

**Melissa Tainan Silva Dias**

**Efeitos do Butirato de Sódio Sobre a Disfunção Endotelial Causada Por  
Lisofosfatidilcolina (LPC)**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Belo Horizonte**

**2020**

**Melissa Tainan Silva Dias**

**Efeitos do Butirato de Sódio Sobre a Disfunção Endotelial Causada Por  
Lisofosfatidilcolina (LPC)**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica e Imunologia do ICB – UFMG como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite

Co-Orientador: Dr. Edenil Costa Aguilár

**Belo Horizonte**

**2020**

043

Dias, Melissa Tainan Silva.

Efeitos do butirato de sódio sobre a disfunção endotelial causada por Lisofosfatidilcolina (LPC) [manuscrito] / Melissa Tainan Silva Dias. – 2020.  
103 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite. Co-Orientador: Dr. Edenil Costa Aguilar.

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

1. Bioquímica e imunologia. 2. Butiratos. 3. Endotélio/disfunção. 4. Lisofosfatidilcolinas. 5. Óxido Nítrico. I. Alvarez-Leite, Jacqueline Isaura. II. Aguilar, Edenil Costa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MELISSA TAINAN SILVA DIAS.** Aos dezoito dias do mês de novembro de 2020 às 14:00 horas, reuniu-se pela plataforma on line <http://meet.google.com/fpw-ijny-tax> no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Efeitos do Butirato de Sódio Sobre a Disfunção Endotelial Causada Por Lisofosfatidilcolina ", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. 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. Daniella Bonaventura (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Angélica Thomaz Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), 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, 18 de novembro de 2020.

*Daniella Bonaventura*

Dra. Daniella Bonaventura (UFMG)

*Angélica Thomaz Vieira*

Dra. Angélica Thomaz Vieira (UFMG)

*Edenil Costa Aguilar*

Dr. Edenil Costa Aguilar - Coorientador (UFMG)

*Jacqueline Isaura Alvarez Leite*

Dr. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (UFMG)

## Agradecimentos

Sempre é preciso saber quando uma etapa chega ao final e gostaria de agradecer aqueles que compartilharam essa jornada comigo.

Primeiramente agradeço a Olorum pela dadiva da vida. A todos os orixás e espíritos de luz que me acompanham por abrirem os meus caminhos, por tudo aquilo que eu conquistei e pelo que ainda vou conquistar.

Minha família... não há palavras que expressem a totalidade da minha gratidão e amor por vocês. Ao meu pai Beline, o meu herói, por estar ao meu lado em todos os momentos difíceis desses anos, por sonhar os meus sonhos e me apoiar incondicionalmente durante todo este processo, essa vitória não é minha... ela é nossa. A minha mãe Shanna pelo apoio espiritual, pelas lições e por me ensinar a continuar sempre em frente, apesar dos desafios e das adversidades. Ao meu irmão Matheus por ser o melhor irmão do mundo pelos conselhos, parceria, tretas, por me amar incondicionalmente apesar dos meus inúmeros defeitos e por ser, acima de tudo, meu melhor amigo. A minha vó Tereza pelas histórias, deliciosas comidas e pelo carinho silencioso com o qual cuidou e velou por mim durante todos esses anos. Aos meus tios queridos (em especial Diones, Lucia, *in memoriam* Iones) e suas respectivas famílias, obrigado pelas palavras de apoio e momentos divertidos.

Aos meus queridos amigos Arthur, Rafael, Gustavo, Felipe, Nassy, Nath, Sandra e Cris, por entenderem a minha loucura, pelos momentos divertidos e por serem quem são, os amo incondicionalmente.

Agradeço ao meu sensei Rodrigo Ferrari pelos ensinamentos, por auxiliar na minha evolução intelectual e por me presentear com o melhor grupo de amigos que eu poderia querer, em especial Jéssica Moreno, Samuel e Buxtex. Vocês se tornaram especiais para mim durante essa jornada, sou imensamente grata pelos ensinamentos e apoio.

A minha orientadora, Jacqueline Alvarez, por ser meu modelo de profissional e de orientadora... Sou imensamente grata pelos questionamentos, bolos de aniversário e por acima de tudo, por você ter lutado por mim em todos os momentos ao longo desses quase 6 anos de LABiN. Muita da minha garra, esforço e vontade de insistir nesse projeto foram inspirados por você e pela sua fé em mim apesar das minhas inúmeras falhas.

Ao meu co-orientador Edenil que foi um verdadeiro anjo na minha vida e para esse projeto. Sou muito grata pelas discussões, puxões de orelha, pelos lanches e por toda a leveza que você trouxe para esse processo de amadurecimento profissional e pessoal, espero algum dia me tornar pelo menos uma parte do grande cientista que você é.

Gratidão aos meus colegas de LABiN que me acompanham desde meus primeiros passos como IC. Cada um contribuiu de forma ativa para os momentos felizes e leves que eu vivi com vocês ao longo desses anos, são momentos que guardarei com muito carinho em minhas lembranças. Em especial quero agradecer a Paola e Penélope por serem minhas primeiras mamaihs científicas com seus conselhos, carinho, amizade e por me ajudarem ativamente no processo de lapidação pessoal e profissional. E também agradecer ao Wesley, vulgo kbça, por ter me apertado com suas perguntas científicas, pelos almoços, pelas discussões de artigo que mais pareciam briga de bar e por ter, muitas vezes, sido a mão silenciosa de Deus cuidando de mim quando estava aflita e cansada.

Aos Técnicos Maria Helena, Poliana, Jamil e Danielle. Muito do que eu fiz aqui não seria possível sem os ensinamentos e paciência de vocês.

Aos amigos e colaboradores do laboratório... da professora Luciana, agradeço imensamente pela ajuda e pelos momentos divertidos.

Aos alunos do laboratório de biologia vascular do professor Luciano, que não são apenas colaboradores e amigos, mas que se tornaram *Ohana*. Minha vida se tornou impecável por ter vocês nela.

Minha singela homenagem e imenso agradecimento aos animais que foram sacrificados para que esse projeto se tornasse possível.

Ao departamento de Bioquímica e imunologia. À seus funcionários pela oportunidade de realizar esse trabalho e prontidão em responder as muitas dúvidas burocráticas ao longo do mestrado.

Ao CNPq, pelo suporte durante todo o meu mestrado.

*“Todo indivíduo brilha naquilo em que aplica a maior parte  
Dos seus dias e entre todos se distingue”*

*(Eurípedes)*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1. Endotélio .....	23
2.2. Óxido Nítrico Sintase .....	24
2.3. Disfunção endotelial .....	27
2.4. Lisofosfatidilcolina .....	29
2.5. Butirato.....	31
2.6. Efeito do butirato via inibição de HDAC .....	31
2.7. Efeito do butirato via GPR.....	32
3. JUSTIFICATIVA.....	34
4. OBJETIVOS.....	35
5. METODOLOGIA.....	36
5.1. Modelo animal.....	36
5.2. Experimento de reatividade vascular :Obtenção e montagem dos anéis de aorta .....	36
5.3. Avaliação da integridade endotelial.....	37
5.4. Avaliação do efeito modulatório do butirato de sódio (NaBut) sobre a resposta vascular alterada pela Lisofosfatidilcolina .....	37
5.5. Avaliação dos mecanismos envolvidos no efeito modulatório do butirato de sódio sobre a função vascular .....	39
5.6. Avaliação da expressão proteica em aortas, por Western Blot.....	39
5.7. Experimentos com modelo celular: Linhagem celular endotelial.....	40
5.8. Grupos experimentais .....	41
5.9. Ensaio de viabilidade celular.....	41
5.10. Mensuração da produção endotelial de NO, superóxido e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ....	42
5.11. Mensuração do trânsito de Ca <sup>2+</sup> nas células endoteliais .....	43
5.12. Análise de expressão proteica em células endoteliais, por western blot	43

5.13.	Análises estatística e expressão dos dados.....	44
6.	RESULTADOS .....	45
6.1.	Tratamento com butirato de sódio reverte a disfunção endotelial induzida por LPC .....	45
6.2.	Avaliação da produção de NO, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e O <sub>2</sub> <sup>-</sup> de células endoteliais tratadas ou não com LPC e butirato de sódio.....	47
6.3.	O papel da nNOS sobre a reversão da disfunção endotelial promovida pelo butirato de sódio.....	53
6.4.	O tratamento com butirato altera a atividade de fosfatases e a ativação de ERK .....	61
6.5.	A inibição de Histona deacetilases não reverte a disfunção endotelial promovida por LPC.....	64
6.6.	Papel do receptor GPR43 na produção de NO, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	65
6.7.	O papel do cálcio no efeito apresentado por butirato de sódio .....	69
7.	DISCUSSÃO.....	73
8.	CONCLUSÃO .....	81
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	82
10.	ANEXOS .....	95
10.1.	Anexo 1 .....	95
10.2.	Anexo 2.....	97
10.3.	Anexo 3.....	99

## Resumo

A disfunção endotelial é uma condição crônica, que se inicia com o estresse oxidativo em resposta ao componente lisofosfatidilcolina (LPC), presente na LDL oxidada (LDL<sub>ox</sub>), sendo este um evento chave para a geração de uma resposta inflamatória podendo culminar no desenvolvimento da aterosclerose e suas complicações. É reconhecido o papel fundamental das óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) na manutenção da homeostase vascular. E que seu desacoplamento, está intimamente ligado à evolução clínica da disfunção endotelial. Na busca por novas substâncias que possam atuar na prevenção ou tratamento das comorbidades cardiovasculares, os estudos envolvendo componentes dietéticos tem se destacado. O butirato é produzido pelo organismo pela fermentação bacteriana de fibras no cólon e constitui a principal fonte energética para os colonócitos. Vários estudos nos últimos anos tem mostrado que o butirato possui efeitos anti-inflamatórios, anti-oxidantes, anti-aterogênicos, dentre outros efeitos. Uma vez que a disfunção endotelial é o evento inicial chave para o desenvolvimento de comorbidades cardiovasculares graves, e que o butirato possui propriedades que o tornam um excelente candidato para o estudo do seu efeito sobre a disfunção endotelial. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do butirato de sódio sobre a disfunção endotelial causada pela LPC. Para isso foram utilizados camundongos machos C57BL6/J, com 10-12 semanas de idade, os animais foram eutanasiados e sua aorta torácica foi dividida em anéis e montados em um banho de órgãos para a avaliação da reatividade vascular. Os resultados mostraram que o butirato, em sua menor concentração de teste, foi capaz de melhorar a disfunção endotelial causada por LPC e que esse efeito se deu pela ação de nNOS presente no endotélio. Foram realizados, também, estudos *in vitro* de citometria de fluxo e western blot com células endoteliais (EA.Hy926) pré tratadas com LPC e depois expostas a concentrações de butirato, e em seguida, estimuladas com ACh. O tratamento com butirato levou ao aumento na produção de NO, e na diminuição de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e anion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). O presente trabalho mostrou pela primeira vez que o tratamento com butirato de sódio foi capaz de reverter a disfunção endotelial causada por LPC por aumento de NO via normalização da atividade de nNOS, diminuição de ROS e pela regularização da

atividade de ERK1/2. Os resultados mostram que o tratamento com butirato de sódio impede a resposta disfuncional mediada por LPC.

**Palavras-chave:** Disfunção endotelial, lisofosfatidilcolina, butirato de sódio, óxido nítrico sintase neuronal e óxido nítrico.

## Abstract

Endothelial dysfunction is a chronic condition, which begins with oxidative stress in response to the lysophosphatidylcholine (LPC) component, present in oxidized LDL (LDL<sub>ox</sub>), which is a key event for the generation of an inflammatory response that may culminate in the development of atherosclerosis and its complications. The fundamental role of endothelial (eNOS) and neuronal (nNOS) nitric oxide synthases in maintaining vascular homeostasis is recognized and that its decoupling is closely linked to the clinical evolution of endothelial dysfunction. In the search for new substances that can act in the prevention or treatment of cardiovascular comorbidities, studies involving dietary components have stood out. Butyrate is produced by the body through bacterial fermentation of fibers in the colon and is the main energy source for colonocytes. Several studies in recent years have shown that butyrate has anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-atherogenic effects, among other effects. Since endothelial dysfunction is the key initial event for the development of severe cardiovascular comorbidities, and butyrate has properties that make it an excellent candidate for studying its effect on endothelial dysfunction. The aim of this work was to evaluate the effects of sodium butyrate on endothelial dysfunction caused by PCL. For this purpose, male C57BL6 / J mice, aged 10-12 weeks, were euthanized and their thoracic aorta was divided into rings and mounted in an organ bath to assess vascular reactivity. The results showed that butyrate, at its lowest test concentration, was able to improve endothelial dysfunction caused by LPC and that this effect was due to the action of nNOS present in the endothelium. Flow cytometry and western blot studies were also carried out with endothelial cells (EA.Hy926) pre-treated with LPC and then exposed to butyrate concentrations, and then stimulated with ACh. The treatment with butyrate led to an increase in NO production, and a decrease in hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). The present study showed for the first time that treatment with sodium butyrate was able to reverse the endothelial dysfunction caused by LPC by increasing NO via normalization of nNOS activity, decreasing ROS and by regularizing the ERK1 / 2 activity. The results show that treatment with sodium butyrate prevents the dysfunctional response mediated by LPC.

**Keywords:** Endothelial dysfunction, lysophosphatidylcholine, sodium butyrate, nitric oxide neuronal synthase and nitric oxide.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ACh	Acetilcolina
ADMA	
AKT	Proteína cinase B (PKB)
◌AMP	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
°C	Grau centígrado
CaM	Calmodulina
DAF-DM	4-amino-5-methylamino-2'7'-difluorofluoresceína
DCF	2'7'-dichlorofluoresceína
DCV	Doenças cardiovasculares
DHE	Dihydroethidium Dihidroetidina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EA.hy926	Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana
EC <sub>50</sub>	Concentração que induz uma resposta correspondente a 50% do efeito máximo
EDRF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDTA	Ácido etileno diamino tetraácetico
E <sub>max</sub>	Concentração capaz de induzir o efeito máximo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
ERK1/2	Cinase regulada por sinal extracelular
FAD	Dinucleotideo de flavina e adenina
FMN	Mononucleotideo de flavina
FOXP3	Escurfina
◌GMP	Monofosfato cíclico de guanosina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
HUVEC	Células endoteliais umbilicais humanas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HBSS	Hank's balanced salt solution

HCl Ácido clorídrico  
HDAC Histonas deacetilases  
ICAM-1 Molécula de adesão intercelular  
IL interleucinas  
iNOS Óxido nítrico sintase induzível  
LABiN Laboratório de aterosclerose e bioquímica nutricional  
LBV Laboratório de biologia vascular  
LCAT Lecitina colesterol aciltransferase  
LDL Lipoproteína de baixa densidade  
LDLox LDL oxidada  
L-NMMA N-Metilarginina  
L-NNA N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginina  
LPC Lisofosfatidilcolina  
MAPK Cinase proteica ativada por mitogeno  
Mg Miligrama  
MKP-1 Cinase proteica ativada por mitogeno  
mM Milimolar  
mRNA Ácido ribonucleico mensageiro  
NADPH Fosfato dinucleotideo de nicotinamida e adenina  
NF-κB Fator nuclear kappa B  
nNOS Óxido nítrico sintase neuronal  
NOS Óxido nítrico sintase  
NO Óxido nítrico  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> Radical ânion superóxido  
OONO<sup>-</sup> Peroxinitrito  
PBS Solução de tampão fosfato  
PD2 Logaritmo de EC<sub>50</sub>  
pH Potencial hidrogeniônico  
PI Iodeto de propideo  
Pi3K Cinase fosfatidilinositol 3  
PKA Proteina quinase A  
PLA-2 Fosfolipase A2  
PMSF p-fenil-metilsulfonil fluoreto  
ROS Espécies reativas de oxigênio

SDS-PAGE Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel eletrophoresis  
SFB Soro fetal bovino  
SNAP S-nitroso-N-acetylpenicillamine  
SOD Superóxido dismutase  
STAT Via de sinalização STAT  
TBE Tampão tris borato  
TBS Tampão tris salino  
TLR Receptores semelhantes ao Toll  
TNF Fator de necrose tumoral  
TRIM 1-(2-trifluoromethylphenyl)imidazole  
Tris tris(hidroximetil)aminometano  
TSA Tricostatin A  
VCAM-1 Molecula de adesão vascular 1  
VSMC Células musculares vasculares lisas  
 $\mu\text{g}$  Micrograma  
 $\mu\text{M}$  Micromolar

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representação histológica de um corte sagital de aorta humana corada com hematoxilina e eosina.....	22
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da atividade da NOS ilustrando a formação de NO e L-citrulina a partir de L-arginina e O <sub>2</sub> , utilizando como cofatores o ferro (Fe), BH <sub>4</sub> , íons Ca <sup>2+</sup> , além da transferência de elétrons em uma reação envolvendo NADPH, FAD e FMN entre outros domínios redutase e oxigenase.....	24
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática demonstrando a formação da LPC pela fosfolipase A <sub>2</sub> (sPLA <sub>2</sub> ) a partir da LDL nativa.....	29
<b>Figura 4:</b> Figura esquemática da metodologia empregada no experimento de reatividade vascular demonstrando o tempo de exposição do vaso à LPC e NaBut.....	37
<b>Figura 5:</b> Figura esquemática do protocolo experimental utilizado nos experimentos de reatividade vascular demonstrando o tempo de exposição do vaso à LPC e NaBut.....	37
<b>Figura 6:</b> Figura esquemática da metodologia empregada nos experimentos <i>in vitro</i> demonstrando o tempo de exposição das células à LPC e ao NaBut.....	40
<b>Figura 7:</b> Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aortas com endotélio funcional no CT, LPC 10µM, LPC+BUT 0,1mM e LPC+BUT 0,5mM.....	45
<b>Figura 8:</b> Resposta contrátil induzida por fenilefrina em aortas com endotélio funcional no CT, LPC 10µM, LPC+BUT 0,1mM e LPC+BUT 0,5mM.....	46
<b>Figura 9:</b> Dosagem de NO em células tratadas com LPC e butirato de sódio. (A) estimuladas com ACh. (B) Co-incubadas com L-NNA.....	48
<b>Figura 10:</b> Delta da diferença das dosagens de NO na presença ou ausência de L-NNA em células tratadas com LPC e butirato de sódio.....	49
<b>Figura 11:</b> Dosagem de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em células tratadas com LPC e butirato de sódio. (A) estimuladas com ACh. (B) Co-incubadas com catalase.....	50
<b>Figura 12:</b> Delta da diferença das dosagens de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na presença ou ausência de catalase em células tratadas com LPC e butirato de sódio.....	51
<b>Figura 13:</b> Dosagem de O <sup>2-</sup> em células tratadas com LPC e butirato de sódio. (A) Estimuladas com ACh. (B) Co-incubadas com tiron++.....	52
<b>Figura 14:</b> Delta da diferença das dosagens de O <sup>2-</sup> na presença ou ausência de tiron++ em células tratadas com LPC e butirato de sódio.....	53
<b>Figura 15:</b> Expressão proteica de eNOS em aortas expostas a LPC na presença e ausência de butirato de sódio por western blot.....	54
<b>Figura 16:</b> Expressão proteica de eNOS fosforilada em Ser1177 em aortas expostas a LPC na presença e ausência de butirato de sódio por western blot.....	55

<b>Figura 17:</b> Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aortas com endotélio funcional no CT, TRIM, TRIM+LPC 10µM e TRIM+LPC+BUT 0,1mM.....	56
<b>Figura 18:</b> Dosagem de NO tratadas com LPC e butirato de sódio. Estimuladas com ACh. Em células inibidas com TRIM.....	57
<b>Figura 19:</b> Dosagem de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> tratadas com LPC e butirato de sódio. Estimuladas com ACh. Em células inibidas com TRIM.....	58
<b>Figura 20:</b> Dosagem de O <sup>2-</sup> em células tratadas com LPC e butirato de sódio. Estimuladas com ACh. Inibidas com TRIM.....	59
<b>Figura 21:</b> Expressão proteica de nNOS em células EA.Hy926 estimuladas com LPC na presença e ausência de butirato de sódio por western blot.....	60
<b>Figura 22:</b> Expressão proteica de nNOS fosforilada em Ser1142 em células EA.Hy926 estimuladas com LPC na presença e ausência de butirato de por western blot.....	60
<b>Figura 23:</b> Expressão proteica de ERK1/2 em células EA.Hy926 estimuladas com LPC na presença e ausência de butirato de sódio por western blot.....	62
<b>Figura 24:</b> Expressão proteica de ERK1/2 fosforilada em Thr177 em células EA.Hy926 estimuladas com LPC na presença e ausência de butirato de por western blot.....	62
<b>Figura 25:</b> Expressão proteica de MKP-1 em células EA.Hy926 estimuladas com LPC na presença e ausência de butirato de sódio por western blot.....	64
<b>Figura 26:</b> Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aortas com endotélio funcional no CT, TSA, TSA+LPC 10µM e TSA+LPC+BUT 0,1mM.....	65
<b>Figura 27:</b> Dosagem de NO em células inibidas com GLPG0974, tratadas com LPC e butirato de sódio; estimuladas com ACh.....	68
<b>Figura 28:</b> Dosagem de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em células inibidas com GLPG0974, tratadas com LPC e butirato de sódio; estimuladas com ACh.....	69
<b>Figura 29:</b> Dosagem de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> em células inibidas com GLPG0974, tratadas com LPC e butirato de sódio; estimuladas com ACh.....	70
<b>Figura 30:</b> Mobilização de cálcio durante estimulação com ACh em células endoteliais EA.Hy926 em células tratadas com LPC e butirato de sódio (A) Influxo de cálcio extracelular na presença LPC, butirato e cafeína como controle positivo. (B) Efluxo de cálcio do retículo endoplasmático para o citosol, na presença LPC, butirato e cafeína como controle positivo.....	72
<b>Figura 31:</b> Mobilização de cálcio durante estimulação com ACh em células endoteliais EA.Hy926 em células tratadas com GLPG0974. (A) Influxo de cálcio extracelular na ausência do receptor GPR43 tratadas com LPC, butirato e cafeína (10µM) como controle positivo. (B) Efluxo de cálcio do retículo endoplasmático para o citosol na inibição do receptor GPR43 na presença de LPC, butirato e cafeína (10µM) como controle positivo.....	74

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Valores de EMAX e PD2 dos resultados de relaxamento vascular.....	44
<b>Tabela 2:</b> Valores de EMAX e PD2 dos resultados de contratilidade vascular.....	45
<b>Tabela 4:</b> Valores de EMAX e PD2 dos resultados de relaxamento vascular na presença de TRIM.....	56
<b>Tabela 5:</b> Valores de EMAX e PD2 dos resultados de relaxamento vascular com a presença de TSA.....	66





## 1. INTRODUÇÃO

No presente, as doenças cardiovasculares (DCVs) permanecem sendo a principal causa de morbidade e mortalidade em um grande número de países ao redor do mundo. A disfunção endotelial é uma típica manifestação primária das dislipidemias, assim como a base patogênica de diversas DCVs, como a hipertensão, aterosclerose, doença coronariana, doença vascular cerebral isquêmica e doença vascular periférica. Diversos estudos sugerem uma crescente incidência destas doenças devido à epidemia de obesidade e do tempo de sobrevivência da população mundial (GENG et al., 2019).

