzir sua ativação transcricional, a qual gera um aumento na expressão de CD36. Esses dados já foram posteriormente confirmados por diferentes autores e é amplamente aceito que ligantes e agonistas de PPAR α levam a um aumento dos níveis de CD36, o que explica os aumentados níveis desse scavenger encontrados neste trabalho após indução da atividade de PPAR α por Caps, em células RAW 264.7 (Huang *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2001).

Dados relacionando a regulação da expressão do scavenger SR-A à atividade de PPAR α também já foram demonstrados por alguns estudiosos, embora haja dados controversos nesse sentido. Nagy e colaboradores relataram um aumento da expressão de SR-A, a nível de RNAm, em células THP-1 estimuladas com uma combinação de LDLox e LG268, um ligante seletivo de RXR, receptor requerido para a atividade biológica de PPAR α . No entanto, não observaram aumento dos níveis proteicos desse receptor após exposição das células a ligantes específicos de PPAR α , mas apenas após o estímulo com LDLox (Nagy *et al.*, 1998). Moore e colaboradores demonstraram, utilizando células tronco deficientes em PPAR α , que esse receptor nuclear é requerido para expressão basal de CD36, mas não para a de SR-A. De forma divergente, o mesmo estudo mostrou que tiazolidinediana (TDZ), conhecido ligante e ativador de PPAR α , mostrou-se capaz de regular a expressão de ambos os scavengers, CD36 e SR-A (Moore *et al.*, 2001). Já o trabalho de Martín- Fuentes e colegas demonstrou que a expressão gênica de SR-A correlacionou-se positivamente às de PPAR α e NF κ B, em macrófagos derivados de monócitos isolados de humanos (Martin-Fuentes *et al.*, 2007). Mais recentemente, em 2017, Hashizume e colaboradores, utilizando células endoteliais humanas tratadas com IL-6, TNF ou IL-1 β , encontraram que tanto IL-6 quanto TNF induziram um aumento da expressão de SR-A (Hashizume e Mihara, 2012a; b). Uma vez que os efeitos anti-inflamatórios de PPAR α já foram relacionados à redução da produção dessas e de outras citocinas pró-inflamatórias em diferentes condições (Xu *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019), é possível inferir que talvez a atividade desse receptor nuclear não afete de forma direta a expressão de SR-A, mas possa exercer essa ação de forma indireta, pela redução da produção de diferentes citocinas, envolvidas de forma crucial na resposta inflamatória observada na aterosclerose.

Dessa forma, nossos dados apontam no sentido de que Caps pode atuar como um agonista de PPAR α , induzindo a expressão de receptores cassete de efluxo de colesterol ABCA1 e ABCG1, modulando assim a formação de células espumosas e, conseqüentemente, a resposta inflamatória. Esse fato justificaria os achados anteriores de outros autores, os quais associam o papel anti-inflamatório de Caps à indução da atividade ou expressão de PPAR α . Além disso, o fato de o tratamento com Caps induzir, de forma sinérgica à LDLox, um aumento na expressão de CD36 e SR-A, efeito já associado à atividade de PPAR α após estímulo por diferentes ligantes, reforça o envolvimento dessa via nos resultados obtidos por este estudo em células RAW 264.7, corroborando a ideia de que Caps pode atuar para reduzir a formação de células espumosas e resposta inflamatória, mesmo na ausência de seu receptor específico, TRPV1.

Assim, com o propósito de verificar se, mesmo em células que apresentam expressão de TRPV1, o papel da indução de PPAR α continuaria sendo relevante para a prevenção da formação de células espumosas impulsionada por Caps, avaliou-se novamente os níveis proteicos de receptores de influxo e efluxo de colesterol, bem como a carga de LDLox intracelular, mas em células derivadas da medula óssea (BMDM) expressando simultaneamente TRPV1 e PPAR α .

Nessas células, notou-se que o efeito de Caps em reduzir o conteúdo celular de LDLox foi mantido, mas esse resultado foi consequência da atuação desse princípio ativo não apenas no efluxo de colesterol, mas também no influxo. Em células BMDM sem quaisquer antagonismos, Caps parece atuar de forma a contrapor o aumento da expressão proteica dos receptores de influxo CD36 e SR-A, notado anteriormente em células RAW 264.7. Em relação a esse último, observou-se que a exposição à Caps provocou inclusive a redução de sua expressão, levando a crer que, em tais células, Caps parece mediar uma redução da captação de LDLox. Ainda assim, não obstante já apresentar um aparente efeito no influxo, Caps se mostrou efetiva em induzir a expressão de ABCA1, embora o mesmo não tenha sido notado em relação a ABCG1, o qual apresentou níveis reduzidos após exposição a Caps.

Esses dados sugerem que, em células BMDM, Caps mantém sua capacidade em modular o conteúdo celular de LDLox, mas o faz por vias distintas daquelas observadas na linhagem celular RAW 264.7. Diferentemente do que se observou nessas últimas, nas primeiras Caps parece agir regulando tanto as vias de influxo

mediadas por CD36 e SR-A, consequentemente reduzindo a captação de LDLox, como por aquelas de efluxo via ABCA1.

Com o intuito de verificar se os diferentes efeitos observados nessa linhagem estariam relacionados à atividade de TRPV1, avaliou-se, então, o papel de Caps em células expostas ao antagonista seletivo de TRPV1, capsazepina (CZE).

Na presença de CZE, o efeito de Caps em reduzir a expressão dos receptores CD36 e SR-A, observado previamente nas células não expostas à antagonistas, foi perdido. A comparação das culturas sem e com antagonismo de TRPV1 mostra inclusive que, nessas últimas, a expressão de CD36 volta a ser bem semelhante àquela observada em células RAW 264.7. Em relação a SR-A, nota-se que Caps volta a exibir uma capacidade em induzir sua expressão, também a exemplo do que ocorreu na linhagem RAW 264.7. Esses dados sinalizam que, na incapacidade de Caps em agir via TRPV1, as diferentes linhagens apresentam um perfil semelhante no que diz respeito à regulação dos receptores de influxo de colesterol, o que pode indicar a participação de uma via bioquímica comum nesses dois grupos de células.

Os efeitos de CZE no efluxo não afetaram a expressão de ABCA1, que continuou a ser induzido por Caps, mesmo na ausência de atividade de TRPV1. Já em relação a ABCG1, notou-se que Caps deixou de agir de forma a reduzir sua expressão e voltou a induzi-la, como aconteceu na linhagem RAW 264.7. Além disso, nota-se que mesmo com o antagonismo de TRPV1, as células BMDM expostas à Caps continuaram a reduzir de forma efetiva a carga celular de LDLox. Em conjunto, os dados relativos à expressão de receptores de influxo e efluxo de colesterol sugerem, assim, que em macrófagos derivados da medula óssea sem ação de TRPV1, Caps provavelmente atua, como na linhagem RAW 264.7, via PPAR γ , já que os efeitos desse fitoquímico em células BMDM expostas à CZE passam a ser bastante semelhantes àqueles previamente demonstrados na linhagem RAW 264.7.

A fim de melhor entender o papel e a relevância da indução da atividade de PPAR γ por Caps, investigou-se ainda o efeito desse composto na presença do antagonista seletivo de PPAR γ , GW9662, também em células BMDM. Com a adição de GW9662, as células que antes do antagonismo expressavam CD36 em sua quase totalidade, apresentaram uma queda de aproximadamente 30% nessa expressão, valor que se aproxima da redução provocada por Caps a 10 μ M nas células com TRPV1 e PPAR γ funcionais. Em relação a SR-A, volta a se notar uma diminuição em

sua expressão, como visto anteriormente em macrófagos BMDM sem antagonismos.

Salienta-se que o teor de células expressando esse receptor foi ligeiramente menor nas células com PPAR α antagonizado em relação às células sem qualquer antagonização. Adicionalmente, após adição de GW 9662, continuou sendo notada uma queda em relação ao conteúdo celular de LDLox nas células expostas à Caps, em concordância com a redução da expressão de receptores scavengers.

Destaca-se ainda que essa diminuição tanto na expressão de CD36 como de SR-A, vista após o antagonismo de PPAR α , em relação às células com esse receptor funcional, é notada inclusive nos grupos CT, os quais não foram expostos a Caps, o que provavelmente decorre da incapacidade de LDLox em induzir a expressão desses scavengers via PPAR α .

Os dados até aqui discutidos levam a crer que, embora Caps possa atuar via PPAR α em células sem expressão ou atividade de TRPV1, naquelas onde ele se faz expresso esse composto parece atuar predominantemente através da sinalização desencadeada por sua ativação, já que os efeitos observados nessas células se assemelham àqueles encontrados naquelas expostas à GW9662, nas quais a ação de Caps não pode ser creditada à atividade de PPAR α .

Para melhor esclarecer como se daria a ação de Caps em células BMDM, foram avaliados ainda os efeitos da adição de GW9662 nas vias de efluxo mediadas por ABCA1 e ABCG1. Nessas culturas, percebe-se claramente que, na ausência de atividade de PPAR α , há uma redução drástica no conteúdo celular de LDLox, provavelmente relacionada à incapacidade tanto de Caps, como da LDL oxidativamente modificada, em induzir a expressão de receptores de influxo por essa via. Apesar de uma significativa redução na carga celular de LDL, Caps continua demonstrando capacidade em atuar estimulando a expressão de ABCA1, embora em proporção bem menor que aquela vista anteriormente na linhagem RAW 264.7 e mesmo nas células BMDM totalmente funcionais. Isso se justifica pela redução consistente da captação de LDLox via CD36 e SR-A em macrófagos com antagonismo de PPAR α , o que torna essas células menos dependentes do efluxo de colesterol para manutenção da homeostase lipídica. O mesmo não ocorre em relação a ABCG1, que passa a mostrar uma reduzida expressão na presença de Caps, fato semelhante ao que ocorre em células BMDM sem antagonismos. Esses dados corroboram a necessidade da atividade de PPAR α para estimular a expressão desse mediador de efluxo, conforme já demonstrado anteriormente na linhagem RAW 264.7.

Coletivamente, a análise desses dados nos permite concluir que Caps tem o poder de atuar em macrófagos para reduzir o acúmulo intracelular excessivo de lipídeos, e nos leva a crer que tal efeito deve-se primariamente à ativação de TRPV1 por Caps, em detrimento da indução da atividade de PPAR γ . Isso porque a ação de Caps em células BMDM com expressão simultânea de ambos os receptores mostrou ocorrer de forma distinta daquela previamente observada em células RAW 264.7, nas quais a ação de Caps demonstrou ter uma participação importante da via PPAR γ . Nessas células sem expressão de TRPV1, Caps não apresenta qualquer efeito benéfico relacionado ao controle da captação de LDLox pelos receptores scavenger de influxo, e age modulando a exclusivamente as vias envolvidas no efluxo de colesterol.

Já nas células derivadas da medula óssea, não obstante a capacidade de Caps em reduzir a carga celular de LDLox tenha permanecido, esse efeito é provocado principalmente pela regulação da expressão de receptores de influxo CD36 e SR-A, ou seja, pelo controle da captação de LDLox. Tendo-se em vista que a indução da atividade de PPAR γ , seja por LDLox ou Caps, estimula a expressão desses receptores, em células com a expressão simultânea de PPAR γ e TRPV1, o efeito visto não pode, portanto, ser creditado à indução da atividade de PPAR γ por Caps, como visto em macrófagos RAW 264.7. Considerando-se ainda que, com a adição de antagonista de TRPV1 às culturas, células BMDM expostas a Caps perdem a capacidade antes demonstrada em reduzir a expressão de CD36 e SR-A, pode-se concluir que esse efeito é dependente da ação de Caps sob TRPV1.

Além disso, nas células onde Caps demonstrou atuar por induzir a sinalização dependente de PPAR γ , foi possível notar um aumento do efluxo de colesterol tanto via ABCA1 como via ABCG1. Já nas células BMDM, o composto não mostrou capacidade em induzir o efluxo pela via ABCG1, mas apenas via ABCA1, ainda assim em proporção bem menor que aquela observada em células RAW 264.7. Talvez o efeito visto em relação a ABCG1 não seja consequência de uma direta ação inibitória de Caps, mas, sim, uma resposta aos baixos níveis de LDLox captados. De fato, embora a ativação de TRPV1 por Caps demonstre induzir a expressão de ABCA1, essa capacidade é limitada. Como a regulação da homeostase lipídica em células BMDM via ativação de TRPV1 é resultado principalmente de uma modulação da captação de LDLox por CD36 e SR-A, é plausível supor que essas células sejam menos dependentes da indução das vias de efluxo mediadas por ABCA1 e ABCG1

do que macrófagos da linhagem RAW 264.7, nos quais o efeito de Caps se dá exclusivamente pela regulação dessas vias.

Levando-se em conta, portanto, todas essas considerações, não se pode creditar os efeitos obtidos por Caps nessas células à indução da via PPAR α . Por outro lado, é crível relacionar esse efeito com a ativação de TRPV1 por Caps, pois a adição de CZE às culturas reverteu a ação desse composto, tanto em reduzir a expressão proteica de ABCG1 como a dos receptores scavenger de influxo; provavelmente porque, nessa condição, Caps passou a induzir a atividade de PPAR α .