A disfunção endotelial é um processo caracterizado pelo desbalanço entre a vasodilatação e vasoconstrição dependente do endotélio, e pode ser causada pela diminuição da produção de óxido nítrico (NO), devido ao desacoplamento das óxido nítrico sintases (NOS); pela diminuição da disponibilidade desse NO causada pelo estresse oxidativo derivado de um estado hiperlipidêmico; e ao antagonismo a esse NO por fatores contrateis derivados do endotélio, como mediadores pró-inflamatórios e moléculas de adesão (MORDI et al., 2016).

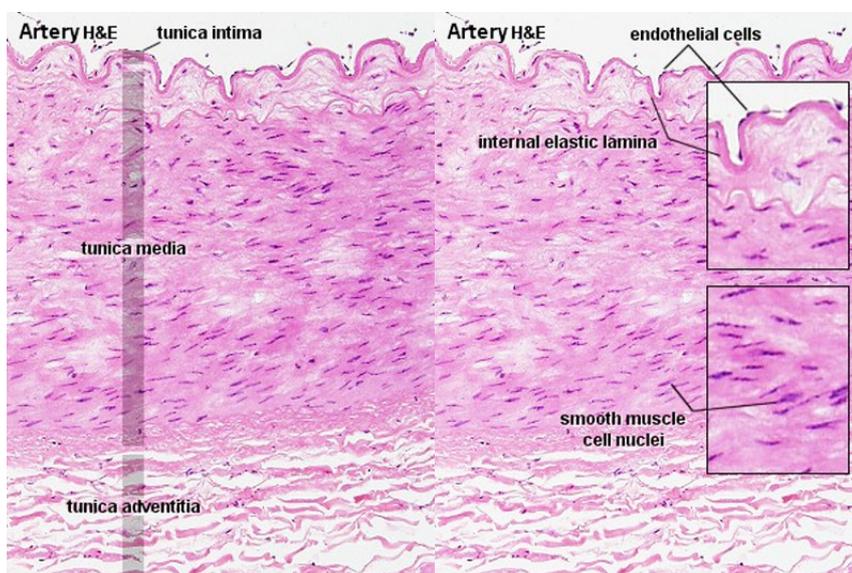
Desde que foi descoberto na década de 80 como um fator relaxante derivado do endotélio (IGNARRO et al., 1987), o NO ganhou destaque como uma das principais moléculas sinalizadoras do sistema cardiovascular e que mudanças na sua biodisponibilidade são de suma importância para o desenvolvimento da disfunção endotelial e sua progressão até desfechos mais severos (SANTOLINI, 2019).

Evidências epidemiológicas indicam que o aumento no consumo de fibras por meio da dieta melhora a função cardiovascular e reduz a inflamação sistêmica (ANDERSON et al., 2009). Dentre os metabólitos da fermentação de carboidratos pela microbiota intestinal está o butirato. Ele é um ácido graxo de cadeia curta (SCFAs) que influencia positivamente na saúde intestinal e cardiovascular pelos seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (AGUILAR et al., 2016; HOFFMAN; PETRIELLO; HENNING, 2016). Entretanto, o seu papel exato na regulação da disfunção endotelial e das células imunes é complexo, o que ainda é uma área aberta para pesquisa fundamental.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Endotélio

O endotélio consiste em uma única camada de células que separa o conteúdo do lúmen vascular de todos os tecidos subjacentes (Figura 1). O endotélio possui uma espessura  $\leq 1 \mu\text{m}$  e recobre uma área de superfície de  $4000 \text{ m}^2$  ao longo de todo o sistema vascular (CHLOPICKI, 2015). Ele é responsável por diversas funções fisiológicas incluindo o fornecimento de uma superfície não trombogênica, o controle da passagem de solutos e macromoléculas, assim como a modulação da contração da camada adjacente de células musculares lisas (VSMC – *vascular smooth muscle cells*)(DART; CHIN-DUSTING, 1999). Em outras palavras, o endotélio sadio é responsável pela manutenção de um ambiente ateroprotetor, caracterizado pela redução da agregação plaquetária, proliferação de VSCM, e de baixas taxas de adesão e diapedese de leucócitos através da parede vascular (GHIADONI et al., 2009).



**Figura 1.** Representação histológica de um corte sagital de aorta humana corada com hematoxilina e eosina. Representação em aumento de 400x. Adaptada de Hill *et al*, 2020.

As células endoteliais regulam diversas características fisiológicas e patofisiológicas pela síntese e secreção de múltiplas moléculas relacionadas ao

sangue e à matriz extracelular. Entre os fatores vasodilatadores produzidos estão o óxido nítrico (NO) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; IGNARRO; GROSS, 1978), a prostaciclina (HATANO et al., 1980) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDFH) (VANHOUTTE, 1996). Como fatores constritores temos o tromboxano A<sub>2</sub> (MONCADA; HIGGS, 1987), as espécies reativas de oxigênio (ROS) (MARTO et al., 1993), endotelinas (YANAGISAWA et al., 1988) e angiotensina II (Hanza *et al.* 1968). Esses fatores atuam em conjunto para a manutenção do equilíbrio entre estímulos vasoconstritores e vasodilatadores, o que corresponde ao estado de homeostase vascular.

Em função da sua localização, o endotélio está exposto constantemente a fatores adversos como oscilações do fluxo turbilhonar, alterações na pressão arterial, níveis elevados de lipídeos, etc. A manutenção dessas condições adversas, ocasionam alteração do equilíbrio, estabelecendo-se então a redução na produção dos fatores relaxantes e/ou aumento na produção dos fatores contrateis, levando ao desenvolvimento da disfunção endotelial e conseqüentemente a progressão de diversas doenças cardiovasculares como a aterosclerose (KONDO et al., 2009).

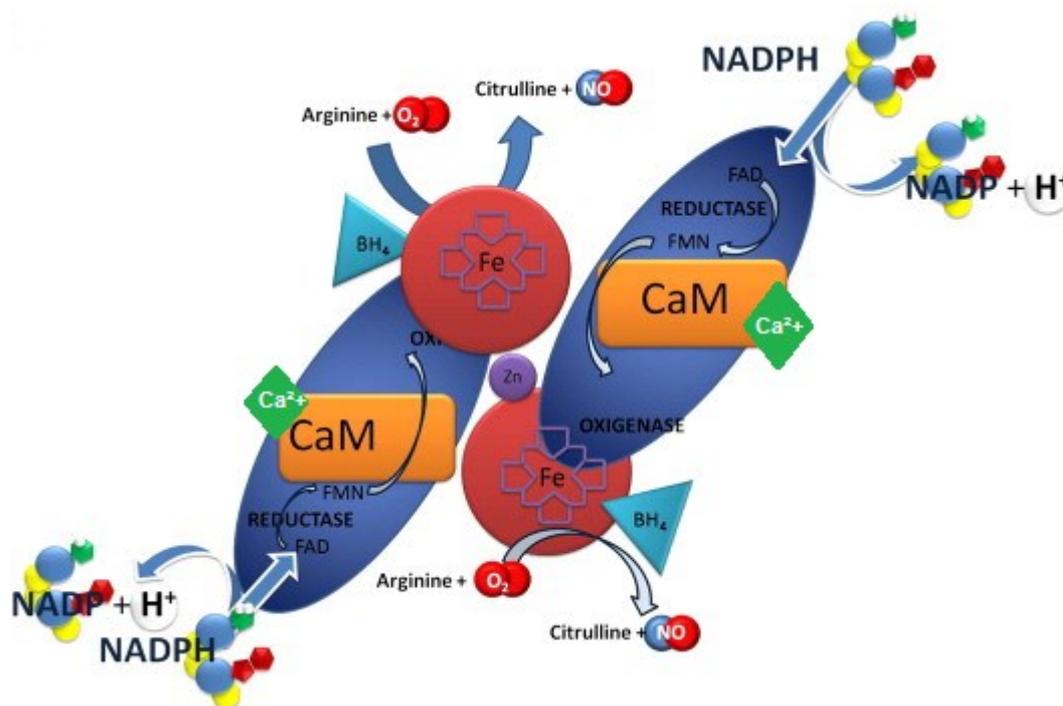
Diversos estudos demonstram de maneira consistente que o primeiro sinal endotelial frente às múltiplas lesões é a alteração na produção e/ou biodisponibilidade do NO (HADI; CARR, 2005; LI; FORSTERMANN, 2013; OEMAR; TSCHUDI, 1998; RAJENDRAN; RENGARAJAN, 2013). Entretanto, o caráter crônico e progressivo dessa condição, principalmente em manifestações mais tardias como na aterosclerose, dificulta o estabelecimento de uma relação causal entre as alterações na biodisponibilidade do NO e o início do processo patológico.

## **2.2. Óxido Nítrico Sintase**

O NO é um regulador imperativo do sistema cardiovascular e um mecanismo crítico na prevenção e progressão das doenças cardiovasculares. Além do seu papel como fator relaxante derivado do endotélio, o NO também é responsável por inibição da agregação plaquetária (FREEDMAN; SAUTER, 1999), inibição da adesão leucocitária (Ma *et al.* 1993) e modulação da contratilidade cardíaca (EBERMANN; SPILLMANN, 2008; YIN et al., 2017).

O NO é gerado por três diferentes isoformas da enzima NOS (*nitric oxide synthase*), que foram nomeadas de acordo com o local onde apareceram pela primeira vez, elas são conhecidas como NOS endotelial (eNOS ou NOS3), NOS neuronal (nNOS ou NOS1) e NOS induzível (iNOS ou NOS2). Sendo que a eNOS e a nNOS são isoformas constitutivas e a iNOS é induzida na presença de estímulos inflamatórios (FORSTERMANN; POLLOCK, 1994).

Todas as isoformas catalisam a formação de NO através da conversão de L-arginina e oxigênio molecular em L-citrulina e NO, utilizando como co-substrato NADPH e como cofatores dinucleótido de flavina e adenina (FAD), mononucleótido de flavina (FMN) e (6R)-5,6,7,8-tetrahydropterina (BH<sub>4</sub>). Todas as NOS são funcionais em formas de dímeros, transferindo elétrons do NADPH, via FAD e FMN no domínio redutase carboxi-terminal para o domínio heme oxigenase amino-terminal (MARON; MICHEL, 2012) (Figura 2).



**Figura 2.** Representação esquemática da atividade da NOS ilustrando a formação de NO e L-citrulina a partir de L-arginina e O<sub>2</sub>, utilizando como cofatores o ferro (Fe), BH<sub>4</sub>, íons Ca<sup>2+</sup>, além da transferência de elétrons em uma reação envolvendo NADPH, FAD e FMN entre outros domínios redutase e oxigenase. Adaptada de Maron *et al* 2012.

O aumento dos níveis intracelulares de Ca<sup>2+</sup> desencadeia sua ligação à calmodulina (CaM), levando a formação do complexo Ca<sup>2+</sup>/CaM, que por sua vez irá se ligar ao seu respectivo sítio na eNOS e nNOS. Esta ligação viabiliza o fluxo de

elétrons do NADPH no domínio redutase para o domínio oxidase (PIAZZA et al., 2012). A iNOS é altamente sensível a CaM mesmo em concentrações muito baixas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular devido a diferenças na estrutura de aminoácidos no sítio de ligação da CaM (CHOI; XIE, 1992). Sendo assim, a síntese de NO pelas isoformas constitutivas é dependente de estímulos que levem a flutuações do transiente de cálcio ao passo que a iNOS independe destes estímulos.

A eNOS é expressa, principalmente, em células endoteliais, mas também já foi detectada em cardiomiócitos, plaquetas, placenta humana e células epiteliais do rim (FORSTERMANN; POLLOCK, 1994). A eNOS pode ser ativada por alterações da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, mas seu principal mecanismo de ativação é pelo estresse de cisalhamento, que vai ativar quinases responsivas a estímulos físicos, que vão fosforilar a eNOS em sítios específicos para serina, treonina e tirosina (DAIBER et al., 2019). Em condições fisiológicas, a maior quantidade de NO produzida nas células endoteliais é derivada das reações catalisadas por eNOS. O NO produzido via eNOS leva a ativação de diversas vias incluindo a da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e proteína serina-treonina quinase B (AKT) (HONG et al., 2019). Diversos estudos observaram que em lesões ateroscleróticas iniciais há uma diminuição gradual dos níveis de expressão proteica de eNOS, resultando na diminuição da síntese de NO e na aceleração na progressão da lesão aterosclerótica (SCALIA; STALKER, 2002; XU; LU; SHI, 2015).

A nNOS foi primeiramente descrita em neurônios específicos no cérebro, onde foi relacionada as funções de aprendizado e neurogênese (ZHOU et al., 2018). Diversos estudos mostraram que ela também atua na modulação da função cardíaca (Danson *et al.* 2005; Zhang, 2019), da pressão arterial (Kurihara *et al.* 1998) e como EDRF pela produção de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (CAPETTINI; CORTES; LEMOS, 2010). A nNOS está localizada, predominantemente, próxima à membrana do retículo sarcoplasmático e está envolvida na manipulação do processo de liberação desse  $\text{Ca}^{2+}$  reticular (ZHANG et al., 2014). A função da nNOS é mediada pela via da Guanilato ciclase solúvel (GCs), guanosina monofosfato cíclica (GMPc) e pela proteína quinase G (PKG), que possui dentre os seus alvos, canais iônicos incluindo canais de sódio, canais de cálcio voltagem dependente e ATPase sensível ao potássio (CALABRESE et al., 2007). A elevação da concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  é necessária para que CaM possa interagir com a nNOS, levando a ativação

da nNOS por fosforilação, e conseqüentemente aumentando a produção de NO (ZHANG, 2017).

Embora tenha sido primariamente identificada em macrófagos, a expressão de iNOS pode ser estimulada em qualquer célula ou tecido, onde há a presença abundante de agentes indutores como lipopolissacarídeos bacterianos, citocinas e outros agentes pró-inflamatórios (FORSTERMANN; POLLOCK, 1994). A iNOS se encontra constantemente ativa, gerando grandes quantidades de NO por um período prologando de tempo, sendo limitada apenas pelo aumento da concentração de O<sub>2</sub> (Xie *et al.* 1992). O NO gerado vai levar a fragmentação do DNA, sendo esse um dos maiores efeitos citotóxicos do NO (WINK *et al.*, 2011).

Todas as isoformas estão envolvidas de alguma forma no processo de disfunção endotelial, assim como na progressão para um processo avançado de aterosclerose.

### **2.3. Disfunção endotelial**

A homeostase do endotélio vascular é mantida pelo firme equilíbrio entre processos de vasoconstrição e vasodilatação, trombogênese e anti-trombogênese, pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, e proliferativos e anti-proliferativos. A disfunção endotelial é caracterizada pelo aumento da vasoconstrição, aumento da agregação plaquetária e da adesividade endotelial levando a um estado pró-trombótico, proliferação da camada muscular lisa e aumento da inflamação vascular (YUYUN; NG; NG, 2018). A disfunção endotelial é um dos fatores chave envolvido nos mecanismos patofisiológicos das doenças macrovasculares. Fatores de risco significativos para o desenvolvimento da disfunção endotelial incluem diabetes, hiperlipidemia, hipertensão, tabagismo, homocisteinemia, envelhecimento e histórico familiar de doença cardíaca isquêmica (GIELIS *et al.*, 2011).

Um dos primeiros sinais para o desenvolvimento da disfunção endotelial é a diminuição da biodisponibilidade do NO. Os mecanismos que estão relacionados a essa deficiência incluem: diminuição da expressão ou atividade das NOS; desacoplamento das NOS pela ausência de cofatores ou substratos; aumento da reação do NO com as espécies reativas de oxigênio (ROS); e inibição endógena das NOS (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

A regulação das funções de eNOS e nNOS pela fosforilação de sítios proteicos específicos, tem sido intensamente estudada nas últimas décadas. Altos níveis de TNF- $\alpha$  na aterosclerose estão associados à *downregulation* de eNOS pela aceleração da degradação do seu RNAm e por aumentar a atividade de NADPH oxidase (ZHANG et al., 2014). A análise de sequências de aminoácidos dessas NOS constitutivas revelam motivos de consensos putativos para a fosforilação por proteína quinase A (PKA), Akt, PKC e pelo complexo Ca<sup>2+</sup>/CaM, sendo então fosforiladas em resíduos de serina, treonina e tirosina (FULTON; GRATTON; SESSA, 2001). Estudos mostram que a fosforilação de eNOS no sítio Thr495 diminui a síntese de NO (LUO et al., 2014; MOUNT; KEMP; POWER, 2007). Outros resultados demonstram que a fosforilação do sítio Ser852 na nNOS, resulta no aumento do dano celular pela facilitação da transferência de elétrons para o domínio oxigenase, acarretando no desacoplamento dessa enzima (LUO et al., 2014).

O desacoplamento do domínio redutase é usualmente relacionado à falta de L-arginina e/ou BH<sub>4</sub>, que são conhecidas por estimular a dimerização da enzima, resultando na monomerização e por isso no desacoplamento das NOS (GEBHART et al., 2019). Uma explicação plausível para esse fato é que a ligação da CaM possibilita a transferência de elétrons da ligação da NADPH no domínio redutase para o grupamento heme no centro do domínio oxigenase (MEZA et al., 2019). Na presença de L-arginina e oxigênio, os elétrons vão ser incorporados no grupamento guanidino da L-arginina levando a formação de NO e L-citrulina. Na ausência de L-arginina o oxigênio molecular vai ser o aceptor de elétrons se tornando O<sub>2</sub><sup>-</sup> (XIA et al., 1996). Alguns estudos observaram que a diminuição da disponibilidade de BH<sub>4</sub>, faz com que a transferência do segundo elétron fique muito lenta e assim o complexo oxiferroso vai se dissociar do ferro contido no grupamento heme, impossibilitando a formação de NO e favorecendo a formação de O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (GEBHART et al., 2019).

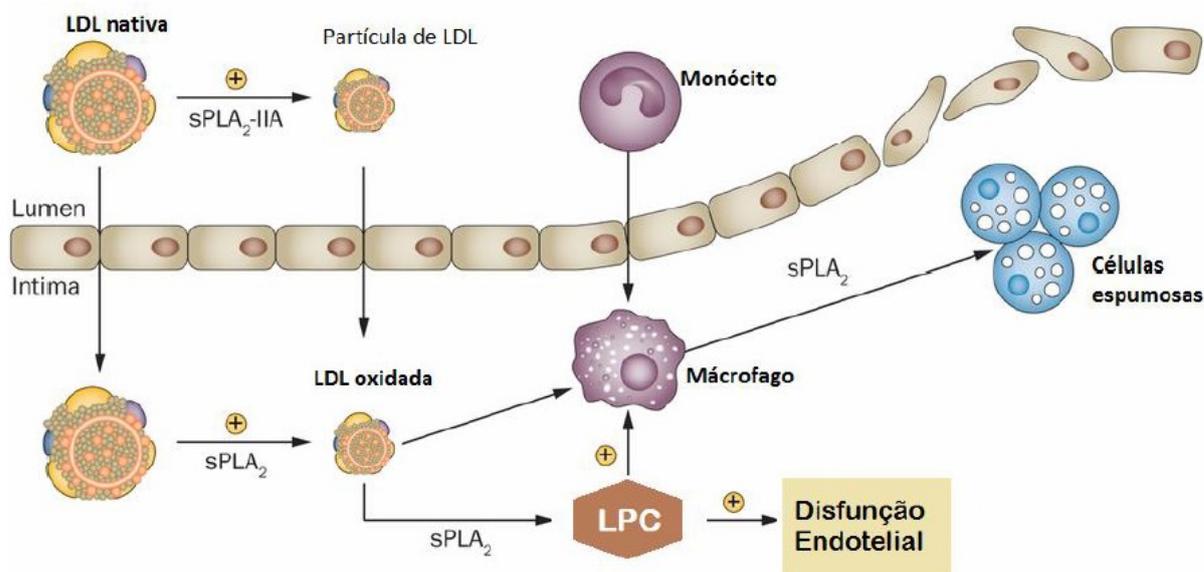
O aumento do estresse oxidativo por fatores como hiperglicemia e hipercolesterolemia, acarreta na geração exacerbada de ROS, principalmente de O<sub>2</sub><sup>-</sup> que se combina rapidamente com o NO, gerando as espécies reativas de nitrogênio (RNS), como o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), o que vai diminuir a biodisponibilidade do NO (STUEHR; POU; ROSEN, 2001). As reações entre o O<sub>2</sub><sup>-</sup> e o NO ocorrem em uma proporção três vezes mais rápida que a redução enzimática do superóxido pela

superóxido dismutase (SOD). Indicando que as concentrações citosolicas de  $O_2^-$  tem implicações significativas para a disfunção endotelial. O peroxinitrito é considerado um agente altamente oxidante com a habilidade de causar diversos desarranjos celulares, incluindo apoptose e nitração de proteínas em resíduos de tirosina (RADI, 2018).

Estudos demonstraram que derivados endógenos da guanidina-metilada de L-arginina desempenham um importante papel na patogênese de diversas doenças cardiovasculares incluindo a hipertensão e a aterosclerose (BODE-BÖGER et al., 1998; COOKE; OKA, 2001). Existem duas L-argininas metiladas que ocorrem naturalmente de maior importância: a dimetilarginina assimétrica (ADMA) e a N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina(L-NMMA). A ADMA e L-NMMA são inibidores endógenos das NOS e são derivadas da proteólise de resíduos de arginina metiladas de diversas proteínas (LUO et al., 2014). Alguns estudos sugerem que seu mecanismo de inibição se dá pela competição da ADMA e da L-NMMA pelo sítio de ligação com a L-arginina, mesmo em altas concentrações, levando a inibição da produção de NO (TRAN; OHASHI; WATANABE, 2000). Sabe-se que a presença de LDLox aumenta a síntese de ADMA (BOGER; BODE=BOGER, 2000).

#### **2.4. Lisofosfatidilcolina**

A lisofosfatidilcolina (LPC), também chamada de lisolecitinas, é uma classe de biomoléculas derivadas de lipídeos pela clivagem da fosfatidilcolina via a ação de fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e/ou pela transferência de ácidos graxos para o colesterol livre via lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) (DULLAART et al., 1993). A LPC é o maior componente da lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox). Ela possui a habilidade de iniciar ou amplificar diversos passos no processo de aterogênese pela sua capacidade de prejudicar a vasodilatação mediada pelo endotélio, aumentando a permeabilidade endotelial, estimulando a adesão e ativação de linfócitos, modificação da agregação plaquetária, etc (KOUGIAS et al., 2006). O aumento da concentração plasmática de LDL leva a sua transmigração para a camada íntima vascular, onde suas moléculas de fosfatidilcolina serão hidrolisadas pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub> solúvel (sPLA<sub>2</sub>), que por sua vez vai levar a formação de uma LDL repleta de LPC (Figura 3) (LAW et al., 2019).



**Figura 3:** Representação esquemática demonstrando a formação da LPC pela fosfolipase A<sub>2</sub> solúvel (sPLA<sub>2</sub>) a partir da LDL nativa. Adaptado de O'Donoghue *et al.* 2014.

O conteúdo de LPC aumenta na circulação por meio da LDL modificada, LDL degradada enzimaticamente e LDLox, o que vai acarretar na resistência à insulina induzida por ácidos graxos e na inibição da revitalização da camada endotelial (STÜBIGER *et al.*, 2012). A LPC pode ser reconhecida por receptores acoplados a proteína G (GPRs) e receptores do tipo Toll (TLRs), possuindo alta afinidade de ligação com o receptor GPR132 (G2A) que vai levar a ativação da proteína ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), acarretando no aumento da expressão de molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), aumento da molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) e diminuição da produção de NO, enfraquecendo a função vascular (KABAROWSKI *et al.*, 2001; PENG *et al.*, 2011; RADU *et al.*, 2004). A combinação da ativação de receptores TLR2 e TLR4 pela LPC pode ativar as vias de NF- $\kappa$ B e p38 MAPK, induzindo a produção de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\gamma$ , IL-6 e IL-5, assim como a ativação de caspases e aumento do influxo de Ca<sup>2+</sup> (LIU *et al.*, 2020; MAGALHÃES *et al.*, 2010).

Em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa com a linhagem de células endoteliais EA.hy926 e anéis de aorta de camundongos expostos a baixas doses de LPC, foi observada o aumento a fosforilação de nNOS, em sítio de inibição, e aumento da produção de ROS, concomitante a redução de NO

(CAMPOS-MOTA et al., 2017)(KOZINA et al., 2014). O que explica em parte o prejuízo na função endotelial.

## **2.5. Butirato**

As enzimas humanas são capazes de degradar apenas pequenas quantidades de ligações glicosídicas presentes nos carboidratos, tornando a sua quebra uma responsabilidade majoritária da microbiota intestinal. O metabolismo desses carboidratos não digeríveis gera uma variedade de produtos, dentre eles os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) (FU et al., 2019). Os SCFAs, principalmente acetato, propionato e butirato, são os principais produtos da fermentação anaeróbica da microbiota que coloniza o intestino grosso dos mamíferos, alcançando concentrações totais de 50-200mM no cólon humano (LOUIS; FLINT, 2017).

Dentre os SCFAs, o butirato tem recebido atenção especial devido aos seus efeitos benéficos sobre o metabolismo energético celular e sobre a homeostase intestinal (GUILLOTEAU et al., 2010). Embora ele seja o SCFA menos abundante (aproximadamente 60% de acetato, 25% de propionato e 15% de butirato em humanos), o butirato é a maior fonte de energia para os colonócitos (CHEN et al., 2015; JACOBI; ODLE, 2012). Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* tem mostrado que o butirato tem um papel fundamental na prevenção e inibição do câncer de cólon (Segain et al. 2000; Hamer et al. 2008), apresenta efeitos imunomodulatórios (CHANG et al., 2019; TANAKA et al., 2016), reduz a inflamação (LEONEL; ALVAREZ-LEITE, 2012) e tem efeito anti-aterosclerótico (AGUILAR et al., 2016). O butirato modula as respostas biológicas do hospedeiro atuando por meio da inibição de histonas desacetilazes (HDAC) e/ou se ligando a diversos receptores específicos acoplados a proteína G (GPCRs).

## **2.6. Efeito do butirato via inibição de HDAC**

As HDCAs são uma classe de enzimas que removem os grupos acetil das  $\epsilon$  – N- acetil lisina das histonas, permitindo que as histonas envolvam o DNA de forma mais firme (CHOUDHARY et al., 2009). Dentre os SCFAs, o butirato é o mais potente inibidor da atividade de HDACs tanto *in vitro* quanto *in vivo* (LIU et al., 2018).

As HDCAs são uma família de proteínas evolutivamente conservadas que incluem 4 classes: I (HDAC1-8), II (HDAC9-10), III (SIRT 1-7) e IV (HDAC11), que estão presentes no citoplasma e no núcleo das células (GRAY; EKSTRÖM, 2001).

A inibição da atividade de HDCAs leva a um aumento da acetilação das histonas e diminuição da carga positiva presente nas histonas. Essa diminuição das cargas positivas reduzem a ligação das histonas as cargas fortemente negativas presentes no DNA, levando a abertura da estrutura da cromatina, o que facilita a ligação de fatores de transcrição como STAT3, NF- $\kappa$ B e FOXP3 (ROPERO; ESTELLER, 2007). Atualmente é estabelecido que as HDACs estejam envolvidas na regulação da expressão de genes inflamatórios, integridade vascular e no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose (Ciarlo ET al. 2013; Xu ET al. 2014; Li ET al. 2018).

A entrada do butirato de sódio para o interior da célula pode ser mediado por carregadores. O transportador de monocarboxilato 1 (MCT1) é um transportador dependente de íons H<sup>+</sup>, que está presente em diversos tecidos como músculo cardíaco, nos colonócitos, cérebro e células vermelhas do sangue. Ele é um conhecido carregador de piruvato, lactato e corpos cetônicos para dentro das células, que adicionalmente transportam os SCFAs (RITZHAUPT et al., 1998; VIJAY; MORRIS, 2014). O efeito direto de inibição da atividade de HDCAs relacionado ao butirato depende do seu transporte para dentro das células e está relacionado às suas atividades anti-tumoral e anti-aterogênica (VIJAY; MORRIS, 2014).

## **2.7. Efeito do butirato via GPR**

Os receptores acoplados a proteína G (GPRs) são a maior e mais diversa família de proteínas transmembrana (KOH et al., 2016). Os receptores GPR41, GPR43 e GPR109 são os receptores para SCFAs, e eles são diferentemente expressos nas células e regulam diversas funções celulares. O comprimento ideal da cadeia carbônica para a ativação do receptor GPR43, são aquelas cadeias que contêm 2 a 3 átomos de carbono (acetato e propionato), e para a ativação do receptor GPR41, aquelas que contêm de 3 a 4 átomos de carbono (propionato e butirato), sendo ambos com EC<sub>50</sub> em torno de 0,5mM (BROWN et al., 2003).

O receptor GPR41 é um importante receptor expresso no pâncreas, baço e tecido adiposo e tem sido implicado na obesidade e outras desordens metabólicas (LI et al., 2018). O receptor GPR41 ativado está acoplado a  $G\alpha_i$  que inibe adenilato ciclase, e por isso levando a diminuição dos níveis de AMP cíclico (cAMP) (BROWN et al., 2003). O GPR41 é o mais amplamente expresso e regula a atividade do sistema nervoso simpático no controle do consumo energético e mantendo a homeostase metabólica (KIMURA et al., 2011).

O receptor GPR43 é expresso em células do sistema imune, incluindo neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas e monócitos, indicando o seu papel na inflamação e nas respostas imunológicas (KIM et al., 2013). O GPR43 está acoplado a  $G\alpha_i$  e  $G\alpha_q$ , levando a diminuição dos níveis de cAMP e aumento das concentrações citoplasmáticas de cálcio. Esse receptor também se envolve em vias de sinalização alternativa mediada por  $\beta$ -arrestinas-2, produzindo efeitos anti-inflamatórios pela inibição de NF- $\kappa$ B (BROWN et al., 2003; GAO et al., 2004; LEE et al., 2013).

O receptor GPR109 é primariamente expresso nos adipócitos, mas também está presente nas células imunes incluindo os neutrófilos e macrófagos, não tendo informações indicando a sua presença nas células endoteliais, até o momento (CHAI; DIGBY; CHOUDHURY, 2013). Dentre os SCFAs, apenas o butirato, apresenta a propriedade de ativar este receptor. O GPR109 é acoplado à proteína G inibitória  $G_i/G_o$  e sua ativação pode recrutar, de maneira alternativa,  $\beta$ -arrestinas do compartimento citosólicos para a membrana celular, sugerindo um efeito na regulação da inflamação vascular presente na aterosclerose (CHAI; DIGBY; CHOUDHURY, 2013; MARTIN et al., 2009).

### 3. JUSTIFICATIVA

Diversos trabalhos na literatura suportam que a disfunção endotelial é um dos primeiros passos para o desenvolvimento da aterosclerose e de outras patologias vasculares, o que fomenta um amplo interesse da comunidade científica em desvendar os mecanismos fisiopatológicos subjacentes e traçar estratégias para possíveis intervenções que minimizem os seus efeitos crônicos.

Estudos realizados no Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABiN) em parceria com o Laboratório de Biologia Vascular (LBV), ambos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) têm constatado dois importantes aspectos que serão abordados neste trabalho: (1) as propriedades anti-aterogênicas do butirato de sódio (AGUILAR et al., 2014, 2016, 2018), bem como (2) o papel crucial da nNOS desacoplada na progressão da disfunção endotelial e desenvolvimento da aterosclerose (CAMPOS-MOTA et al., 2017; NAVIA-PELAEZ et al., 2018).

O conjunto de propriedades apresentadas pelo butirato e sua ação benéfica sobre a aterosclerose, conferem a esse nutriente atributos promissores para o tratamento de doenças cardiovasculares. Mas não é conhecida a sua capacidade de atuar nos estágios iniciais da disfunção endotelial. Desta forma, o presente estudo tem a proposta de esclarecer os possíveis efeitos do butirato sobre um modelo de disfunção endotelial induzida por LPC.

#### 4. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo é investigar o efeito direto do butirato de sódio sobre a função vascular em aortas de camundongos C57BL/6J em modelo *ex vivo* de disfunção endotelial induzida por LPC.

Os objetivos específicos incluem:

- Avaliar se o tratamento *ex vivo* com butirato de sódio melhora a disfunção endotelial causada por LPC;
- Avaliar os possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos do tratamento com butirato de sódio.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. Modelo animal

Neste estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl/6J, com idade entre 10 e 12 semanas, obtidos do Biotério Ênio Cardillo Vieira do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde também foram mantidos. Os animais utilizados tiveram acesso à água e ração *ad libitum* e foram mantidos em gaiolas coletivas, em ambiente com ciclo de luminosidade 12 horas (7:00 às 19:00h) com temperatura variando entre  $24 \pm 2,0^\circ\text{C}$ . O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA-protocolo n° 304/2018).

### 5.2. Experimento de reatividade vascular: Obtenção e montagem dos anéis de aorta

Os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação. A aorta torácica foi cuidadosamente dissecada, livre de tecido adiposo perivascular e colocada em placa de Petri contendo solução nutriente de Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7;  $\text{NaHCO}_3$  25;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,5; glicose 11;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,2; pH 7,4). A artéria foi cortada em anéis de aproximadamente 3mm de comprimento. Nesses anéis foram transpassadas duas hastes metálicas triangulares através do lúmen do vaso. Um dos triângulos metálicos foi afixado a uma haste metálica acoplada a um transdutor de tensão isométrica. Para obtenção do registro de tensão, os anéis foram acondicionados em cubas contendo 10mL da solução nutritiva, constantemente aerada com mistura carbogênica, sendo 95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ , mantida a temperatura de  $37^\circ\text{C}$  e pH de 7,4.

Após a montagem dos anéis no equipamento, esses foram submetidos a uma tensão de repouso de 0,5g, constantemente regulada durante 60 minutos para estabilização da preparação. Nesse período, a solução nutritiva foi trocada a cada 15 minutos a fim de evitar o acúmulo de metabólitos, bem como para restaurar os níveis de glicose necessários ao metabolismo vascular.

Os registros dos experimentos executados foram obtidos a partir de transdutores de tensão isométrica (World Precision Instruments, Inc., USA), conectados a um amplificador (TBM4M, WPI), sendo este acoplado a um computador equipado com uma placa conversora analógico-digital. Para aquisição dos dados foi utilizado o programa WinDaq Data Acquisition (Dataq® Instruments, USA).

### **5.3. Avaliação da integridade endotelial**

Após o período de estabilização vascular, como já descrito, foi realizado o teste de endotélio. Os anéis de aorta foram pré-contraídos com o agonista  $\alpha$ 1-adrenérgico fenilefrina (Phe, 0,1  $\mu$ M) e, após a estabilização da contração, foi adicionado o agonista muscarínico acetilcolina (ACh, 10  $\mu$ M), a fim de que fosse avaliada a presença de endotélio funcional. Vasos contendo resposta superior a 80% de relaxamento foram considerados como contendo endotélio funcional e aptos para os experimentos sob estas condições.

Para os experimentos sem endotélio funcional, foram aceitos relaxamento induzido por ACh inferiores a 10%. A remoção do endotélio se deu mecanicamente com auxílio de haste metálica friccionada de forma delicada no lúmen vascular.

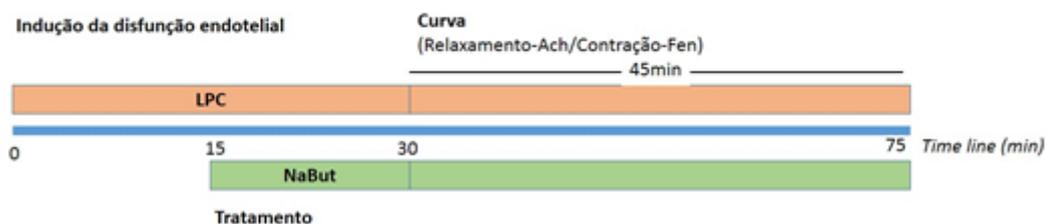
### **5.4. Avaliação do efeito modulatório do butirato de sódio (NaBut) sobre a resposta vascular alterada pela Lisofosfatidilcolina**

Primeiramente foi avaliado se a LPC seria capaz de induzir alterações na resposta vascular. Em seguida avaliamos o efeito direto do butirato de sódio sobre as alterações na resposta vascular induzidas por Lisofosfatidilcolina (LPC). O butirato de sódio utilizado nos ensaios foi preparado utilizando uma solução aquosa de ácido butírico (Sigma, USA) a 100mM que teve o pH ajustado para 7,2 (com hidróxido de sódio). Em seguida, a solução foi diluída para a concentração de uso a 10mM.

O protocolo de tratamento utilizado neste estudo está esquematizado na Figura 4. As preparações de aorta foram incubadas por 30 minutos com LPC (10 $\mu$ M; Sigma, USA), para indução da disfunção endotelial. Nos últimos 15 minutos, foi

adicionado o butirato de sódio, para diferentes concentrações finais: 0,1mM e 0,5mM.

#### Protocolo de tratamento



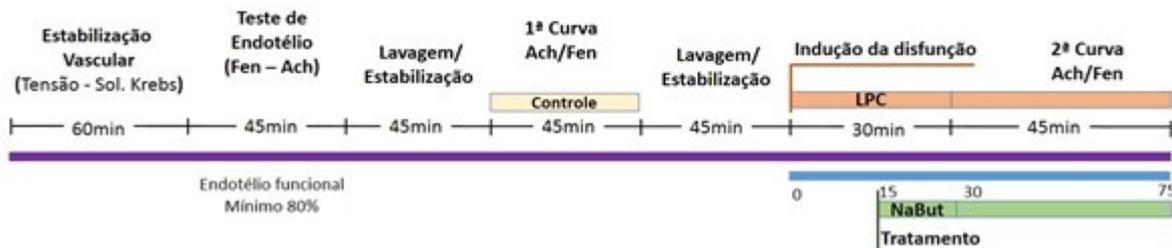
**Figura 4:** Figura esquemática do protocolo de tratamento utilizado no experimento de reatividade vascular demonstrando o tempo de exposição do vaso à LPC e NaBut.

Como um teste de viabilidade da preparação, foram realizadas curvas de concentração-resposta cumulativas com fenilefrina ou acetilcolina antes e após o período de incubação com as drogas mencionadas e os resultados obtidos na ausência e presença das drogas foram comparados. Para avaliar a presença ou a ausência de efeito farmacológico foram avaliados os valores de Emax (que é a resposta máxima obtida pelos vasos em relação aos tratamentos) e os valores de pD2 (o Log de EC<sub>50</sub>, ou seja, co-Log da concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo, o que corresponde a potência).

O esquema referente aos procedimentos envolvidos no protocolo de reatividade vascular é mostrado com detalhes na Figura 5:

#### Configuração Experimental

Ensaio de reatividade vascular



**Figura 5:** Figura esquemática do protocolo experimental utilizado nos experimentos de reatividade vascular demonstrando o tempo de exposição do vaso à LPC e NaBut.

### **5.5. Avaliação dos mecanismos envolvidos no efeito modulatório do butirato de sódio sobre a função vascular**

O butirato possui reconhecida atividade inibidora de HDACs. Para avaliar a participação da via das HDACs nos efeitos vasculares do tratamento com butirato frente à disfunção induzida por LPC. Após a primeira curva controle, as preparações de aorta foram pré-incubadas com Tricostatin A (TSA, 10 $\mu$ M, 20 minutos; Sigma, USA), um inibidor seletivo de HDACs I e II (GAN et al., 2006; MIYOSHI; USAMI; OHATA, 2008).