Outro dado que contribui para tornar nossa hipótese verossímil é o fato de que, *in vivo*, a ingestão de Caps resultou em reduzidos níveis de expressão proteica de CD36 nas lesões ateroscleróticas da artéria carótida, mesmo efeito encontrado em células BMDM expostas a esse fitoquímico. Tendo-se em mente que em células RAW 264.7 esse efeito não é visto, e ainda que a ação de Caps na expressão de CD36 em células BMDM tenha sido revertida pela adição de CZE, é concebível pressupor que essas ações estejam ligadas à atuação de TRPV1.

Cabe destacar que, conquanto o papel de CD36 e SR-A como agentes pró-aterogênicos e de sua contribuição para o aumento da formação de células espumosas tenha gerado, recentemente, discussões entre pesquisadores, em razão de estudos que não encontraram piora da aterosclerose *in vivo* com a deleção de ambos, ou de cada receptor scavenger separadamente, isso tem sido atribuído a diferenças no background genético de camundongos e dos modelos de aterosclerose usados (Moore e Freeman, 2006; Park, 2014).

Essa conclusão encontra suporte nas crescentes evidências que relacionam a regulação dos níveis dos receptores scavenger à atenuação da formação de células espumosas em macrófagos humanos, as quais têm se mostrado consistentes em revelar o papel aterogênico dos altos níveis desses receptores. Nozaki e colegas mostraram, em 1995, uma redução da captação de LDLox por macrófagos humanos derivados de monócitos extraídos de pacientes com expressão deficiente de CD36 (Nozaki *et al.*, 1995). Em 2009, Park e colegas revalidaram a atividade aterogênica desse receptor ao demonstrarem que a sinalização desencadeada pela ligação de LDLox a CD36 altera a dinâmica do citoesqueleto, o que contribui para inibir a migração de células espumosas e para seu aprisionamento na íntima arterial, com a consequente formação de lesões ateroscleróticas (Park *et al.*, 2009). Mais recentemente, outros autores encontraram uma correlação entre aterosclerose e

níveis plasmáticos de CD36 solúvel ou com a expressão desse receptor em monócitos circulantes (Teupser *et al.*, 2008; Handberg *et al.*, 2010; Piechota *et al.*, 2012).

Adicionalmente, estudos mais recentes em animais têm ligado a superexpressão de scavengers a um perfil ateropropenso. Em 2004, Febbraio e colegas revelaram que camundongos transplantados com macrófagos nocautes para CD36 mostraram profunda redução na formação de lesões ateroscleróticas, ao passo que a reintrodução de macrófagos expressando CD36 induziu um aumento de duas vezes na área de lesão (Febbraio *et al.*, 2004). Xie e colaboradores também relacionaram a atenuação da formação de células espumosas derivadas de macrófagos peritoneais de camundongos ApoE^{-/-} à redução da expressão de CD36 e SR-A. Esses autores encontraram que esse efeito, pelo menos parcialmente, foi uma consequência da redução da expressão de PPAR γ e dos níveis de seus ligantes endógenos HODE e HETE (Xie *et al.*, 2011).

Somam-se a isso, achados de outros autores relacionando efeitos benéficos da ativação de TRPV1 por agonistas na aterosclerose, o que contribui para asseverar nossa hipótese. Na última década, alguns estudos mostraram a expressão de canais TRPV1 nos vasos e consideraram que a sua ativação mediada por agonista regulou a expressão de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) em células endoteliais, levando a efeitos protetivos contra disfunção nessas células (Luo *et al.*, 2008; Sudhakar *et al.*, 2009). Além disso, Yang e colegas demonstraram que a ativação crônica de TRPV1 induzida por Caps dietética levou a um aumento da fosforilação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), provocando assim um incremento nos níveis de óxido nítrico endotelial (Yang *et al.*, 2010). Embora o presente trabalho não tenha avaliado diretamente a função endotelial de animais recebendo Caps na dieta, os resultados encontrados referentes à redução do rolamento e adesão de leucócitos, bem como a capacidade de Caps em atenuar a resposta inflamatória sistêmica são indícios que podem sugerir uma melhora da função endotelial induzida por Caps nesses animais, ação que, como já demonstrado por outros autores, pode ter a participação de TRPV1.

Para além disso, Tsuji e colaboradores mostraram que a ativação de TRPV1 por dois diferentes agonistas, Caps e SA13353, reduziu os níveis séricos e a expressão hepática de TNF e IL-1 β em camundongos previamente tratados com LPS, sendo que esses efeitos não foram reproduzidos em animais nocautes para TRPV1. Esses autores associaram esses efeitos à liberação de CGRP decorrente da ativação

de TRPV1 (Tsuji *et. al.*, 2010). Em concordância com esses achados, no presente trabalho demonstrou-se que a ingestão crônica de Caps provocou a redução dos níveis de TNF e IL-1 β no tecido hepático de animais APoE^{-/-}. Considerando que esses resultados foram uma reprodução daqueles relatados pelo grupo de Tsuji e que, no trabalho desses autores, o efeito inibitório de Caps em relação a essas citocinas foi associado à atividade de TRPV1, é razoável supor que também aqui, os efeitos de Caps estejam ligados à ativação desse receptor.

Resultados produzidos por Ma e colaboradores também mostraram de forma consistente o envolvimento de TRPV1 com a atenuação do quadro de aterosclerose. Esses autores utilizaram animais ApoE^{-/-} e duplo nocautes ApoE^{-/-}/TRPV1^{-/-} que receberam uma dieta hiperlipídica suplementada com 0,01% de Caps. Tais estudos revelaram que camundongos ApoE^{-/-} com ativação crônica de TRPV1 reduziram de forma significativa o acúmulo de lipídeos nas lesões ateroscleróticas da aorta, efeito que não foi visto em animais duplo nocautes. Ademais, duplo nocautes que receberam Caps na dieta apresentaram lesões ateroscleróticas similares àqueles que receberam apenas dieta aterogênica. Adicionalmente, mostraram que a administração de Caps reduziu marcadamente gotículas lipídicas intracelulares em células musculares lisas vasculares (CMLV) derivadas de animais C57BL/6 e estimuladas com LDLox, mas não naquelas derivadas dos TRPV1^{-/-}. Observaram, além do mais, que a diminuição do conteúdo lipídico nessas células foi revertida após administração de CZE. Ainda nesse estudo, foi demonstrado que os efeitos da ativação de TRPV1 em reduzir a carga intracelular de lipídeos *in vitro* foram consequência de um estímulo do efluxo de colesterol via ABCA1 e da redução de sua captação, embora os autores tenham avaliado o influxo de colesterol mediado pela proteína 1, relacionada ao receptor de LDL (LRP1), e não por CD36 ou SR-A. Um achado importante desse trabalho foi a revelação da colocalização de ABCA1 e TRPV1 na superfície da aorta de animais C57BL6 (Ma *et al.*, 2011). Todas essas conclusões apontam para um papel de TRPV1 em atenuar a aterosclerose e ligam de forma bastante crível a ação desse receptor na modulação da formação de células espumosas derivadas de CMLV.

Além dos achados supracitados, os quais permitem associar a ativação de TRPV1 por Caps aos seus efeitos benéficos em células espumosas, estudos prévios também já atentaram para o fato de que elevados níveis citosólicos de cálcio suprimiram o acúmulo de lipídeos em adipócitos e reduziram os níveis de colesterol e triglicérides nessas células, o que reforça a ideia de que o influxo de cálcio mediado

pela ativação de TRPV1 pode atuar modulando o conteúdo lipídico celular (Miller *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 2000).

Dessa maneira, é aceitável crer que os efeitos de Caps na regulação da formação de células espumosas derivadas de macrófagos também estejam relacionados a sua ação sobre TRPV1.

Apesar de não ter sido pesquisada por nós neste trabalho, a atividade antioxidante de TRPV1 demonstrada por outros estudos, como previamente relatado, também pode contribuir para a melhora de parâmetros relacionados à função vascular, como o recrutamento celular, a produção de citocinas pró-inflamatórias e a formação de células espumosas. Isso porque a exposição a LDLox modula uma série de genes pró-inflamatórios, tais como TNF, IL-1 β e IL-6, os quais podem contribuir para aumentar o recrutamento de monócitos, o que, por sua vez, geraria um incremento na formação de células espumosas. Além disso, macrófagos ativados secretam agentes oxidantes, como MPO, a qual incrementa a modificação oxidativa das LDL presas na íntima, o que aumenta o pool desses agentes pró-inflamatórios disponíveis para a captação celular mediada pelos scavengers CD36 e SR-A. Assim, moléculas com efeito antioxidante poderiam atenuar a modificação oxidativa de LDL e induzir, desse modo, não apenas uma melhora na função vascular, com conseqüente redução do recrutamento de monócitos para os locais de lesão, como também diminuir a captação de LDLox induzida por scavengers, como foi demonstrado neste estudo, visto que esses receptores só reconhecem formas modificadas da lipoproteína (Daugherty *et al.*, 2005; Takahashi, 2019).

Salienta-se que, além da redução do recrutamento celular de leucócitos, este estudo mostrou que a ingestão de Caps gerou um menor conteúdo de monócitos e macrófagos na lesão e no tecido hepático, em associação a uma menor atividade de MPO, o que poderia ser tomado como um indício da sua ação antioxidante capaz de minimizar a oxidação de LDL e, portanto, de sua capacidade em induzir a expressão de CD36 e SR-A. Destaca-se que a redução da expressão de CD36 *in vivo* foi associada à atenuação das lesões ateroscleróticas em animais que consumiram uma dieta suplementada com Caps. Soma-se a isso, o fato de que a inibição induzida por esse fitoquímico nos níveis proteicos de ambos os scavengers em células BMDM foi responsável por reduzir a carga celular de LDLox.

Deste modo, a análise combinada dos dados aqui apresentados com aqueles disponibilizados por estudos prévios sugere que a redução da expressão de

receptores scavengers de influxo induzida por Caps pode inibir a formação de células espumosas, e que isso pode ser uma consequência da menor atividade de PPAR α . Esse dado suporta a ideia de que agentes capazes de reduzir a formação de metabólitos de LDLox conhecidos por estimular a atividade de PPAR α podem, de fato, reduzir a expressão de CD36 e SR-A, o que, novamente, nos permite associar os efeitos de Caps na modulação da formação de células espumosas a TRPV1, e não a PPAR α .

9. Conclusão

Neste trabalho, confirmou-se a ação ateroprotetora da ingestão crônica de Caps em animais ApoE^{-/-}. Os dados aqui demonstrados ligam esse efeito principalmente à atividade anti-inflamatória de Caps, a qual poderia ser consequência, pelo menos em parte, da sua capacidade em atenuar a formação de células espumosas, principais responsáveis pelo desencadeamento da resposta inflamatória responsável pela evolução da lesão para estágios mais complexos.

Esse efeito foi demonstrado em duas diferentes linhagens de macrófagos, e a análise comparativa da ação de Caps nos dois tipos celulares leva a crer que, embora Caps tenha demonstrado o potencial de induzir a via PPAR γ e estimular, através dela, o efluxo de colesterol, esse efeito só é proeminente em células que não apresentam expressão de TRPV1 e provavelmente não constitui o mecanismo de ação pelo qual Caps primordialmente exerce seus efeitos nos macrófagos *in vivo*.

Essa hipótese se explica pelo fato de que, em células derivadas da medula óssea de animais C57BL6, os quais expressam TRPV1, como usualmente ocorre em células não modificadas, os efeitos de Caps se dão principalmente através da inibição das vias de influxo de colesterol. Considerando que esse mesmo resultado é visto nas células expostas à GW9662 e ainda que a adição de CZE às mesmas culturas reverte esse efeito, não se pode creditar o papel de Caps como agente inibidor da captação de LDLox à ativação de PPAR γ .

Dessa forma, os dados obtidos neste estudo, analisados em conjunto, inviabilizam a ideia de que as ações de Caps na modulação da formação de células espumosas se devem principalmente à sua capacidade em induzir a via PPAR γ e, ao contrário, tornam plausível supor que os efeitos obtidos são consequência, principalmente, da sinalização induzida pela ativação de TRPV1.

Se os efeitos da sinalização desencadeada por TRPV1 após sua ativação por Caps em células espumosas, são decorrentes da capacidade desse fitoquímico em modular diretamente as vias reguladoras da expressão de CD36 e SR-A, ou se a redução da expressão desses scavengers é uma resposta ao potencial antioxidante atribuído a Caps, o qual poderia minimizar os efeitos deletérios da LDLox sobre eles, são respostas que só podem ser esclarecidas através de estudos que investiguem melhor essas vias.