A descoberta da participação da isoforma nNOS (também presente no endotélio) na função vascular, por Capettini et al. (2008), é relativamente recente e trouxe novas perspectivas nos estudos dos mecanismos de ação protetora do endotélio sobre a função vascular, bem como um novo alvo para estudos farmacológicos. Assim, para avaliar a participação da nNOS foi utilizado o inibidor seletivo 1-(2-Trifluoromethylphenyl)imidazole (TRIM, 100 $\mu$ M, 30 minutos; Sigma, USA), previamente à realização dos demais passos, como descrito acima. Não foi utilizado inibidor seletivo para eNOS tendo em vista a baixa seletividade de todos os inibidores comercialmente disponíveis.

Novas curvas concentração-resposta foram realizadas após a incubação dos anéis com os inibidores (TRIM e TSA) na presença de LPC (10 $\mu$ M) e butirato de sódio (0,1mM) para se avaliar os mecanismos envolvidos sobre a via da nNOS na presença de uma ou ambas as drogas, nas mesmas condições já descritas anteriormente.

Após o término dos experimentos, as hastes metálicas foram cuidadosamente removidas e os anéis foram embebidos em meio de congelamento para tecidos (Tissue-Tek optimum cutting temperature – OCT - compound, Sakura®) ou armazenadas em tubo de ensaio a -80°C para análises posteriores.

### **5.6. Avaliação da expressão proteica em aortas, por Western Blot**

Os tecidos congelados a -80°C foram homogeneizados em homogeneizador de tecidos do tipo turrax (Omni®, Brasil) em presença de tampão de lise (NaCl 150 mmol/L; Tris 50 mmol/L; EDTA.2Na 5 mmol/L; MgCl<sub>2</sub> 1 mmol/L) acrescido de 0,3%

de Triton X-100, 0,5% de SDS e de coquetel de inibidores de proteases (SigmaFast®, Sigma) e fosfatases (NaF 20mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,1mM). Os tecidos foram homogeneizados na proporção de 25mg de tecido para 100µl de tampão de lise. Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 20 minutos para a separação da fração proteica. O sobrenadante foi aliqotado e congelado a -80°C para posterior utilização. A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método descrito por Lowry et al. (Lowry *et al.*, 1951).

As amostras foram diluídas em tampão de amostra (5x tris HCL/SDS pH=6.8, 3% glicerol, 1%SDS, 0.6% β-mercaptoetanol, azul de bromofenol) e aquecidas a 98°C por 5 minutos. Para a separação, foram aplicados 40 µg de proteína em gel de SDS-PAGE (sodio dodecil (lauril) Sulfato-poliacrilamida) a 10% utilizando-se o sistema Mini-Protean tetra cell (Biorad).

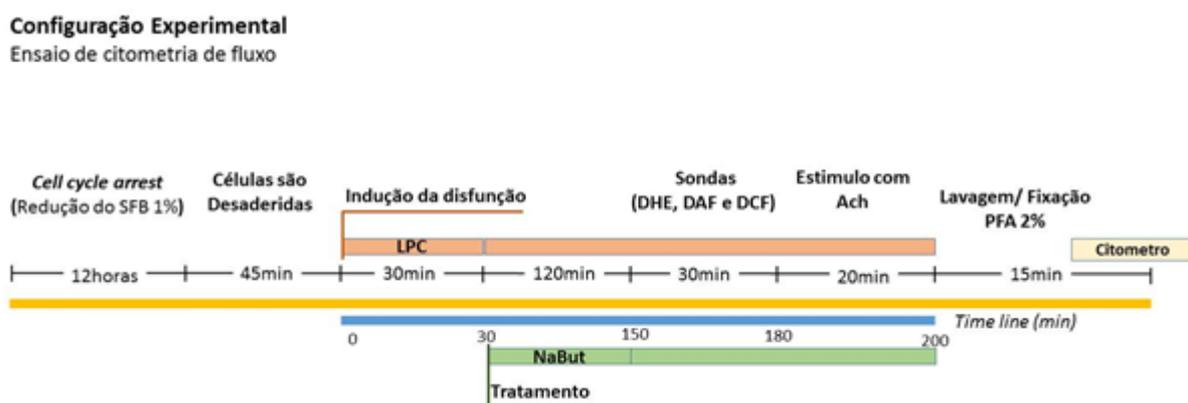
Após serem separadas no gel de poliactilamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de Nitrocelulose (Millipore®, USA) com poro de 0,45µm. A eficiência da transferência foi avaliada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. A membrana foi então lavada em água destilada e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (TBS-Tween 0,1% mais 3% de albumina). Após o bloqueio, a membrana foi incubada overnight a 4°C com o anticorpo primário específico diluído em solução de bloqueio. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: Anti-NOS3 (eNOS) (1:500; monoclonal feito em coelho; Santa Cruz), antiphospho- NOS3Ser1177 (p-eNOSer1177) (1:500; monoclonal feito em camundongo; Santa Cruz) e anti β-actina (1:1000; monoclonal feito em camundongo; Cellsign®). Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0,3% de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com os anticorpos secundários conjugados a sondas fluorescentes Alexa fluor 488 e 647 (1:1000) diluídos em 1% de albumina em TBS-Tween. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por três vezes). As bandas foram detectadas por reação de fluorescência e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageJ (CAPETTINI et al., 2011, 2009).

## **5.7. Experimentos com modelo celular: Linhagem celular endotelial**

Foi utilizada linhagem de células endoteliais humanas EA.hy926 (derivadas da hibridização de uma linhagem tumoral com as células primárias HUVEC -Human Umbilical Vein Endothelial Cells) comercialmente disponível (ATCC, USA). As células EAhy926 apresentam fenótipo endotelial preservado, mas com alta taxa de multiplicação. As células foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) completo, enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina. Para a realização dos experimentos, as células foram plaqueadas em placas de 6, 12, 24 e 96 poços. Para os experimentos, as células foram cultivadas até aproximadamente 90% de confluência e, então, o soro fetal bovino foi reduzido a 0,5% por, no mínimo, 24h de antecedência para evitar que as células se encontrem em processo de divisão na ocasião do experimento.

### 5.8. Grupos experimentais

As células EA.hy926 foram dispostas em placas de 6, 12 ou 24 poços e, após atingida a confluência (~90%), foram expostas durante 30 minutos a LPC (10µM). Passado esse tempo, foram acrescidas ao meio diferentes concentrações de butirato de sódio (0,01mM, 0,1mM e 0,5mM) pelo tempo de horas (AGUILAR et al., 2014, 2016).



**Figura 6:** Esquema da configuração experimental dos ensaios *in vitro* mostrando o tempo de exposição das células à LPC e ao NaBut.

### 5.9. Ensaio de viabilidade celular

Para se avaliar o efeito das diferentes drogas administradas sobre a viabilidade celular foi utilizada a sonda iodeto de propídio - PI (Propidium iodide-

10µg/ml; Sigma, USA) para detecção de morte celular por citometria de fluxo (Fried, et al. 1976; Rieger et al. 2011). Para a realização deste ensaio as células foram plaqueadas a  $1 \times 10^5$  por poço, em placa de 6 poços e estimuladas com os tratamentos descritos previamente. Após o tratamento, as células foram desaderidas com tripsina 0,25%, resuspensas em solução salina balanceada de Hanks (HBSS, 1x) gelada. Foi adicionado aos tubos PI (2µl), incubado pelo tempo de 1 minuto e realizada a leitura por citometria de fluxo usando FACS Calibur system (BD, USA). Os resultados foram analisados pelo software FlowJo (v10.0.6) e expressos pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI) positiva para o canal FL3 (PI) e o seu deslocamento quando comparado ao controle positivo de morte (PBS+ triton 1%).

#### **5.10. Mensuração da produção endotelial de NO, superóxido e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Foram utilizadas sondas intracelulares fluorescentes para a detecção das referidas espécies por citometria de fluxo. Antes do término do tempo de tratamento, as células foram estimuladas com Acetilcolina (ACh, 10µM) e carregadas com as sondas fluorescentes intracelulares, diluídas em meio DMEM sem vermelho de fenol. Sendo DAF-FM (4-Amino-5methylamino-2',7'-difluorofluorescein, 2,5µM; Invitrogen, USA) para o NO; DHE (diidroetidio, 2,5 µM; Invitrogen, USA) para superóxido e H<sub>2</sub>-DCF-DA (diidrodicloro-fluoresceína diacetato, 2,5µM; Invitrogen, USA) para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por 30 minutos. Para a avaliação da participação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), as células foram co-incubadas com os scavengers catalase (2400UI, Sigma Aldrich, USA) e tiron++ (20µM, Sigma Aldrich, USA). Para avaliação da participação do óxido nítrico (NO), as células foram co-incubadas com o inibidor N-Nitro-L-Arginina (LNNA, 10µM, Sigma Aldrich, USA). Para a avaliação da participação do receptor de ácidos graxos de cadeia curta GPR43 nos efeitos apresentados pelo butirato, as células foram expostas previamente, ao inibidor GLPG0974 (10µM; Sigma Aldrich, USA), por pelo menos 60 minutos. Para avaliar a participação da isoforma nNOS, foi utilizado o inibidor seletivo TRIM ((1-(2Trifluorometilfenil)imidazole, 100µM, 30 minutos). Após a incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído 2%.

### **5.11. Mensuração do trânsito de Ca<sup>2+</sup> nas células endoteliais**

A análise do influxo de cálcio para o citoplasma foi avaliada pela fluorescência de células com Fluo-4 (F4, 1 $\mu$ , Invitrogen, USA) pelo tempo de 30 minutos. Já o efluxo de cálcio reticular foi avaliado pela fluorescência de retículos marcados com Fluo-5N (F5N, 1 $\mu$ M, Invitrogen, USA), por 30 minutos. Após a marcação as células foram lavadas e incubadas em meio DMEM sem soro e sem vermelho de fenol. Foi então realizada a primeira leitura em citometro. Então as células foram estimuladas com ACh (10 $\mu$ M) e foram efetuadas leituras de 10.000 eventos a cada 5 minutos até o tempo final de 30 minutos.

A análise por citometria de fluxo foi realizada utilizando o FACScan system (BD, USA). Os dados foram analisados pelo software FlowJo (v10.0.6) e expressos pela intensidade média de fluorescência para os canais FL1 (DAF e DCF) e FL2 (DHE).

### **5.12. Análise de expressão proteica em células endoteliais, por western blot**

As amostras foram coletadas e processadas para separação em gel de acrilamida por eletroforese e, então, transferidas para uma membrana de nitrocelulose de acordo com a metodologia descrita anteriormente. Foram avaliadas as expressões da proteína kinase ERK 1/2 (1:100; policlonal feito em ; Santa Cruz), phospho-ERK 1/2 (1:500; monoclonal feito em ; Santa Cruz) anti-NOS1 (nNOS) (1:500; monoclonal feito em coelho; Santa Cruz), phospho-NOS1Ser1412 (p-nNOSSer1412) (1:500; monoclonal feito em camundongo; Santa Cruz), MKP-1 (1:1000 monoclonal feito em; Santa Cruz) e anti  $\beta$ -actina (1:1000; monoclonal feito em camundongo; Cellsign®) em lisado de células endoteliais submetidas aos tratamentos e comparadas ao controle.

As bandas foram detectadas por reação de fluorescência e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

### **5.13. Análises estatística e expressão dos dados**

Os cálculos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism 7.0. Os dados de relaxamento vascular foram representados como percentual de redução de contração em resposta à acetilcolina após contração máxima com fenilefrina). Já os dados de contração foram expressos em mN/mm, considerando a força desenvolvida pelo vaso em razão do comprimento do anel. As curvas concentração-resposta cumulativas foram analisadas ponto-a-ponto através do método two-way ANOVA para medidas repetidas, seguidas de teste de comparação de BONFERRONI. Os valores de EC50 foram determinados através de regressão não-linear das curvas concentração resposta obtidas nos experimentos, representando a concentração da droga que produziu 50% de redução na contração ou do relaxamento máximos e o Em<sub>áx</sub> foi a resposta máxima de relaxamento. Todos os outros resultados foram expressos como média±EPM. O teste de Grubbs foi usado para identificação de outliers. Os resultados foram comparados pela método two-way ANOVA quando paramétricos (avaliados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk), usando como post hoc o teste Tukey ou o teste Bonferroni para medidas contínuas no tempo. Quando os dados foram não paramétricos as comparações foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis, usando como post hoc o teste de Dunn's. Para os experimentos realizados foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Tratamento com butirato de sódio reverte a disfunção endotelial induzida por LPC

Observamos que a LPC foi capaz de promover uma redução no relaxamento induzido por ACh e também um aumento significativo na contração por fenilefrina (**Tabela 1:** Emax CT:  $98,55 \pm 1,60$ . Emax LPC:  $82,10 \pm 4,53$ . **Tabela 2:** Emax CT:  $2,03 \pm 1,20$ . Emax LPC:  $5,02 \pm 1,01$ ), o que caracteriza o processo de disfunção endotelial.

**Tabela 1:** Valores de Emax e pD<sub>2</sub> dos resultados de relaxamento vascular

	Controle	LPC	LPC+BUT 0,1mM	LPC+BUT 0,5mM
EMAX (%)	$98,55 \pm 1,60$	<b><math>82,10 \pm 4,53^*</math></b>	$98,96 \pm 1,55$	<b><math>85,23 \pm 5,39^*</math></b>
pD <sub>2</sub>	$6,99 \pm 0,09$	<b><math>6,04 \pm 0,11^*</math></b>	$6,54 \pm 0,19$	$6,44 \pm 0,28$

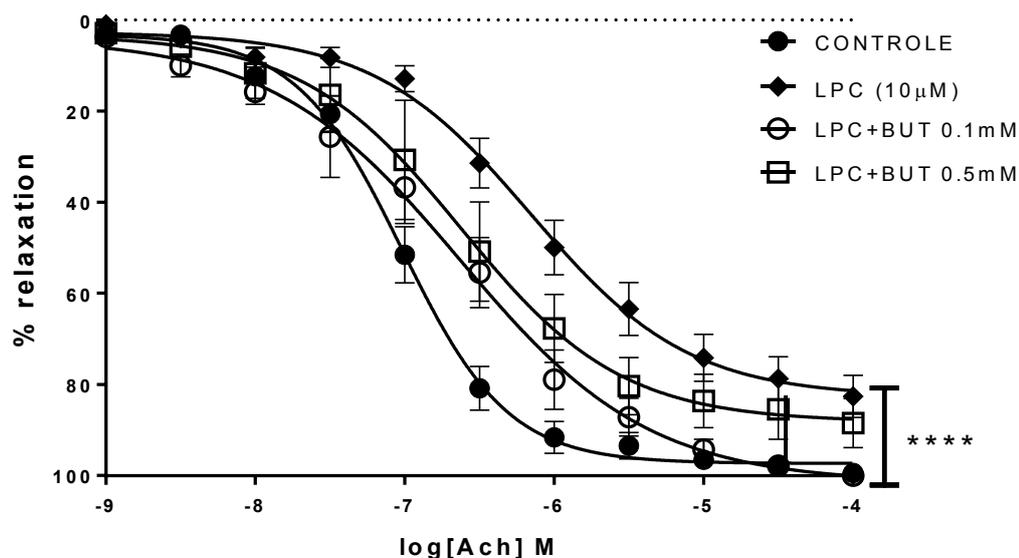
Os resultados foram expressos como Média $\pm$ EPM dos valores de Emax e pD<sub>2</sub>. \* p<0,0001 do CT vs LPC, BUT 0,01mM e BUT 0,5mM.

**Tabela 2:** Valores de Emax e pD<sub>2</sub> dos resultados de contratilidade vascular

	Controle	LPC	LPC+BUT 0,1mM	LPC+BUT 0,5mM
EMAX (mM/mm)	$2,03 \pm 1,20$	<b><math>5,02 \pm 1,01^*</math></b>	$1,69 \pm 0,66$	$2,09 \pm 0,44$
pD <sub>2</sub>	$6,40 \pm 0,41$	<b><math>7,08 \pm 0,28^*</math></b>	$6,60 \pm 0,36$	$6,42 \pm 0,53$

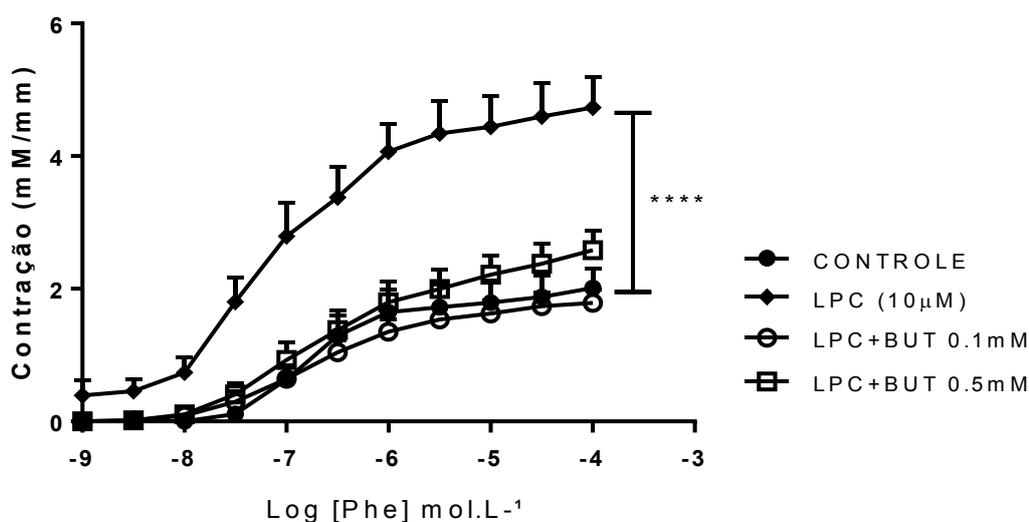
Os resultados foram expressos como Média $\pm$ EPM dos valores de Emax e pD<sub>2</sub>. \* p<0,0001 do CT vs LPC, BUT 0,01mM e BUT 0,5mM.

Ao tratarmos o vaso com 0,1mM de butirato, foi observada uma melhora da disfunção endotelial causada por LPC, restaurando o relaxamento a níveis similares ao controle (**Fig. 7 e Tabela 1** Emax LPC:  $82,10 \pm 4,53$ . Emax LPC+BUT 0,1mM:  $98,96 \pm 1,55$ ). O mesmo efeito não foi observado na concentração de 0,5mM, que apresenta valores de relaxamento semelhantes aos vistos com LPC (**Fig. 7 e Tabela 1** Emax LPC:  $82,10 \pm 4,53$ . Emax LPC+BUT 0,5mM:  $85,23 \pm 5,39$ ).



**Figura 7:** Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aortas com endotélio funcional no CT, LPC 10μM, LPC+BUT 0,1mM e LPC+BUT 0,5mM. (n=9). Two-way ANOVA. \*\*\*\*p<0,0001 do CT vs LPC e BUT 0,5mM.

Ao avaliarmos o efeito do butirato sobre a contração, é possível observar que há uma redução na resposta contrátil induzida por fenilefrina, mostrando um restabelecimento da contração nos níveis do controle nas concentrações de 0,1mM e 0,5mM (**Fig. 8 e Tabela 2** Emax CT:  $2,03 \pm 1,20$ . Emax LPC+BUT 0,1mM:  $1,69 \pm 0,66$ . Emax LPC+BUT 0,5mM:  $2,09 \pm 0,44$ ).



**Figura 8:** Resposta contrátil induzida por fenilefrina em aortas com endotélio funcional no CT, LPC 10 $\mu$ M, LPC+BUT 0,1mM e LPC+BUT 0,5mM. (n=9). Two-way ANOVA. \*\*\*\*p<0,0001 CT vs LPC.

**Tabela 3:** Valores de Emax e pD<sub>2</sub> dos resultados de contração vascular sem endotélio

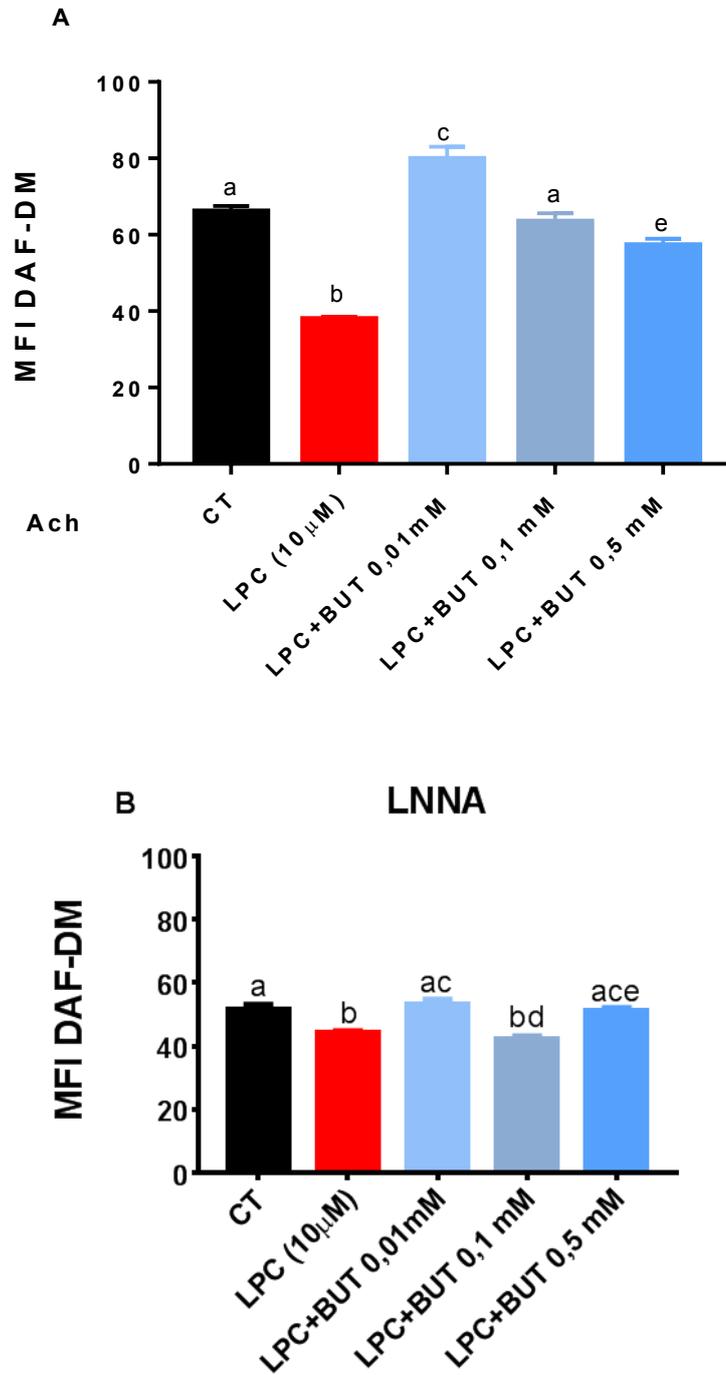
	Controle	LPC	LPC+BUT 0,1mM	LPC+BUT 0,5mM
<b>EMAX (mM/mm)</b>	3,27 $\pm$ 1,23	4,01 $\pm$ 2,04	2,85 $\pm$ 1,41	2,36 $\pm$ 1,16
<b>pD<sub>2</sub></b>	7,58 $\pm$ 0,83	7,51 $\pm$ 0,45	7,24 $\pm$ 0,23	7,41 $\pm$ 0,45

Os resultados foram expressos como Média $\pm$ EPM dos valores de Emax e pD<sub>2</sub>.

## 6.2. Avaliação da produção de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub><sup>-</sup> de células endoteliais tratadas ou não com LPC e butirato de sódio

Observamos que o tratamento com LPC foi capaz de levar a diminuição da produção de NO, observada pela diminuição do MFI, quando comparado ao controle. Ao avaliarmos o tratamento com o butirato de sódio observamos que com a concentração de 0,01mM há um aumento da produção de NO, frente ao controle e também ao estímulo com LPC. Esse aumento foi decrescendo com o aumento da

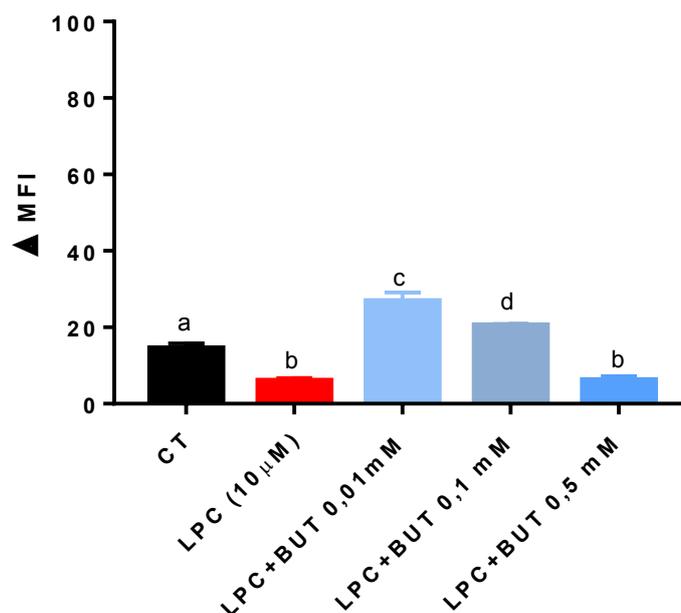
concentração de butirato (figura 10A). Quando comparamos a produção de NO na presença do inibidor das NOS constitutivas (eNOS e nNOS), o L-NNA, observamos que há uma diminuição da produção de NO em todos os grupos (figura 10B).



**Figura 9:** Produção de NO em células endoteliais EA.Hy926 tratadas com LPC e butirato de sódio, estimuladas com ACh, em ausência (A) ou presença (B) de L-NNA. Os

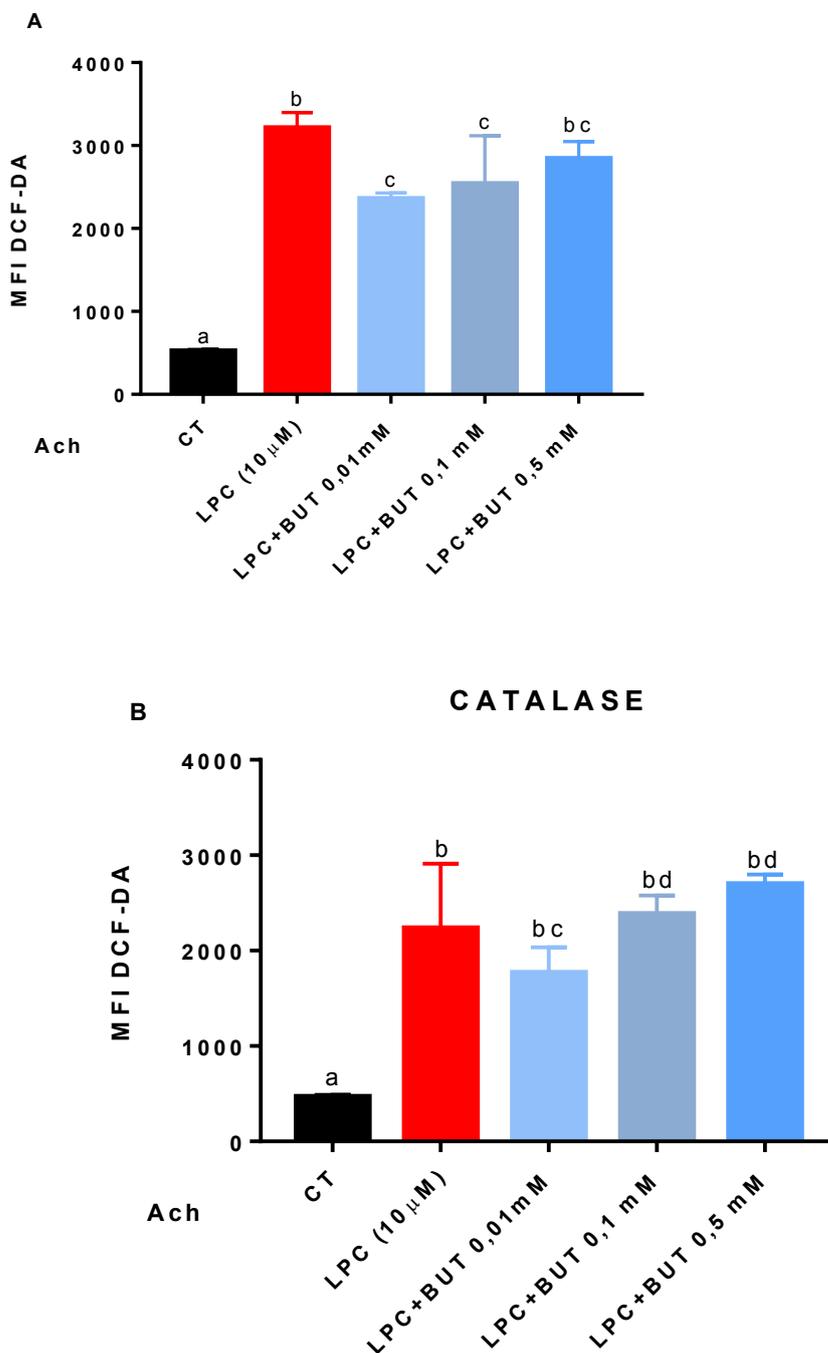
resultados foram expressos como média±EPM de pelo menos 3 experimentos independentes. Foram analisados 10.000 eventos de fluorescência a cada experimento. Letras diferentes indicam diferença estatística.  $p \leq 0,0001$ . Two-way ANOVA.

Analisando o delta da diferença entre ambas as condições experimentais (presença ou ausência de L-NNA), observamos que no grupo estimulado com LPC há uma menor participação para produção de NO, confirmando que a inibição das enzimas não exacerba a diminuição já causada pela LPC, quando comparado ao controle (figura 11). No entanto, observamos que há uma contribuição superior para a produção de NO nos tratamentos com butirato nas concentrações de 0,01 e 0,1mM. Juntos, esses dados sugerem que a restauração da função endotelial promovida pelo butirato se deve, pelo menos em parte, por um aumento da produção de NO, via NOS constitutivas (eNOS e nNOS).



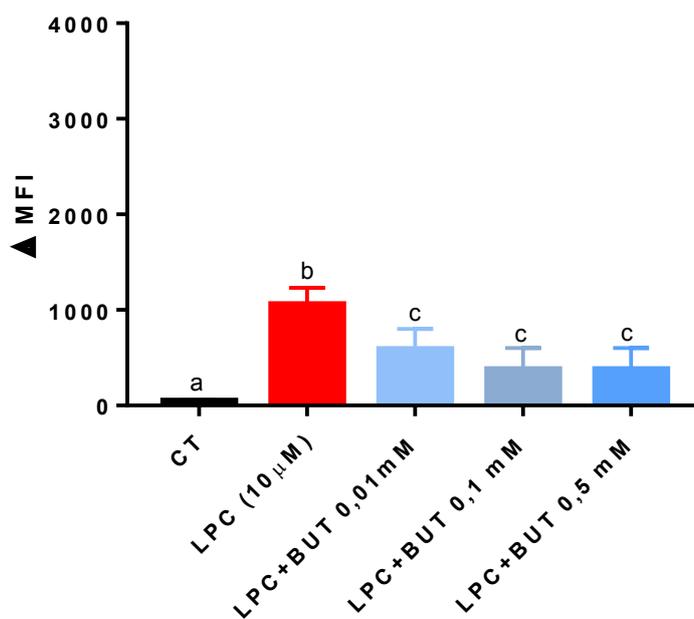
**Figura 11:** Delta da diferença das dosagens de NO na presença ou ausência de L-NNA em células tratadas com LPC e butirato de sódio. Os resultados foram expressos pela média±EPM de pelo menos 3 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferença estatística.  $p \leq 0,001$ . Two-way ANOVA

Em seguida, investigamos a produção de peróxido ( $H_2O_2$ ) para avaliar os efeitos apresentados pelo tratamento. Observamos um aumento acentuado na produção de  $H_2O_2$  por estímulo com a LPC. No entanto, o tratamento com butirato atenuou essa produção, nas concentrações 0,01mM e 0,1mM (figura 12A). Quando comparamos a produção de  $H_2O_2$  na presença da enzima catalase, observamos que os grupos tratados apresentam maior produção em relação ao controle, no entanto, não há mais diferenças entre a LPC e os tratamentos com butirato.



**Figura 12:** Dosagem de  $H_2O_2$  em células endoteliais EA.Hy926 tratadas com LPC e butirato de sódio, estimuladas com ACh, em ausência (A) ou presença (B) do *scavenger* catalase. Os resultados foram expressos como média±EPM de pelo menos 3 experimentos independentes. Foram analisados 10.000 eventos de fluorescência a cada experimento. Letras diferentes indicam diferença estatística.  $p \leq 0,001$ . Two-way ANOVA.

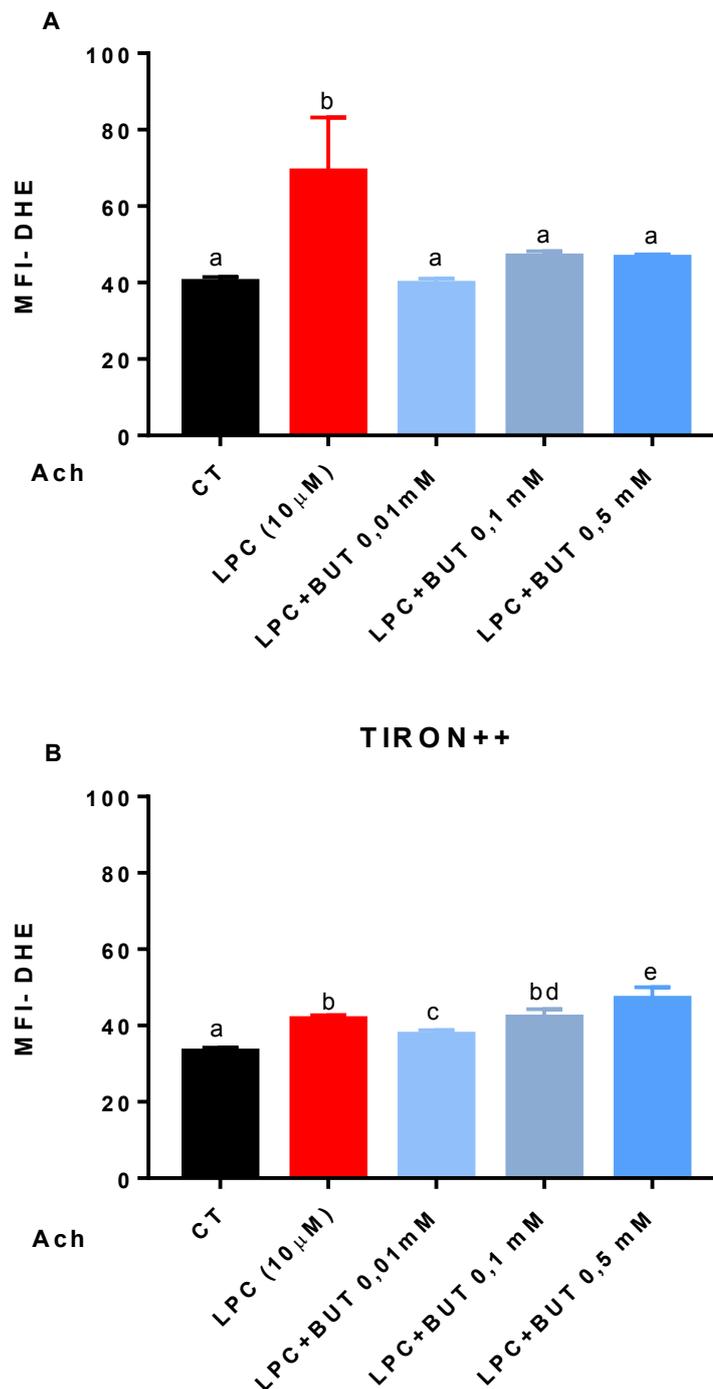
Analisando o delta da diferença entre ambas as condições experimentais (presença ou ausência de catalase), observamos que há uma elevada contribuição da LPC na produção de peróxido de hidrogênio, que foi atenuada pelos tratamentos com butirato. Sugerindo que o butirato é capaz de reduzir a produção de  $H_2O_2$  (figura 13).



**Figura 13:** Delta da diferença das dosagens de  $H_2O_2$  na presença ou ausência de catalase em células tratadas com LPC e butirato de sódio. Os resultados foram expressos pela média±EPM de pelo menos 3 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferença estatística.  $p \leq 0,0001$ . Two-way ANOVA.

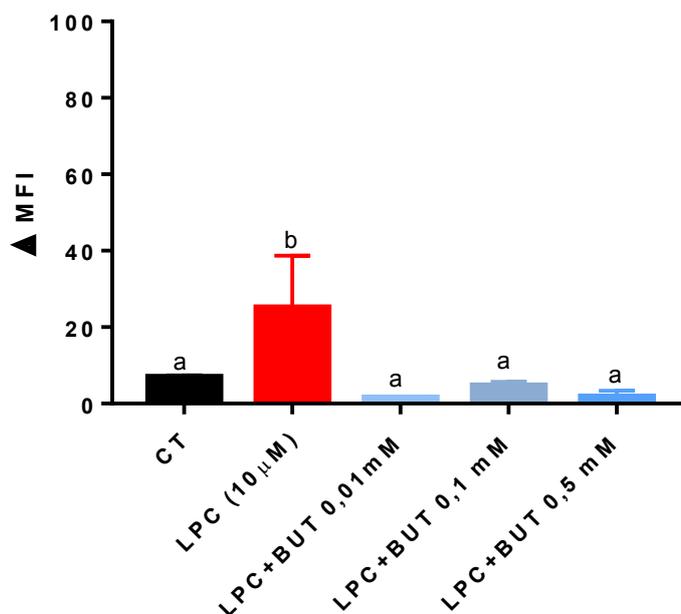
Por fim avaliamos a produção de radicais superóxido ( $O_2^-$ ), complementando a investigação de parâmetros de estresse oxidativo, bem como para associarmos com o aumento da resposta contrátil. Observamos que há um aumento expressivo da produção de  $O_2^-$  nas células tratadas com LPC, quando comparado ao controle (figura 14A). Vimos que o tratamento com butirato, em todas as concentrações,

conseguiu restabelecer a produção de  $O_2^-$  a nível do controle, demonstrando uma inibição da produção de superóxido pelo butirato de sódio. Quando comparamos a produção de  $O_2^-$  na presença do *scavenger* tiron++ ainda observamos um aumento sob estímulo com LPC, em relação ao controle, e vimos que, apenas na concentração de 0,01mM, o butirato atenuou esse efeito (figura 14B). O que nos mostra que o tratamento com butirato a 0,01mM atua na redução de ROS total, principalmente por reduzir  $O_2^-$ .



**Figura 14:** Dosagem de  $O_2^-$  em células endoteliais EA.Hy926 tratadas com LPC e butirato de sódio, Estimuladas com ACh, em ausência (A) ou presença (B) do *scavenger* tiron++. Os resultados foram expressos como média±EPM de pelo menos 3 experimentos independentes. Foram analisados 10.000 eventos de fluorescência a cada experimento. Letras diferentes indicam diferença estatística.  $p \leq 0,001$ . Two-way ANOVA.

Analisando o delta (figura 15) da diferença entre ambas as condições experimentais (presença ou ausência de tiron++), observamos que há uma grande contribuição do estímulo com LPC para a produção de  $O_2^-$ , o que não é mais observado quando tratamos essas células com butirato. Os dados apontam para uma reversão na produção exacerbada de  $O_2^-$  causada pela LPC, quando essas células são tratadas com butirato de sódio.



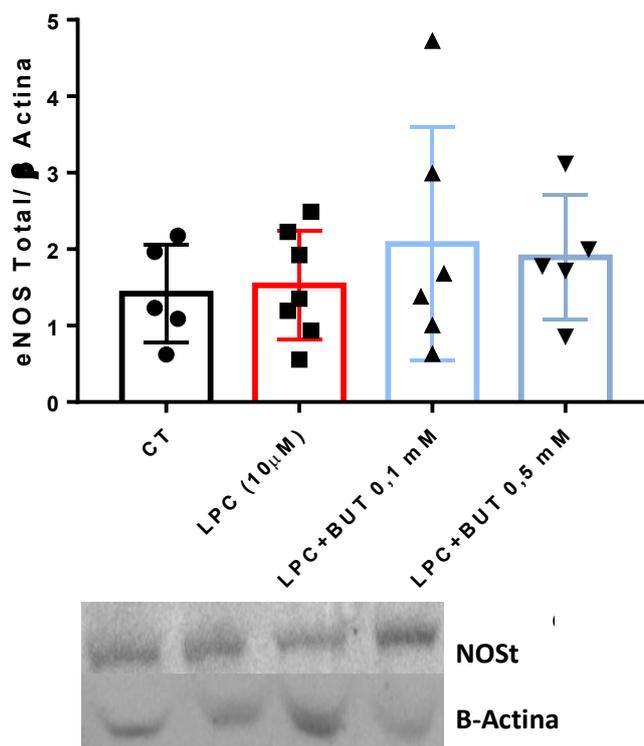
**Figura 15:** Delta da diferença das dosagens de  $O_2^-$  na presença ou ausência de tiron++ em células tratadas com LPC e butirato de sódio. Os resultados foram expressos pela média±EPM de pelo menos 3 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferença estatística.  $p \leq 0,01$ . Two-way ANOVA.