10. Referências Bibliográficas

- AHUJA, K. D. et al. Effects of capsaicin, dihydrocapsaicin, and curcumin on copper-induced oxidation of human serum lipids. **J Agric Food Chem**, v. 54, n. 17, p. 6436-9, Aug 23 2006. ISSN 0021-8561 (Print)0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf061331j> >.
- AIELLO, R. J. et al. Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 22, n. 4, p. 630-7, Apr 1 2002. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- ALAARG, A. et al. Multiple pathway assessment to predict anti-atherogenic efficacy of drugs targeting macrophages in atherosclerotic plaques. **Vascul Pharmacol**, v. 82, p. 51-9, Jul 2016. ISSN 1537-1891. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2016.04.006> >.
- ALUGANTI NARASIMHULU, C. et al. Atherosclerosis - do we know enough already to prevent it? **Curr Opin Pharmacol**, v. 27, p. 92-102, Apr 2016. ISSN 1471-4892. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2016.02.006> >.
- AVERILL, L. E.; MEAGHER, R. C.; GERRITY, R. G. Enhanced monocyte progenitor cell proliferation in bone marrow of hyperlipemic swine. **Am J Pathol**, v. 135, n. 2, p. 369-77, Aug 1989. ISSN 0002-9440 (Print)0002-9440. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- BABAEV, V. R. et al. Reduced atherosclerotic lesions in mice deficient for total or macrophage-specific expression of scavenger receptor-A. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, n. 12, p. 2593-9, Dec 2000. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11116058> >.
- BADIMON, L.; VILAHUR, G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. **J Intern Med**, v. 276, n. 6, p. 618-32, Dec 2014. ISSN 0954-6820. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/joim.12296> >.
- BALDAN, A. et al. Deletion of the transmembrane transporter ABCG1 results in progressive pulmonary lipidosis. **J Biol Chem**, v. 281, n. 39, p. 29401-10, Sep 29 2006. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M606597200> >.
- BORRADAILE, N. M. et al. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. **J Lipid Res**, v. 47, n. 12, p. 2726-37, Dec 2006. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16960261> >.
- CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816-24, Oct 23 1997. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/39807> >.
- CHANG, T. Y. et al. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 22, p. 129-57, 2006. ISSN 1081-0706. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16753029> >.

CHEN, K. S. et al. Capsaicin protects endothelial cells and macrophage against oxidized low-density lipoprotein-induced injury by direct antioxidant action. **Chem Biol Interact**, v. 228, p. 35-45, Feb 25 2015. ISSN 0009-2797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.01.007> >.

CHENG, L. C. et al. alpha-Lipoic acid ameliorates foam cell formation via liver X receptor alpha-dependent upregulation of ATP-binding cassette transporters A1 and G1. **Free Radic Biol Med**, v. 50, n. 1, p. 47-54, Jan 1 2011. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.706> >.

CHOI, S. E. et al. Capsaicin attenuates palmitate-induced expression of macrophage inflammatory protein 1 and interleukin 8 by increasing palmitate oxidation and reducing c-Jun activation in THP-1 (human acute monocytic leukemia cell) cells. **Nutr Res**, v. 31, n. 6, p. 468-78, Jun 2011. ISSN 0271-5317. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2011.05.007> >.

COMBADIÈRE, C. et al. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytes and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. **Circulation**, v. 117, n. 13, p. 1649-57, Apr 2008. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18347211> >.

DAUGHERTY, A. et al. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokine regulation of macrophage functions in atherogenesis. **J Lipid Res**, v. 46, n. 9, p. 1812-22, Sep 2005. ISSN 0022-2275 (Print)0022-2275. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.R500009-JLR200> >.

DUEWELL, P. et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1357-61, Apr 29 2010. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature08938> >.

EMINI VESELI, B. et al. Animal models of atherosclerosis. **Eur J Pharmacol**, v. 816, p. 3-13, Dec 2017. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28483459> >.

FEBBRAIO, M.; GUY, E.; SILVERSTEIN, R. L. Stem cell transplantation reveals that absence of macrophage CD36 is protective against atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 12, p. 2333-8, Dec 2004. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/01.atv.0000148007.06370.68> >.

FEBBRAIO, M. et al. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. In: (Ed.). **J Clin Invest**, v.105, 2000. p.1049-56. ISBN 0021-9738 (Print).

FENG, Y. et al. Inhibition of LPS-induced TNF-alpha production by calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cultured mouse peritoneal macrophages. **Life Sci**, v. 61, n. 20, p. PI 281-7, 1997. ISSN 0024-3205 (Print)0024-3205. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ÁVILA, D.L.

GOMES, R. N. et al. Calcitonin gene-related peptide inhibits local acute inflammation and protects mice against lethal endotoxemia. **Shock**, v. 24, n. 6, p. 590-4, Dec 2005. ISSN 1073-2322 (Print)1073- 2322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GOOSSENS, P. et al. Myeloid type I interferon signaling promotes atherosclerosis by stimulating macrophage recruitment to lesions. **Cell Metab**, v. 12, n. 2, p. 142-53, Aug 4 2010. ISSN 1550-4131. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2010.06.008> >.

HAKA, A. S. et al. Macrophages create an acidic extracellular hydrolytic compartment to digest aggregated lipoproteins. **Mol Biol Cell**, v. 20, n. 23, p. 4932-40, Dec 2009. ISSN 1939-4586. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812252> >.

HAN, J. et al. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. **J Biol Chem**, v. 272, n. 34, p. 21654-9, Aug 22 1997. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HANDBERG, A. et al. Soluble CD36 (sCD36) clusters with markers of insulin resistance, and high sCD36 is associated with increased type 2 diabetes risk. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 4, p. 1939-46, Apr 2010. ISSN 0021-972x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2009-2002> >.

HARZENETTER, M. D. et al. Negative regulation of TLR responses by the neuropeptide CGRP is mediated by the transcriptional repressor ICER. **J Immunol**, v. 179, n. 1, p. 607-15, Jul 1 2007. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HASHIZUME, M.; MIHARA, M. Atherogenic effects of TNF-alpha and IL-6 via up-regulation of scavenger receptors. **Cytokine**, v. 58, n. 3, p. 424-30, Jun 2012a. ISSN 1043-4666. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2012.02.010> >.

HASHIZUME, M.; MIHARA, M. Blockade of IL-6 and TNF-alpha inhibited oxLDL-induced production of MCP-1 via scavenger receptor induction. **Eur J Pharmacol**, v. 689, n. 1-3, p. 249-54, Aug 15 2012b. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.05.035> >.

HEO, K. S.; FUJIWARA, K.; ABE, J. Shear stress and atherosclerosis. **Mol Cells**, v. 37, n. 6, p. 435-40, Jun 2014. ISSN 1016-8478. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.14348/molcells.2014.0078> >.

HERIJGERS, N. et al. Effect of human scavenger receptor class A overexpression in bone marrow-derived cells on lipoprotein metabolism and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice. **J Lipid Res**, v. 41, n. 9, p. 1402-9, Sep 2000. ISSN 0022-2275 (Print)0022-2275. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HILTUNEN, T. P. et al. Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein, and scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lesions: marked induction of scavenger receptor and VLDL receptor expression during lesion development. **Circulation**, v. 97, n. 11, p. 1079-86, Mar 1998. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9531255> >.

ÁVILA, D.L.

HUANG, J. T. et al. Interleukin-4-dependent production of PPAR- γ ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. **Nature**, v. 400, n. 6742, p. 378, 1999-07-22 1999. ISSN 1476-4687/1476-4687. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/22572> >.

HUANG, W. et al. Capsaicinoids but not their analogue capsinoids lower plasma cholesterol and possess beneficial vascular activity. **J Agric Food Chem**, v. 62, n. 33, p. 8415-20, Aug 20 2014. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf502888h> >.