### 6.3.O papel da nNOS sobre a reversão da disfunção endotelial promovida pelo butirato de sódio

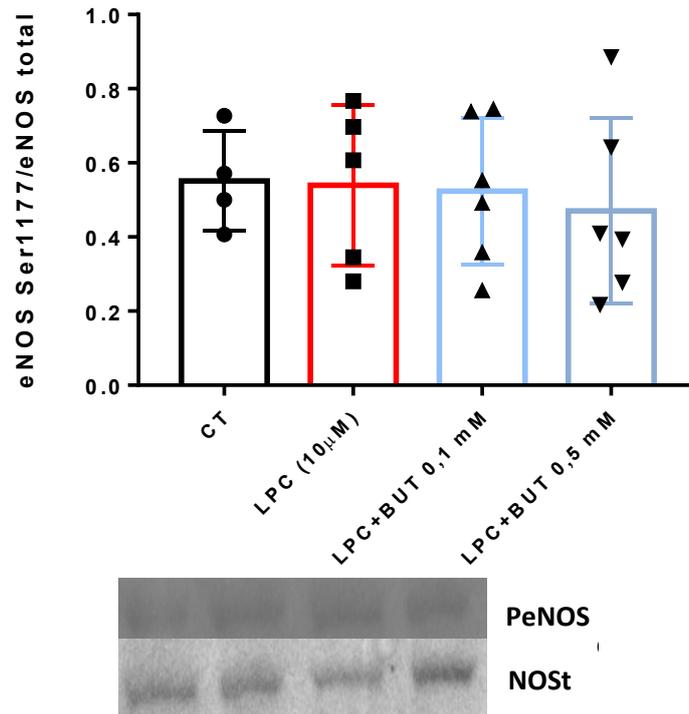
Classicamente, eNOS é considerada a principal isoforma atuante no controle da função cardiovascular. Entretanto diversos trabalhos, inclusive do nosso grupo,

demonstraram que a nNOS presente no endotélio contribui, juntamente com a eNOS, para a manutenção da homeostase do sistema vascular (NAVIA-PELAEZ et al., 2018). Para confirmar os Achados anteriores e avaliar o efeito do tratamento com o butirato sobre as NOS constitutivas, foram realizados experimentos de western blot para a marcação de eNOS total e fosforilada em Ser1177 (sítio de ativação) em aortas previamente tratadas, utilizando o protocolo descrito anteriormente.

Os resultados mostram que não há diferença na expressão de eNOS total (figura 16), bem como de sua fosforilação no sítio Ser 1177 (figura 17). Demonstrando que não há diferença na atividade de eNOS. Esses dados sugerem que o aumento de NO observado anteriormente (figura 10A), no tratamento com a concentração de 0,01mM em células endoteliais, não advém do aumento da atividade de eNOS.



**Figura 16:** Expressão proteica de eNOS em aortas expostas a LPC na presença e ausência de butirato de sódio por western blot. Os resultados foram normalizados pelo conteúdo de β-Actina em cada amostra e expressos como média±EPM. (n=5-7). Two-way ANOVA.



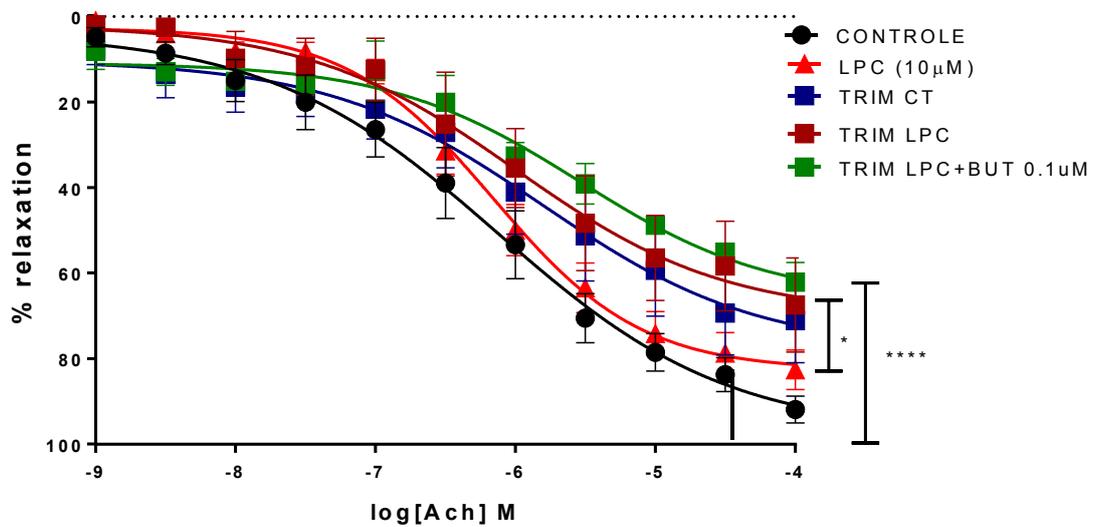
**Figura 17:** Expressão proteica de eNOS fosforilada em Ser1177 em aortas expostas a LPC na presença e ausência de butirato de sódio por western blot. Os resultados foram normalizados pelo conteúdo de eNOS total em cada amostra e expressos como média±EPM. (n=5-6). Two-way ANOVA.

**Tabela 4:** Valores de EMAX e PD2 dos resultados de relaxamento vascular na presença de TRIM

	Controle	LPC	TRIM	LPC+TRIM	LPC+TRIM+BUT 0,1mM
<b>EMAX (%)</b>	95,70±9,00	<b>82,10±4,53*</b>	<b>60,34±5,20*</b>	<b>63,93±17,83*</b>	<b>70,71±18,95*</b>
<b>PD2</b>	6,43±0,69	<b>6,04±0,11*</b>	<b>6,08±0,53*</b>	<b>5,65±0,25*</b>	<b>5,86±0,51*</b>

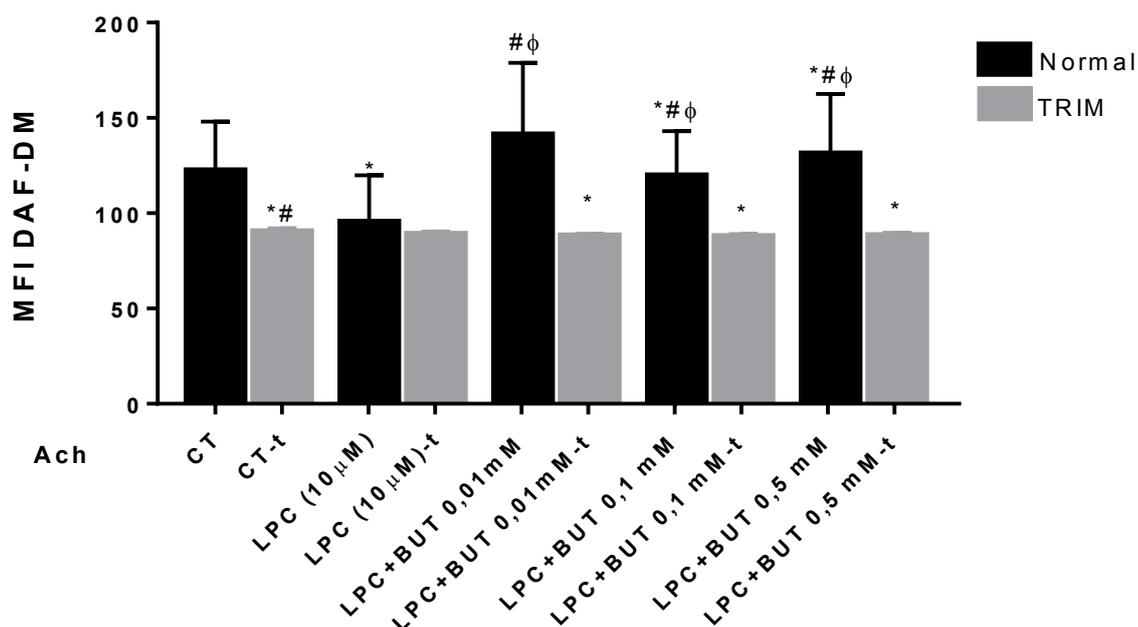
Os resultados foram expressos como Média±EPM dos valores de Log de EC<sub>50</sub> e Emax. \*P<0,05 LPC vs TRIM CT, TRIM LPC e TRIM BUT 0,1mM. \*\*\*p<0,0001 CT vs LPC, TRIM CT, TRIM LPC e TRIM BUT 0,1mM. Two-way ANOVA.

Percebemos que a inibição da nNOS levou a uma redução do relaxamento induzido por ACh, em relação ao controle (**Figura 18** Emax CT:  $95,70 \pm 9,0$ . Emax TRIM:  $60,34 \pm 5,20$ ). A LPC continua reduzindo o relaxamento vascular na presença do TRIM. No entanto não vemos uma reversão da disfunção no tratamento com butirato ao inibirmos a nNOS (**Figura 18** Emax LPC:  $63,93 \pm 17,83$ . Emax LPC+BUT  $0,1\text{mM}$ :  $70,71 \pm 18,95$ ). Esse resultado nos aponta que a nNOS tem um papel crucial no efeito apresentado pelo tratamento com butirato de sódio.



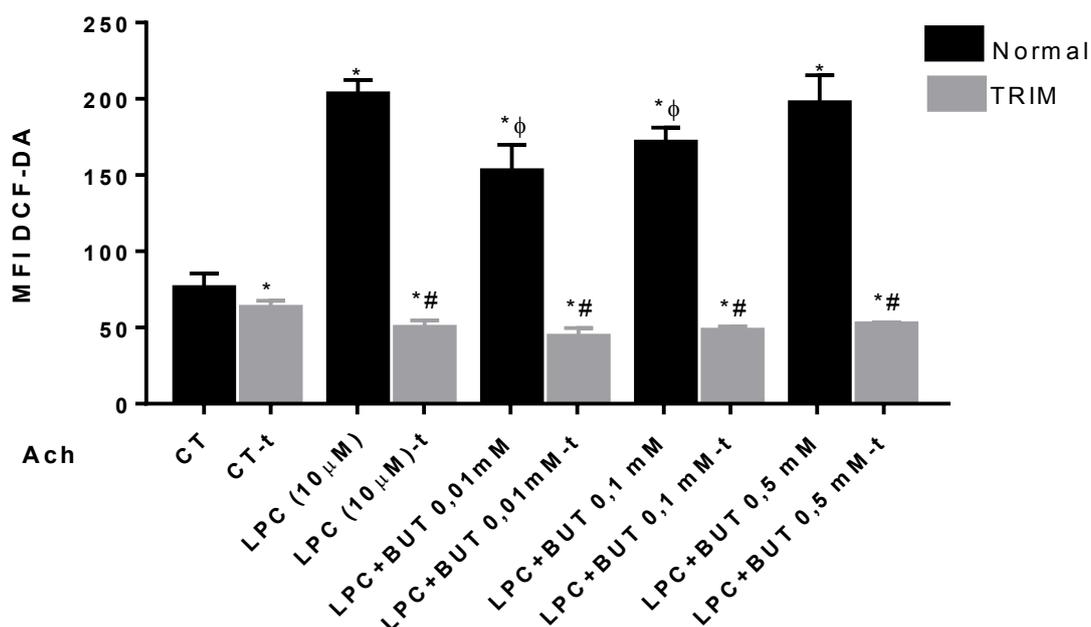
**Figura 18:** Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aortas com endotélio funcional, sem ou com inibidor seletivo da nNOS. CT, TRIM, TRIM+LPC 10 μM e TRIM+LPC+BUT 0,1 mM. (n=9). Two-way ANOVA. \*\*\*\*p<0,0001.

Nos experimentos *in vitro*, primeiramente observamos que a inibição da nNOS levou a uma redução da produção de NO em todos os grupos, onde LPC não se mostra diferente do controle e os tratamentos não mostram diferença na produção de NO quando comparadas a LPC (figura 19). Mostrando uma estratificação da produção de NO por essas células. Esses dados mostram que a diferença na produção de NO que observamos anteriormente (figura 10A) entre os tratamentos envolve a participação da nNOS.



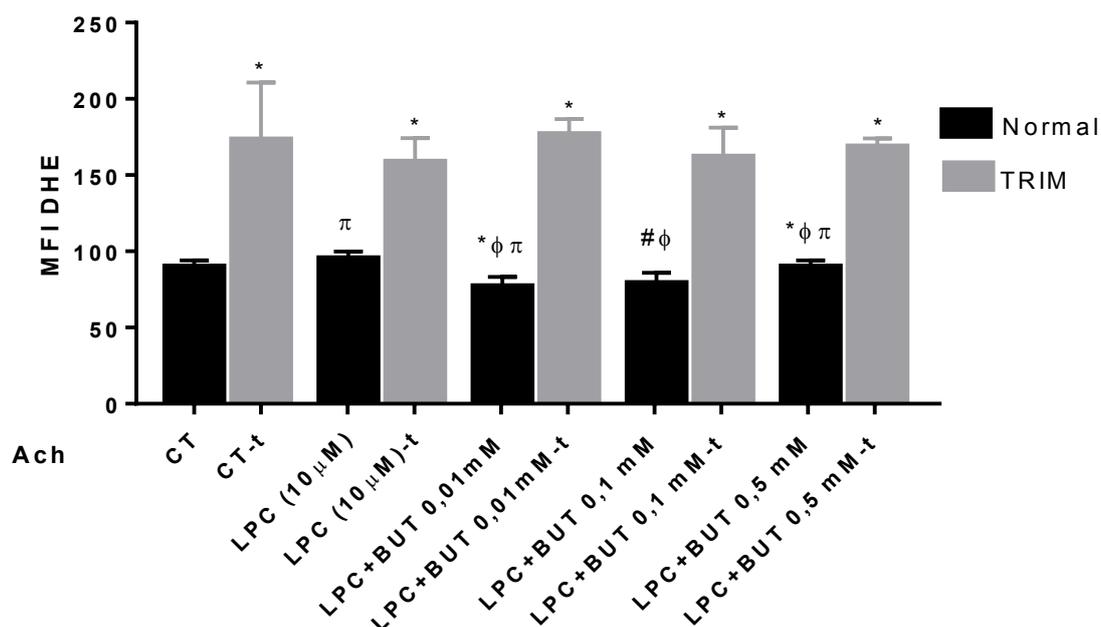
**Figura 19:** Produção de NO por células endoteliais EA.Hy926 tratadas com LPC e butirato de sódio, estimuladas com ACh, em ausência ou presença de TRIM. Os resultados foram expressos como média±EPM de pelo menos 3 experimentos independentes. Foram analisados 10.000 eventos de fluorescência a cada experimento. \*<0,0001 diferenças relativas ao CT; #<0,0001 diferenças relativas ao CT-GLPG e φ<0,05 diferenças relativas ao LPC. Two-way ANOVA.

Nós também investigamos se a inibição de nNOS alteraria a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dada a sua produção estar relacionada ao estresse oxidativo. Observamos que, quando a nNOS se encontra inibida, há uma redução da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no grupo estimulado com LPC quando comparado ao controle (figura 20). Essa redução se estende a todos os demais grupos de tratamento de maneira homogênea. Esse dado sugere que a atividade da nNOS é importante para a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, inclusive em condições que vão levar ao estresse oxidativo.



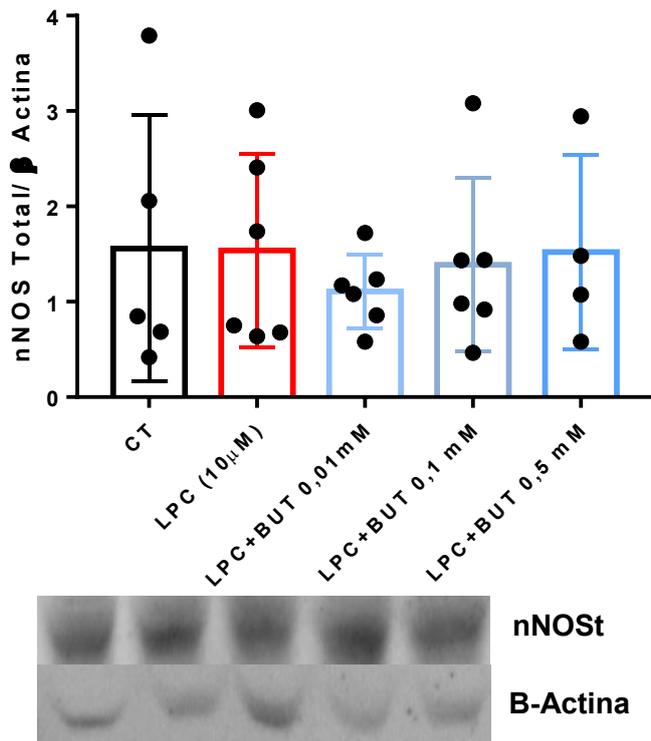
**Figura 20:** Produção de  $H_2O_2$  em células endoteliais EA.Hy926 tratadas com LPC e butirato de sódio, estimuladas com ACh, em ausência ou presença de TRIM. Os resultados foram expressos como média±EPM de pelo menos 3 experimentos independentes. Foram analisados 10.000 eventos de fluorescência a cada experimento.\*<0,0001 diferenças relativas ao CT; #<0,0001 diferenças relativas ao CT-GLPG e φ<0,05 diferenças relativas ao LPC. Two-way ANOVA.

Avaliamos também a influência da inibição por TRIM na produção de  $O_2^-$ . Observamos que a inibição da nNOS induziu aumento na produção de superóxido em todos os grupos (figura 21), sendo estes semelhantes entre si. Esses resultados mostram que na ausência de nNOS há um aumento da produção de radicais livres em todos os grupos, ou seja, a ausência de nNOS interfere de maneira homogeneia no aumento do estresse celular.

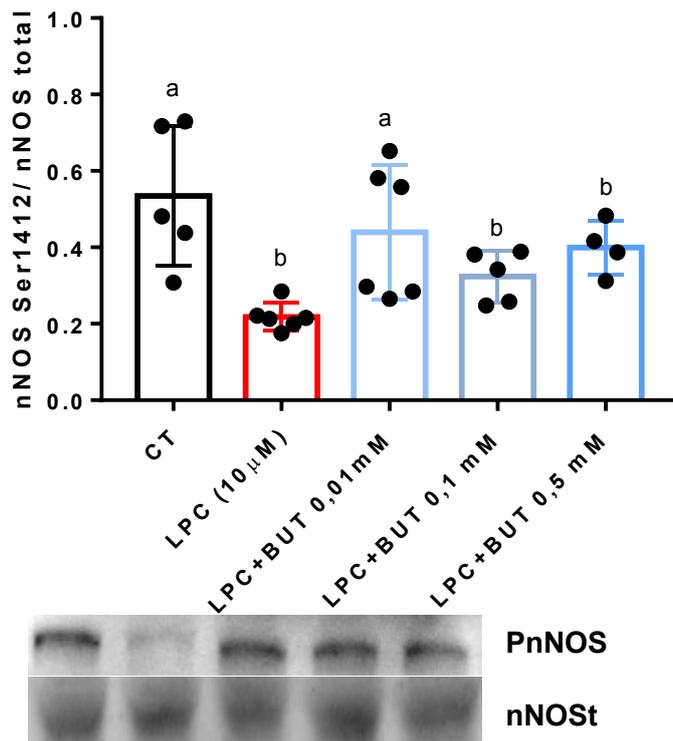


**Figura 21:** Produção de  $O_2^-$  em células endoteliais EA.Hy926 tratadas com LPC e butirato de sódio, estimuladas com ACh, em ausência ou presença de TRIM. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM de pelo menos 3 experimentos independentes. Foram analisados 10.000 eventos de fluorescência a cada experimento. \* $<0,0001$  diferenças relativas ao CT; # $<0,0001$  diferenças relativas ao CT-GLPG e  $\phi <0,0001$  diferenças relativas ao LPC. Two-way ANOVA.

O mesmo protocolo descrito foi utilizado para avaliar a expressão de nNOS total e fosforilada em Ser 1412 em células, que receberam os tratamentos. Os resultados mostram que não há diferença na expressão de nNOS total (figura 22) entre os grupos. Mas ao avaliarmos a fosforilação no sítio de ativação pNOS Ser1412 (figura 23) observamos que há uma diminuição da fosforilação no grupo tratado com LPC, quando comparado ao controle. Entretanto, vimos que o butirato foi capaz de manter a fosforilação da nNOS e níveis semelhantes ao controle, mostrando que o tratamento com butirato mantém em níveis normais de ativação da nNOS.



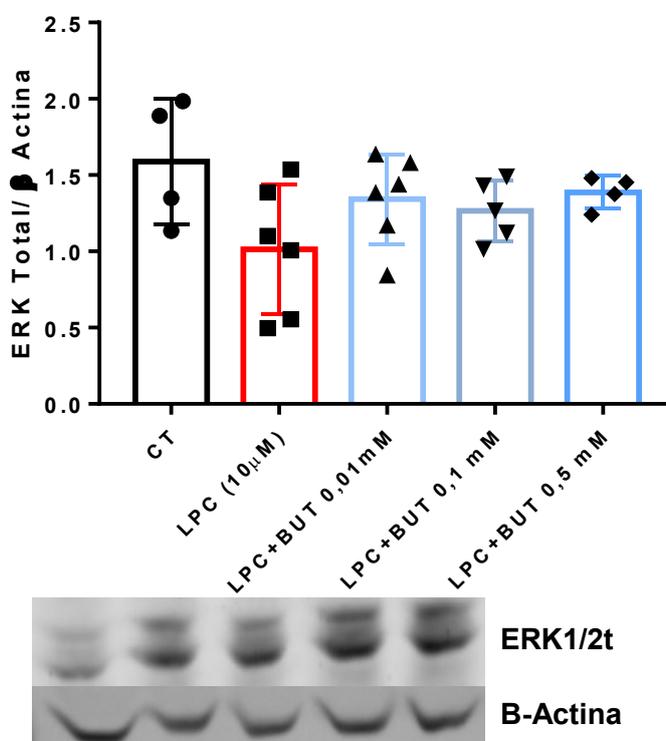
**Figura 22:** Expressão proteica de nNOS em células EA.Hy926 estimuladas com LPC na presença e ausência de butirato de sódio por western blot. Os resultados foram normalizados pelo conteúdo de  $\beta$ -Actina em cada amostra e expressos como média $\pm$ EPM. (n=5-6). Two-way ANOVA.



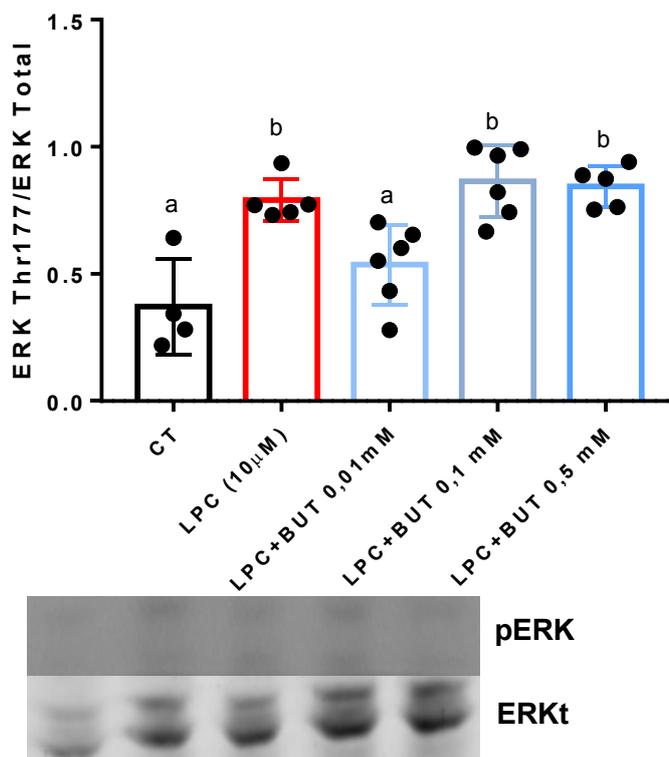
**Figura 23:** Expressão proteica de nNOS fosforilada em Ser1412 em células EA.Hy926 estimuladas com LPC na presença e ausência de butirato de por western blot. Os resultados foram normalizados pelo conteúdo de nNOS total em cada amostra e expressos como média±EPM. (n=5-6). Two-way ANOVA.

#### 6.4.O tratamento com butirato altera a atividade de fosfatases e a ativação de ERK

Os resultados demonstram que não há diferença na expressão de ERK1/2 total (figura 24). Ao avaliarmos a ativação de ERK1/2 (sítio Thr177) observamos que no grupo estimulado com LPC há um aumento da ativação de ERK1/2 quando comparado ao controle, aumento que é revertido a níveis normais na concentração de 0,01mM (figura 25). Efeito que não é observado nas demais concentrações de tratamento (0,1 e 0,5mM). Mostrando que o tratamento com a menor concentração consegue reverter a ativação de ERK1/2.



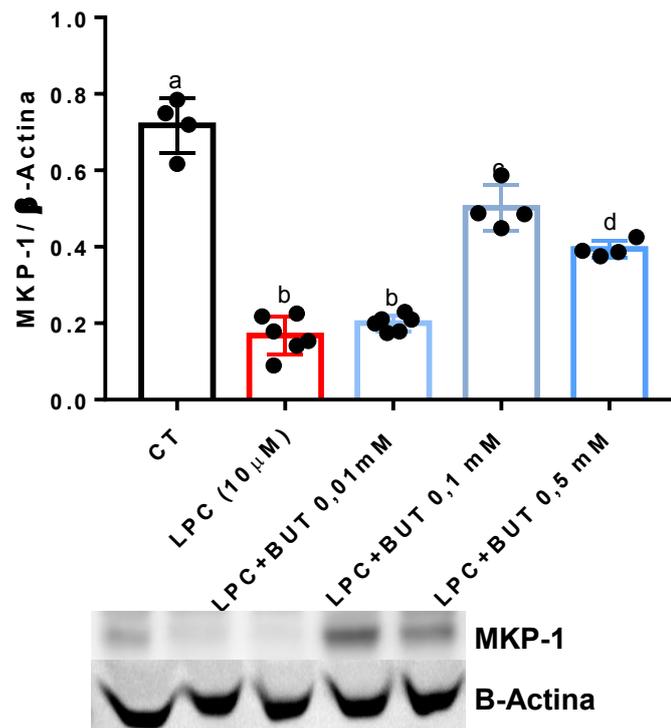
**Figura 24:** Expressão proteica de ERK1/2 em células EA.Hy926 estimuladas com LPC na presença e ausência de butirato de sódio por western blot. Os resultados foram normalizados pelo conteúdo de  $\beta$ -Actina em cada amostra e expressos como média $\pm$ EPM. (n=4-6). Two-way ANOVA.



**Figura 25:** Expressão proteica de ERK1/2 fosforilada em Thr177 em células EA.Hy926 estimuladas com LPC na presença e ausência de butirato de por western blot. Os resultados foram normalizados pelo conteúdo de ERK1/2 total em cada amostra e expressos como média $\pm$ EPM. (n=4-6). Two-way ANOVA.

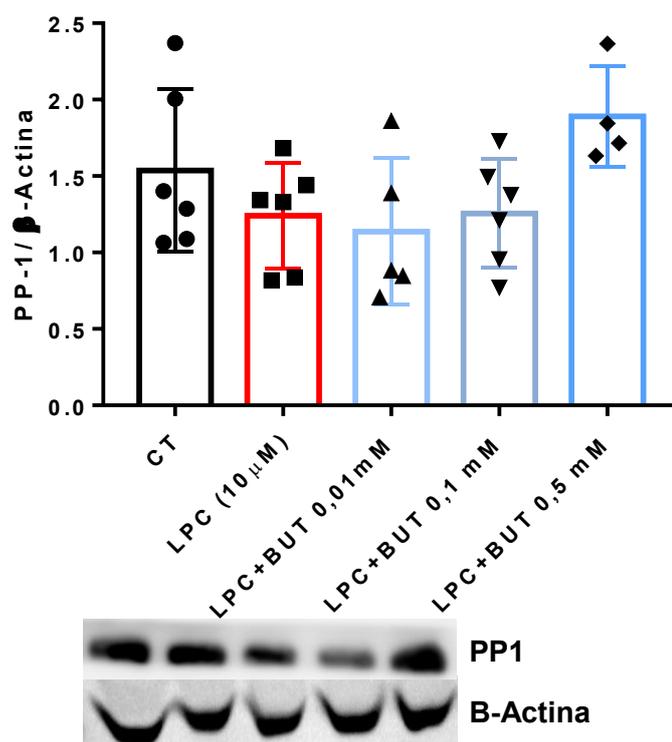
Avaliamos então se essa diminuição da ativação de ERK1/2 estaria correndo pela sua desfosforilação via MKP-1, a principal fosfatase reguladora da atividade de ERK1/2. Os resultados demonstram que há uma diminuição acentuada na expressão de MKP-1 no estímulo com LPC quando comparado ao controle. No entanto, essa diminuição também se encontra presente no tratamento com butirato na concentração de 0,01mM, não diferindo do tratamento com LPC. Também observamos uma diminuição da expressão de MKP-1 nas concentrações de BUT 0,1 e 0,5mM quando comparados ao controle, mas que possuem valores maiores que aqueles apresentados no tratamento apenas com LPC. Esses resultados mostram

que há uma diminuição da expressão proteica de MKP-1 no estímulo com LPC e que a desfosforilação de ERK1/2 observada no tratamento com butirato na concentração de 0,01mM não está associado a essa fosfatase. Assim, é possível que o mecanismo de regulação da ERK1/2, na menor concentração de butirato, esteja associado a outras fosfatases.



**Figura 26:** Expressão proteica de MKP-1 em células EA.Hy926 estimuladas com LPC na presença e ausência de butirato de sódio por western blot. Os resultados foram normalizados pelo conteúdo de  $\beta$ -Actina em cada amostra e expressos como média $\pm$ EPM. (n=4-6). Two-way ANOVA.

Por fim avaliamos se essa diminuição da ativação de ERK1/2 estaria ocorrendo via ação de PP1. Os resultados mostram que não há diferença entre os grupos na expressão total de PP1 (figura 27). Esse resultado ainda não é conclusivo quanto à atividade de PP1, por precisarmos avaliar a expressão de sua molécula de inibição NIPP1.



**Figura 27:** Expressão proteica de PP1 em células EA.Hy926 estimuladas com LPC na presença e ausência de butirato de sódio por western blot. Os resultados foram normalizados pelo conteúdo de  $\beta$ -Actina em cada amostra e expressos como média $\pm$ EPM. (n=4-6).

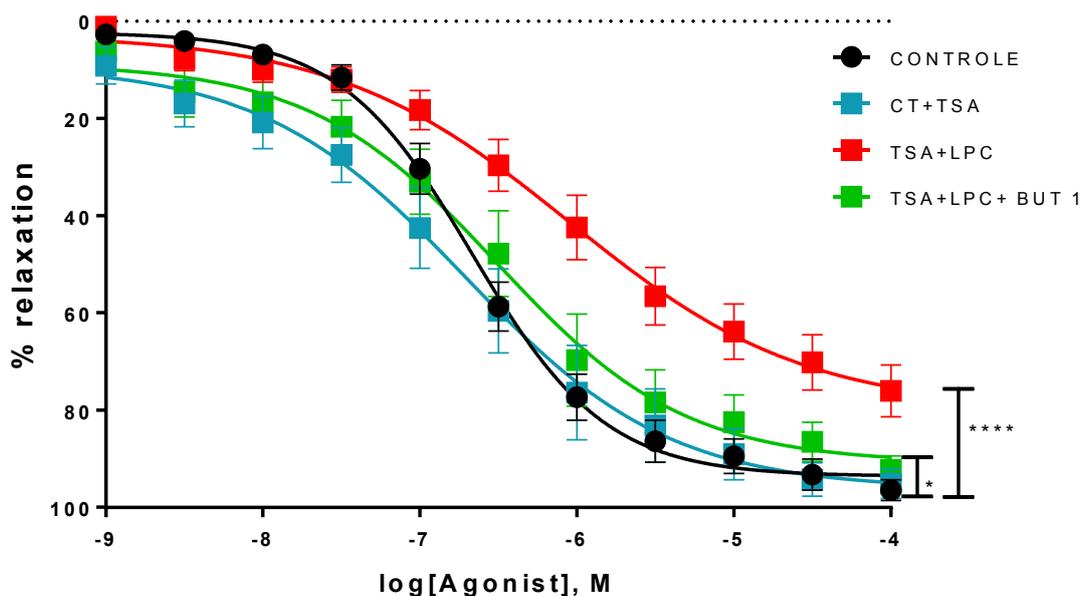
### 6.5.A inibição de Histona deacetilases não reverte a disfunção endotelial promovida por LPC

**Tabela 5:** Valores de EMAX e PD2 dos resultados de relaxamento vascular com a presença de TSA

	Controle	LPC	TSA	LPC+TSA	LPC+TSA+BUT 0,1mM
<b>EMAX (%)</b>	95,70 $\pm$ 9,00	<b>82,10<math>\pm</math>4,53*</b>	94,73 $\pm$ 8,57	<b>73,42<math>\pm</math>14,11*</b>	<b>89,20<math>\pm</math>12,05*</b>
<b>PD2</b>	6,43 $\pm$ 0,69	<b>6,04<math>\pm</math>0,11*</b>	6,59 $\pm$ 0,59	<b>6,06<math>\pm</math>0,48</b>	6,58 $\pm$ 0,74

Os resultados foram expressos como Média $\pm$ EPM dos valores de Log de EC<sub>50</sub> e Emax. \*P<0,05 CT vs TSA BUT 0,1mM. \*\*\*p<0,0001 TSA LPC vs CT, TSA, TSA BUT 0,1mM. Two-way ANOVA.

Observamos que a incubação com TSA não apresentou diferença de resposta quando comparado ao CT (**Figura 28** Emax CT:  $95,70 \pm 9,00$ . Emax TSA:  $94,73 \pm 8,57$ ), mas houve uma redução da resposta no grupo butirato+TSA (**Figura 28** Emax CT:  $95,70 \pm 9,00$ . Emax LPC+TSA+BUT 0,1mM:  $89,20 \pm 12,05$ ). Demonstrando que em presença do TSA, não ocorre a reversão total da disfunção endotelial, como vimos na figura 6 e tabela 1, mas ainda vemos uma melhora significativa na resposta vasodilatadora à ACh. Não observamos a reversão da redução de relaxamento causado pela LPC quando inibimos as HDACs (**Figura 28** Emax CT:  $95,70 \pm 9,00$ . Emax LPC+TSA:  $73,42 \pm 14,11$ ). Esses resultados demonstram que o efeito do butirato, na reversão da disfunção endotelial, não envolve a inibição de HDACs.

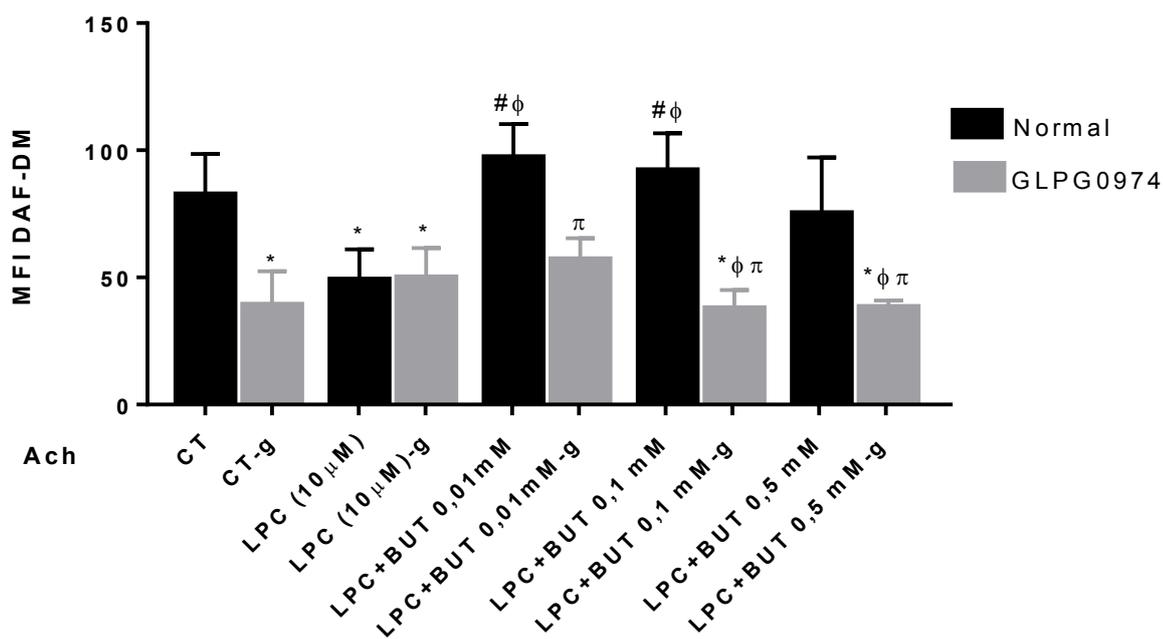


**Figura 28:** Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aortas com endotélio funcional no CT, TSA, TSA+LPC 10 $\mu$ M e TSA+LPC+BUT 0,1mM. (n=9). Two-way ANOVA. \*P<0,05 CT vs TSA BUT 0,1mM. \*\*\*p<0,0001 TSA LPC vs CT, TSA, TSA BUT 0,1mM. Two-way ANOVA.

## 6.6. Papel do receptor GPR43 na produção de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub><sup>-</sup>

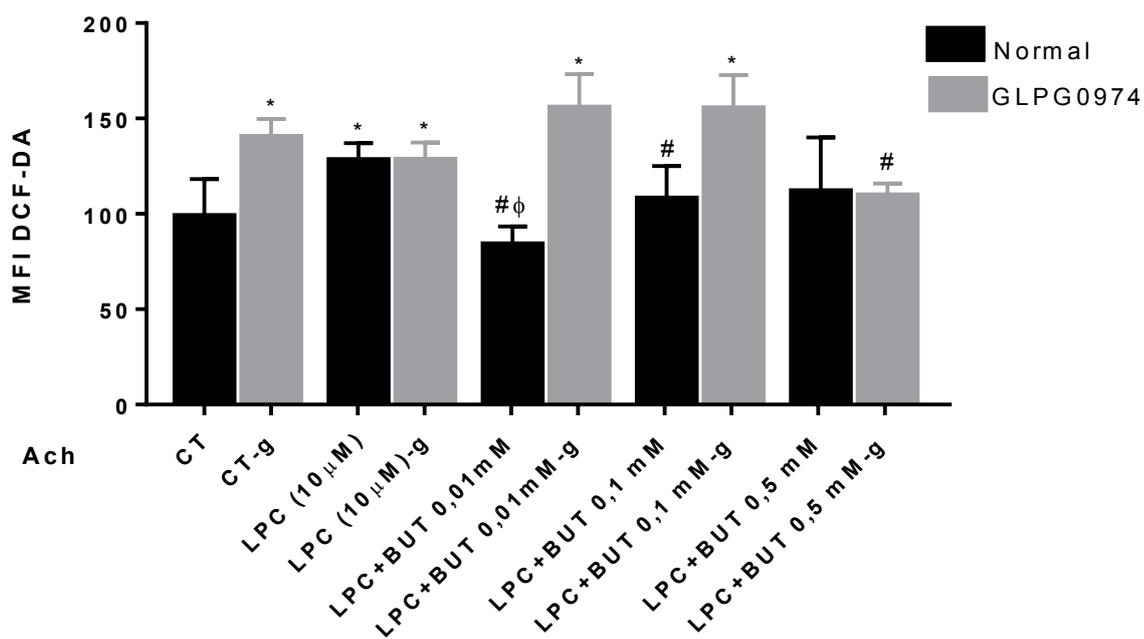
Os receptores acoplados à proteína G (GPRs), que são ativados por meio de dose-dependência de SCFAs (acetato, butirato e propionato), estão envolvidos em diversos processos fisiológicos e patológicos (HARA et al., 2013). Dessa forma, nossa próxima pergunta foi se a ação do butirato (0,01mM) ocorreria via GPR43. Assim, avaliamos se a inibição de GPR43 alteraria a produção de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub><sup>-</sup> nas células EA.Hy926.

Surpreendentemente, observamos que a inibição de GPR43 levou à redução de NO no grupo controle (figura 29). Vale mencionar aqui que nas células incubadas com o doador de NO (SNAP), usado como controle positivo (figura 4 ANEXO), a quantidade de NO detectado é superior ao CT, sugerindo que os níveis de NO gerados pelo SNAP se somam ao NO produzido pelas células endoteliais. Adicionalmente, também é observado menores níveis de NO após inibição do GPR43 no grupo SNAP. Esta redução poderia estar associada ao efeito do receptor na produção de NO, que fora inibido pelo GLPG. Também encontramos redução de NO em todos os grupos com GLPG, quando comparados aos respectivos grupos sem inibição do receptor. Todos os grupos com inibidor foram semelhantes entre si, não sendo observada diferença estatística no estímulo com LPC. Os resultados sugerem que GPR43 é importante para a produção de NO em células endoteliais, pois a inibição de GPR43, por si só, já gera uma disfunção, não sendo possível confirmar se o efeito de BUT ocorre via GPR43, uma vez que a produção de NO se encontra comprometida pela sua inibição.