HUANG, Z. S.; CHIANG, B. L. Correlation between serum lipid profiles and the ratio and count of the CD16+ monocyte subset in peripheral blood of apparently healthy adults. **J Formos Med Assoc**, v. 101, n. 1, p. 11-7, Jan 2002. ISSN 0929-6646 (Print)0929-6646. Disponível em: < <http://dx.doi.org/>>.

JANSSENS, P. L. et al. Acute effects of capsaicin on energy expenditure and fat oxidation in negative energy balance. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e67786, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23844093> >.

KAMEI, M.; CARMAN, C. V. New observations on the trafficking and diapedesis of monocytes. **Curr Opin Hematol**, v. 17, n. 1, p. 43-52, Jan 2010. ISSN 1065-6251. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/MOH.0b013e3283333949> >.

KANG, J. H. et al. Capsaicin, a spicy component of hot peppers, modulates adipokine gene expression and protein release from obese-mouse adipose tissues and isolated adipocytes, and suppresses the inflammatory responses of adipose tissue macrophages. **FEBS Lett**, v. 581, n. 23, p. 4389-96, Sep 18 2007. ISSN 0014-5793 (Print)0014-5793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2007.07.082> >.

KENNEDY, M. A. et al. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. **Cell Metab**, v. 1, n. 2, p. 121-31, Feb 2005. ISSN 1550-4131 (Print)1550-4131. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2005.01.002> >.

KIM, C. S. et al. Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. **Cell Signal**, v. 15, n. 3, p. 299-306, Mar 2003. ISSN 0898-6568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531428> >.

KLUCKEN, J. et al. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 2, p. 817-22, Jan 18 2000. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/>>.

KONSTANTINOV, I. E.; MEJEVOI, N.; ANICHKOV, N. M. Nikolai N. Anichkov and his theory of atherosclerosis. **Tex Heart Inst J**, v. 33, n. 4, p. 417-23, 2006. ISSN 0730-2347 (Print)0730-2347. Disponível em: < <http://dx.doi.org/>>.

KUNJATHOOR, V. V. et al. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. **J Biol Chem**, v. 277, n. 51, p. 49982-8, Dec 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12376530> >.

ÁVILA, D.L.

- KURAKULA, K. et al. Nuclear Receptors in atherosclerosis: a superfamily with many 'Goodfellas'. **Mol Cell Endocrinol**, v. 368, n. 1-2, p. 71-84, Apr 10 2013. ISSN 0303-7207. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.05.014> >.
- LANDA, J. I. et al. Somatostatin reduces the levels of tumor necrosis factor alpha in a rat model of endotoxemia induced by lipopolysaccharide. **Res Exp Med (Berl)**, v. 195, n. 5, p. 317-25, 1995. ISSN 0300-9130 (Print)0300-9130. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- LEGEIN, B. et al. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 20, p. 3847-69, Oct 2013. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23430000> >.
- LI, A. C.; GLASS, C. K. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. **Nat Med**, v. 8, n. 11, p. 1235-42, Nov 2002. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12411950> >.
- LI, Q.; LIU, Y.; CHEN, L. Effects of PPAR γ agonist decreasing the IL-1 B , IL-6 and TNF- α content in rats on focal cerebral ischemia-reperfusion injury. 2019. Disponível em: < <https://pdfs.semanticscholar.org/9ac9/a8a14ee0f9cef88f037e0fcbe1d5711dbc1a.pdf> >.
- LIANG, Y. T. et al. Capsaicinoids lower plasma cholesterol and improve endothelial function in hamsters. **Eur J Nutr**, v. 52, n. 1, p. 379-88, Feb 2013. ISSN 1436-6207. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-012-0344-2> >.
- LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 9, p. 2045-51, Sep 2012. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.108.179705> >.
- LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v. 105, n. 9, p. 1135-43, Mar 5 2002. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- LOUGHEED, M. et al. High affinity saturable uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages from mice lacking the scavenger receptor class A type I/II. **J Biol Chem**, v. 272, n. 20, p. 12938-44, May 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9148899> >.
- LUO, D. et al. Transient receptor potential vanilloid 1-mediated expression and secretion of endothelial cell-derived calcitonin gene-related peptide. **Regul Pept**, v. 150, n. 1-3, p. 66-72, Oct 9 2008. ISSN 0167-0115 (Print)0167-0115. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2008.05.007> >.
- LUO, X. J.; PENG, J.; LI, Y. J. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. **Eur J Pharmacol**, v. 650, n. 1, p. 1-7, Jan 10 2011. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.074> >.

ÁVILA, D.L.

MA, L. et al. Activation of TRPV1 reduces vascular lipid accumulation and attenuates atherosclerosis. **Cardiovasc Res**, v. 92, n. 3, p. 504-13, Dec 1 2011. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvr245> >.

MANJUNATHA, H.; SRINIVASAN, K. Hypolipidemic and antioxidant effects of dietary curcumin and capsaicin in induced hypercholesterolemic rats. **Lipids**, v. 42, n. 12, p. 1133-42, Dec 2007. ISSN 0024-4201 (Print)0024-4201. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-007-3120-y> >.

MARTIN-FUENTES, P. et al. Individual variation of scavenger receptor expression in human macrophages with oxidized low-density lipoprotein is associated with a differential inflammatory response. **J Immunol**, v. 179, n. 5, p. 3242-8, Sep 1 2007. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MAXFIELD, F. R.; TABAS, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. **Nature**, v. 438, n. 7068, p. 612-21, Dec 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319881> >.

MCCARTY, M. F.; DINICOLANTONIO, J. J.; O'KEEFE, J. H. Capsaicin may have important potential for promoting vascular and metabolic health. **Open Heart**, v. 2, n. 1, p. e000262, 2015. ISSN 2053-3624. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1136/openhrt-2015-000262> >.

MCLAREN, J. E. et al. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy. **Prog Lipid Res**, v. 50, n. 4, p. 331-47, Oct 2011. ISSN 0163-7827. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2011.04.002> >.

MESTAS, J.; LEY, K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. **Trends Cardiovasc Med**, v. 18, n. 6, p. 228-32, Aug 2008. ISSN 1050-1738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcm.2008.11.004> >.

MILLER, C. W.; CASIMIR, D. A.; NTAMBI, J. M. The mechanism of inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation by prostaglandin F2alpha. **Endocrinology**, v. 137, n. 12, p. 5641-50, Dec 1996. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/endo.137.12.8940395> >.

MITTELSTADT, S. W. et al. Capsaicin-induced inhibition of platelet aggregation is not mediated by transient receptor potential vanilloid type 1. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 23, n. 1, p. 94-7, Jan 2012. ISSN 0957-5235. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/MBC.0b013e32834ddf18> >.

MOORE, K. J.; FREEMAN, M. W. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 8, p. 1702-11, Aug 2006. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/01.atv.0000229218.97976.43> >.

MOORE, K. J. et al. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. **Nat Med**, v. 7, n. 1, p. 41-7, Jan 2001. ISSN 1078-8956 (Print)1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/83328> >.

ÁVILA, D.L.

MOORE, K. J.; TABAS, I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 341-55, Apr 29 2011. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.005> >.

MURPHY, A. J. et al. ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. **J Clin Invest**, v. 121, n. 10, p. 4138-49, Oct 2011. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci57559> >.

NAGY, L. et al. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. **Cell**, v. 93, n. 2, p. 229-40, Apr 17 1998. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NAITO, M. et al. Coexpression of type I and type II human macrophage scavenger receptors in macrophages of various organs and foam cells in atherosclerotic lesions. **Am J Pathol**, v. 141, n. 3, p. 591-9, Sep 1992. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1519666> >.

NOZAKI, S. et al. Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. **J Clin Invest**, v. 96, n. 4, p. 1859-65, Oct 1995. ISSN 0021-9738 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

OREKHOV, A. N. et al. Development of Antiatherosclerotic Drugs on the basis of Natural Products Using Cell Model Approach. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2015, p. 463797, 2015. ISSN 1942-0994. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2015/463797> >.

OUT, R. et al. Macrophage ABCG1 deletion disrupts lipid homeostasis in alveolar macrophages and moderately influences atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 10, p. 2295-300, Oct 2006. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000237629.29842.4c> >.

PARK, Y. M. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. In: (Ed.). **Exp Mol Med**, v.46, 2014. p.e99-. ISBN 1226-3613 (Print)2092-6413 (Electronic).

PARK, Y. M.; FEBBRAIO, M.; SILVERSTEIN, R. L. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. In: (Ed.). **J Clin Invest**, v.119, 2009. p.136-45. ISBN 0021-9738 (Print)1558-8238 (Electronic).

PATEL, M. J.; BLAZING, M. A. Inflammation and atherosclerosis: disease modulating therapies. **Curr Treat Options Cardiovasc Med**, v. 15, n. 6, p. 681-95, Dec 2013. ISSN 1092-8464. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23979859> >.

PAULSON, K. E. et al. Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis. **Circ Res**, v. 106, n. 2, p. 383-90, Feb 5 2010. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.109.210781> >.

PENNINGS, M. et al. Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development. **FEBS Lett**, v. 580, n. 23, p. 5588-96, Oct 2006. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16935283> >.

PIECHOTA, M. et al. Highly upregulated expression of CD36 and MSR1 in circulating monocytes of patients with acute coronary syndromes. **Protein J**, v. 31, n. 6, p. 511-8, Aug 2012. ISSN 1572-3887. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10930-012-9431-8> >.

RAI, A. K.; DEBETTO, P.; SALA, F. D. Molecular regulation of cholesterol metabolism: HDL-based intervention through drugs and diet. **Indian J Exp Biol**, v. 51, n. 11, p. 885-94, Nov 2013. ISSN 0019-5189 (Print)0019-5189. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RIOS, F. J.; GIDLUND, M.; JANCAR, S. Pivotal role for platelet-activating factor receptor in CD36 expression and oxLDL uptake by human monocytes/macrophages. **Cell Physiol Biochem**, v. 27, n. 3-4, p. 363-72, 2011. ISSN 1421-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21471725> >.

ROBBINS, C. S. et al. Extramedullary Hematopoiesis Generates Ly-6Chigh Monocytes that Infiltrate Atherosclerotic Lesions. **Circulation**, v. 125, n. 2, p. 364-74, Jan 17 2012. ISSN 0009-7322 (Print)1524-4539 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.111.061986> >.

ROTHBLAT, G. H.; PHILLIPS, M. C. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. **Curr Opin Lipidol**, v. 21, n. 3, p. 229-38, Jun 2010. ISSN 1473-6535. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20480549> >.

SAKAGUCHI, H. et al. Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice. **Lab Invest**, v. 78, n. 4, p. 423-34, Apr 1998. ISSN 0023-6837. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9564887> >.

SHARMA, S. K.; VIJ, A. S.; SHARMA, M. Mechanisms and clinical uses of capsaicin. **Eur J Pharmacol**, v. 720, n. 1-3, p. 55-62, Nov 15 2013. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.10.053> >.

SHI, H. et al. Role of intracellular calcium in human adipocyte differentiation. **Physiol Genomics**, v. 3, n. 2, p. 75-82, Aug 9 2000. ISSN 1094-8341. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.2000.3.2.75> >.

SHIBATA, N.; GLASS, C. K. Regulation of macrophage function in inflammation and atherosclerosis. **J Lipid Res**, v. 50 Suppl, p. S277-81, Apr 2009. ISSN 0022-2275 (Print)0022-2275. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.R800063-JLR200> >.

SIEGEL-AXEL, D. et al. Platelet lipoprotein interplay: trigger of foam cell formation and driver of atherosclerosis. **Cardiovasc Res**, v. 78, n. 1, p. 8-17, Apr 2008. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18218686> >.

SU, M. et al. The In Vitro and In Vivo Anti-Inflammatory Effects of a Phthalimide PPAR- γ Agonist. In: (Ed.). **Mar Drugs**, v.15, 2017. ISBN 1660-3397 (Electronic).

SU, X.; WACHTEL, R. E.; GEBHART, G. F. Capsaicin sensitivity and voltage-gated sodium currents in colon sensory neurons from rat dorsal root ganglia. **Am J Physiol**, v. 277, n. 6, p. G1180-8, Dec 1999. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.1999.277.6.G1180> >.

SUDHAHAR, V.; SHAW, S.; IMIG, J. D. Mechanisms involved in oleamide-induced vasorelaxation in rat mesenteric resistance arteries. **Eur J Pharmacol**, v. 607, n. 1-3, p. 143-50, Apr 1 2009. ISSN 0014-2999 (Print)1879-0712 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SUN, F.; XIONG, S.; ZHU, Z. Dietary Capsaicin Protects Cardiometabolic Organs from Dysfunction. **Nutrients**, v. 8, n. 5, 2016. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3390/nu8050174> >.

SWIRSKI, F. K. et al. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. **J Clin Invest**, v. 117, n. 1, p. 195-205, Jan 2007. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci29950> >.

TABAS, I.; GARCIA-CARDENA, G.; OWENS, G. K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. **J Cell Biol**, v. 209, n. 1, p. 13-22, Apr 13 2015. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201412052> >.

TABAS, I.; WILLIAMS, K. J.; BORÉN, J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. **Circulation**, v. 116, n. 16, p. 1832-44, Oct 2007. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17938300> >.

TAKAHASHI. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals | SpringerLink. 2019. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s007950200023> >.

TAKANO, F. et al. Capsicum ethanol extracts and capsaicin enhance interleukin-2 and interferon-gamma production in cultured murine Peyer's patch cells ex vivo. **Life Sci**, v. 80, n. 17, p. 1553-63, Apr 3 2007. ISSN 0024-3205 (Print)0024-3205. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2007.01.031> >.

TALEB, S. Inflammation in atherosclerosis. **Arch Cardiovasc Dis**, v. 109, n. 12, p. 708-715, Dec 2016. ISSN 1875-2128. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27595467> >.

TALL, A. R. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. **J Intern Med**, v. 263, n. 3, p. 256-73, Mar 2008. ISSN 1365-2796. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18271871> >.

ÁVILA, D.L.

TANG, J. et al. Capsaicin attenuates LPS-induced inflammatory cytokine production by upregulation of LXRalpha. **Int Immunopharmacol**, v. 28, n. 1, p. 264-9, Sep 2015. ISSN 1567-5769. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.06.007> >.

TEUPSER, D. et al. CD36 mRNA expression is increased in CD14+ monocytes of patients with coronary heart disease. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 35, n. 5-6, p. 552-6, May 2008. ISSN 0305-1870. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04836.x> >.

TOMINAGA, M.; TOMINAGA, T. Structure and function of TRPV1. **Pflugers Arch**, v. 451, n. 1, p. 143-50, Oct 2005. ISSN 0031-6768 (Print)0031-6768. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-005-1457-8> >.

TSUJI, F. et al. Transient receptor potential vanilloid 1 agonists as candidates for anti-inflammatory and immunomodulatory agents. **Eur J Pharmacol**, v. 627, n. 1-3, p. 332-9, Feb 2010. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19878665> >.

VAN BERKEL, T. J. et al. Uptake and catabolism of modified LDL in scavenger-receptor class A type I/II knock-out mice. **Biochem J**, v. 331, n. Pt 1, p. 29-35, Apr 1 1998. ISSN 0264-6021 (Print)1470-8728 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VAN DIEPEN, J. A. et al. Interactions between inflammation and lipid metabolism: relevance for efficacy of anti-inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 228, n. 2, p. 306-15, Jun 2013. ISSN 1879-1484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23518178> >.

VAN ECK, M. et al. Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 9, p. 6298-303, Apr 30 2002. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.092327399> >.

_____. Effect of human scavenger receptor class A overexpression in bone marrow-derived cells on cholesterol levels and atherosclerosis in ApoE-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, n. 12, p. 2600-6, Dec 2000. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Macrophage ATP-binding cassette transporter A1 overexpression inhibits atherosclerotic lesion progression in low-density lipoprotein receptor knockout mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 4, p. 929-34, Apr 2006. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16456089> >.

VERCELLI, C. et al. Expression and functionality of TRPV1 receptor in human MCF-7 and canine CF.41 cells. **Vet Comp Oncol**, v. 13, n. 2, p. 133-42, Jun 2015. ISSN 1476-5810. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/vco.12028> >.

WALTENBERGER, B. et al. Natural Products to Counteract the Epidemic of Cardiovascular and Metabolic Disorders. **Molecules**, v. 21, n. 6, 2016. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21060807> >.

ÁVILA, D.L.

WANG, L.; WANG, D. H. TRPV1 gene knockout impairs postischemic recovery in isolated perfused heart in mice. **Circulation**, v. 112, n. 23, p. 3617-23, Dec 6 2005. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.105.556274> >.

WANG, N. et al. LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 6, p. 1310-6, Jun 2006. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/01.atv.0000218998.75963.02> >.

WANG, Y. et al. TRPV1 agonism inhibits endothelial cell inflammation via activation of eNOS/NO pathway. **Atherosclerosis**, v. 260, p. 13-19, May 2017. ISSN 0021-9150. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.03.016> >.

WEBER, C.; NOELS, H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. **Nat Med**, v. 17, n. 11, p. 1410-22, 2011. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2538> >.

WILLIAMS, K. J.; TABAS, I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 15, n. 5, p. 551-61, May 1995. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7749869> >.

World Health Organization (WHO). Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2014; WHO: Geneva, Switzerland, 2014.

World Health Organization (WHO). Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2014; WHO: Geneva, Switzerland, 2015.

XIE, C. et al. Lowbush blueberries inhibit scavenger receptors CD36 and SR-A expression and attenuate foam cell formation in ApoE-deficient mice. **Food Funct**, v. 2, n. 10, p. 588-94, Oct 2011. ISSN 2042-6496. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/c1fo10136f> >.

XU, J. et al. The PPAR γ agonist, rosiglitazone, attenuates airway inflammation and remodeling via heme oxygenase-1 in murine model of asthma. In: (Ed.). **Acta Pharmacol Sin**, v.36, 2015. p.171-8. ISBN 1671-4083 (Print)1745-7254 (Electronic).

YANG, D. et al. Activation of TRPV1 by dietary capsaicin improves endothelium-dependent vasorelaxation and prevents hypertension. **Cell Metab**, v. 12, n. 2, p. 130-41, Aug 4 2010. ISSN 1550-4131. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.015> >.

YU, X. H. et al. Foam cells in atherosclerosis. **Clin Chim Acta**, v. 424, p. 245-52, Sep 23 2013. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.06.006> >.

ÁVILA, D.L.

YUAN, Y.; LI, P.; YE, J. Lipid homeostasis and the formation of macrophage-derived foam cells in atherosclerosis. **Protein Cell**, v. 3, n. 3, p. 173-81, Mar 2012. ISSN 1674-800x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s13238-012-2025-6> >.

YVAN-CHARVET, L. et al. ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. **Science**, v. 328, n. 5986, p. 1689-93, Jun 25 2010. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1189731> >.

_____. Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. **J Clin Invest**, v. 117, n. 12, p. 3900-8, Dec 2007. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci33372> >.

ZHAO, J. F. et al. Activation of TRPV1 prevents OxLDL-induced lipid accumulation and TNF-alpha-induced inflammation in macrophages: role of liver X receptor alpha. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 925171, 2013. ISSN 0962-9351. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2013/925171> >.

ZHAO, Z. et al. Low-density lipoprotein from apolipoprotein E-deficient mice induces macrophage lipid accumulation in a CD36 and scavenger receptor class A-dependent manner. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 1, p. 168-73, Jan 2005. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000149145.00865.d9> >.

ZHU, Z. et al. TRP channels and their implications in metabolic diseases. **Pflugers Arch**, v. 461, n. 2, p. 211-23, Feb 2011. ISSN 0031-6768. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-010-0902-5> >.

ZIMARINO, M. et al. The dynamics of the coronary collateral circulation. **Nat Rev Cardiol**, v. 11, n. 4, p. 191-7, Apr 2014. ISSN 1759-5002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2013.207> >.