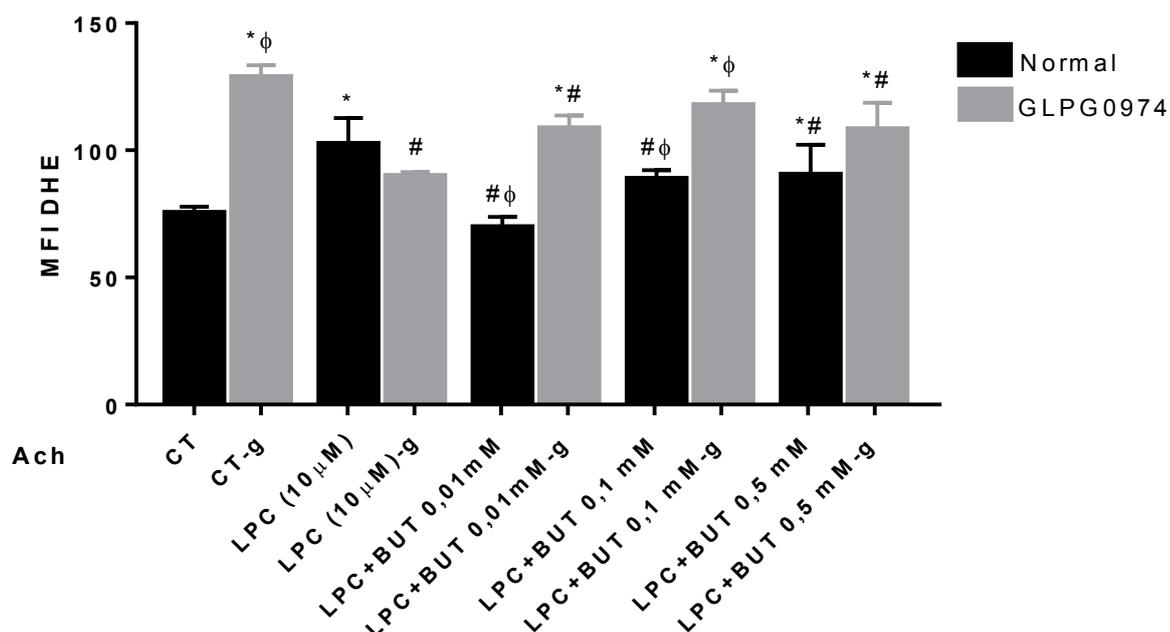
**Figura 29:** Produção de NO em células endoteliais EA.Hy926 tratadas com LPC e butirato de sódio, estimuladas com ACh, na ausência e inibidas com GLPG0974. Os resultados foram expressos como média±EPM de pelo menos 3 experimentos independentes. Foram analisados 10.000 eventos de fluorescência a cada experimento. \*<0,05 diferenças relativas ao CT; #<0,05 diferenças relativas ao CT-GLPG e φ<0,05 diferenças relativas ao LPC. n=7 poços por tratamento. Two-way ANOVA.

Quando avaliamos a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, após a inibição de GPR43, verificamos que há um aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no grupo CT. Demonstrando a importância desse receptor na regulação dos níveis basais de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nessas células endoteliais. O aumento observado nas células estimuladas com LPC, não sofreu alterações com a inibição do receptor. Também observamos que a inibição do GPR43, aboliu o efeito protetor do butirato observado na concentração de 0,01mM, alcançando níveis maiores do que aqueles observados no estímulo com LPC. Curiosamente, na concentração de BUT 0,05mM vemos uma menor produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ao inibirmos o GPR43, estando em níveis semelhantes ao CT. Esse resultado sugere um mecanismo do BUT independente de GPR43 para reduzir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na concentração de 0,5mM. O que nos sugere que a falta do receptor interfere no controle intracelular do estado redox, mas não exacerba o aumento apresentado por LPC.



**Figura 30:** Produção de  $H_2O_2$  em células endoteliais EA.Hy926 tratadas com LPC e butirato de sódio, estimuladas com ACh, na ausência e inibidas com GLPG0974. Os resultados foram expressos como média±EPM de pelo menos 3 experimentos independentes. Foram analisados 10.000 eventos de fluorescência a cada experimento. \* $<0,05$  diferenças relativas ao CT; # $<0,05$  diferenças relativas ao CT-GLPG e  $\phi <0,05$  diferenças relativas ao LPC. n=7 poços por tratamento. Two-way ANOVA.

Quando avaliamos produção de  $O_2^-$  após a inibição de GPR43, nós observamos que há um aumento da produção de  $O_2^-$  no grupo CT. Demonstrando a importância desse receptor na regulação dos níveis de  $O_2^-$  nas células endoteliais, sob estímulo de ACh. Curiosamente, ao inibirmos o receptor GPR43, percebemos que a LPC não aumentou a produção de  $O_2^-$ . Também observamos que a inibição do GPR43, aboliu o efeito protetor observado com butirato. Provavelmente, isso resulta do efeito adverso da inibição do GPR43. No entanto, ao compararmos com CT+GLPG, percebemos que os tratamentos com BUT 0,01 e 0,5mM aenuaram a produção de  $O_2^-$ , em comparação ao aumento decorrido da inibição do receptor por si só.



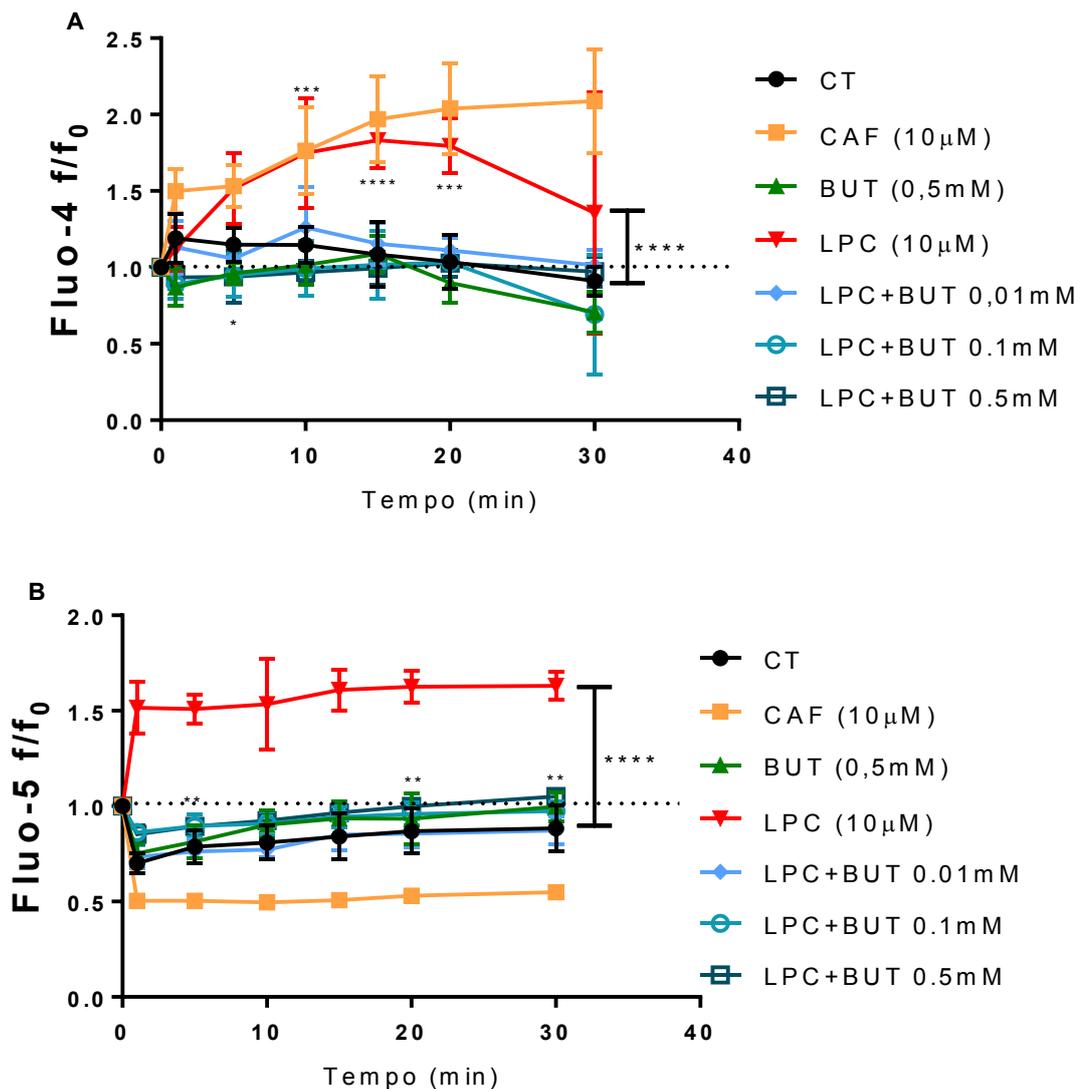
**Figura 31:** Produção de  $O_2^-$  em células endoteliais EA.Hy926 tratadas com LPC e butirato de sódio, estimuladas com ACh, na ausência e inibidas com GLPG0974. Os resultados foram expressos como média±EPM de pelo menos 3 experimentos independentes. Foram analisados 10.000 eventos de fluorescência a cada experimento. \* $<0,05$  diferenças relativas ao CT; # $<0,05$  diferenças relativas ao CT-GLPG e  $\phi <0,05$  diferenças relativas ao LPC. n=7 poços por tratamento. Two-way ANOVA.

### 6.7. O papel do cálcio no efeito apresentado por butirato de sódio

Observamos que o estímulo com ACh levou a um influxo transiente de cálcio no citoplasma das células controle nos primeiros 5 minutos, concentração que vai decaindo até a valores basais ao final de 30 minutos (figura 32A). Quando observamos o comportamento das células estimuladas com LPC, acompanhamos um aumento lento e superior da concentração de  $Ca^{2+}$ , quando comparado aos demais grupos, sendo que se atinge o pico máximo de aumento aos 15 minutos e a partir dos 20 minutos começamos a ver o seu decaimento. Comportamento semelhante ao controle foi visto nas células tratadas com butirato a 0,01mM, apesar de observarmos um pico de aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  no tempo de 10 minutos, que segue um decaimento semelhante ao apresentado pelo controle. Já as

demais concentrações de butirato demonstraram um padrão diferente de decaimento das concentrações citoplasmáticas de  $\text{Ca}^{2+}$  nos primeiros 5 minutos, seguido de concentrações semelhantes àsquelas observadas no controle.

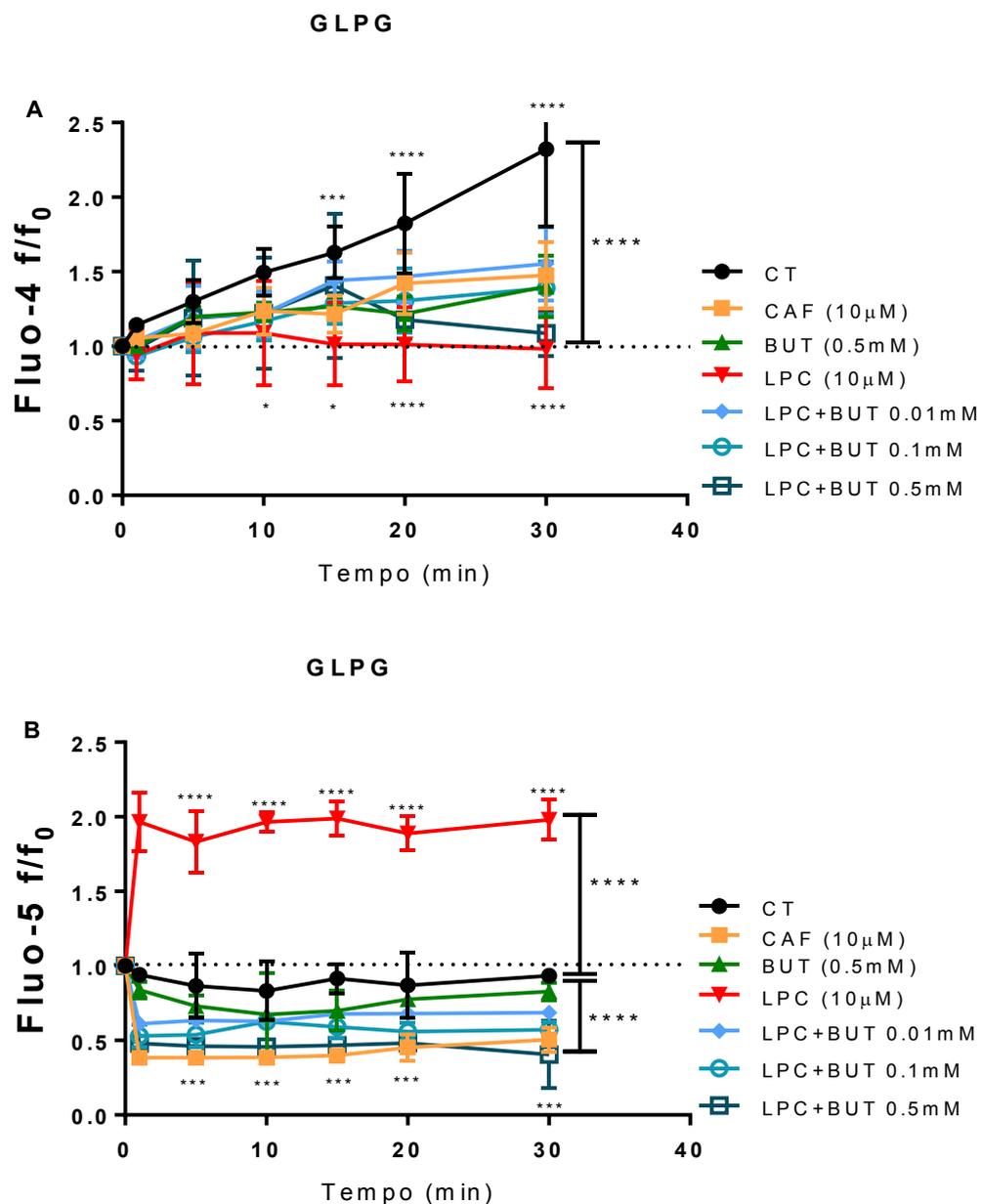
Com relação ao efluxo de cálcio do retículo endoplasmático para o citosol, observamos que ouve uma rápida liberação de cálcio reticular no grupo controle, demonstrada no gráfico pelo decaimento da fluorescência (figura 32B). No entanto, no grupo estimulado com LPC foi observado um aumento da acumulação de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro do retículo quando estimulado com ACh. Os tratamentos com butirato levaram a liberação rápida de cálcio do retículo, semelhantemente ao controle no tratamento com butirato a 0,01mM, e em menor intensidade nas concentrações de 0,1mM e 0,5 mM. Esses dados mostram que o tratamento com butirato retorna o trânsito de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a níveis normais.



**Figura 32:** Mobilização de cálcio durante estimulação com ACh em células endoteliais EA.Hy926 em células tratadas com LPC e butirato de sódio (A) Influxo de cálcio extracelular na presença LPC, butirato e cafeína como controle positivo. (B) Efluxo de cálcio do retículo endoplasmático para o citosol, na presença LPC, butirato e cafeína como controle positivo. Os resultados foram expressos como média±EPM de 2 experimentos independentes. Foram analisados 10.000 eventos de fluorescência em cada ponto. n=5 poços por grupo.

Para avaliar se o efeito do butirato nos níveis citosólicos de cálcio após o estímulo com ACh é por meio do receptor GPR43, realizamos a pré-incubação das células com o inibidor GLPG0974 (por pelo menos 1 hora) e seguimos o protocolo, como descrito anteriormente. Observamos que a inibição do receptor levou a uma alteração do influxo transiente de cálcio no grupo controle, onde observamos um aumento crescente da concentração. O grupo LPC tem um pequeno influxo até o tempo de 10 minutos, a partir de então vemos o decaimento a nível basal. Nas concentrações de butirato observamos um aumento semelhante ao grupo controle com um pico aos 15 minutos, seguido de um platô nos grupos tratados com butirato a 0,01 e 0,1mM; já no grupo LPC+BUT 0,5mM vemos um decaimento a níveis próximos ao basal.

Com relação ao efluxo de cálcio do retículo vemos que há um retardo da liberação de cálcio reticular no controle, diferentemente do que vemos no grupo tratado com LPC onde ainda se observa o efeito acumulativo de cálcio dentro do retículo após a estimulação com ACh. Nos grupos tratados com butirato observamos que há uma maior liberação de cálcio do retículo, liberação que é sustentada, pois não vemos o retorno desses valores ao basal no tempo avaliado. Juntos, nossos dados mostram que o GPR43 tem um papel fundamental na homeostase do trânsito de cálcio nas células endoteliais estimuladas com ACh. Adicionalmente, os resultados sugerem que a ação de controle do cálcio exercida pelo butirato é independente do receptor GPR43.



**Figura 33:** Mobilização de cálcio durante estimulação com ACh em células endoteliais EA.Hy926 em células tratadas com GLPG0974. (A) Influxo de cálcio extracelular na ausência do receptor GPR43 tratadas com LPC, butirato e cafeína (10 $\mu$ M) como controle positivo. (B) Efluxo de cálcio do retículo endoplasmático para o citosol na inibição do receptor GPR43 na presença de LPC, butirato e cafeína (10 $\mu$ M) como controle positivo. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM de 2 experimentos independentes. Foram analisados 10.000 eventos de fluorescência a cada ponto. n=5 poços por grupo.

## 7. DISCUSSÃO

No presente trabalho nós mostramos que o tratamento com butirato na concentração de 0,1mM, consegue reverter a disfunção endotelial induzida por LPC, promovendo aumento na produção de NO, via nNOS. Também mostramos que esse efeito é independente do receptor GPR43, que surpreendentemente demonstrou ser necessário para a manutenção da homeostase das células endoteliais.

A disfunção endotelial é o evento chave para o desenvolvimento da aterosclerose (RABELINK; WIJEWICKRAMA; DE KONING, 2007). Nossos dados corroboram com a literatura, pois, foi demonstrado que LPC reduz o relaxamento vascular mediado por ACh, assim como promover o aumento da contração mediada por Phe, levando à disfunção endotelial (DENG; LI, 2005; FROESE et al., 1999; KOZINA et al., 2014; LEUNG; HUANG; MAN, 2003). Além disso, nosso trabalho, confirma estudos anteriores (CAMPOS-MOTA et al., 2017; NAVIA-PELAEZ et al., 2018), mostrando que não há alteração da contração nos anéis desnudos de endotélio na presença de LPC, confirmando que as alterações induzidas pela LPC ocorrem por uma disfunção da camada endotelial.

Alguns trabalhos relatam que a LPC é capaz de alterar a função endotelial através da ativação de proteína quinase C (PKC), uma proteína tirosina quinase (PTK). A ativação de PKC leva ao aumento na produção de radicais livres, reduzindo a biodisponibilidade do NO e prejudicando o relaxamento vascular dependente do endotélio (OHARA et al., 1994). Isso poderia explicar os nossos AChados mostrando aumento na produção de ROS e diminuição na produção de NO, frente ao estímulo com ACh. Sabe-se que as vias de PTK atuam em diversas funções celulares como crescimento, diferenciação, proliferação e contração vascular. Já foi demonstrado que LPC ativa uma cascata de sinais via PKC que culmina na ativação de ERK, levando a um aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  e, por sua vez, contração vascular (MATSUMOTO; KOBAYASHI; KAMATA, 2007; SUENAGA; KAMATA, 2002). Estudos utilizando aorta de ratos (MUROHARA et al., 1994; SUENAGA; KAMATA, 1998, 2002) e coronária de porco (MUROHARA et al., 1994) mostram aumento da contração na presença de LPC, pela resposta contrátil potencializada pelo aumento de  $Ca^{2+}$  citosólico. Esses estudos corroboram com os nossos AChados de citometria para Flúor-4, onde há um aumento exacerbado do  $Ca^{2+}$  citoplasmático levando ao

acúmulo de  $Ca^{2+}$  no retículo, assim como aumento da fosforilação de ERK no seu sítio de ativação, mas sem aumento de sua expressão. LPC também estimula a atividade de fosfolipase D (PLD) em cultura de células HUVEC, bloqueando as vias de sinalização dependentes de proteína G, através do desacoplamento entre a proteína G e o seu receptor (COX; COHEN, 1996; FREEDMAN; SAUTER, 1999).

Está bem estabelecido que o NO é o principal fator de relaxamento derivado do endotélio (EDFR) nas artérias de condutância (POHL; DE WIT; GLOE, 2000). Ao avaliarmos a participação das NOS na produção de NO em células EA.Hy926 utilizando o inibidor não seletivo L-NNA, vimos a diminuição de NO nas células controle e, em menor grau, nas células estimuladas com LPC. Dessa forma, pode-se inferir que há um comprometimento da via das NOS após o tratamento com LPC. A incubação com LPC, mesmo por pouco tempo, resulta em um aumento da sua concentração intracelular e, sua rápida incorporação na membrana plasmática de células endoteliais (CROSET et al., 2000; RIEDERER et al., 2012). Isso sugere que, no endotélio, ocorra uma captação de LPC circulante, permitindo sua interação com as NOS, alterando a sua integridade estrutural e funcional, consequentemente diminuindo a formação de NO.

Mota *et al* em 2017 observaram que a adição de L-arginina em preparações de aorta de camundongos tratados com LPC previne a disfunção endotelial. Esse resultado demonstra que, a depleção de NO causada por LPC poderia estar atrelada a um desacoplamento de eNOS e/ou nNOS devido à, diminuição dos níveis de L-Arginina. De fato, a LPC pode atuar na indução de arginases, que acarretariam no desacoplamento de eNOS (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). Esse resultado se mostra contrário aos nossos AChados de eNOS por western blot, onde observamos que não há diferença da sua ativação bem como de sua expressão em anéis de aorta tratados com LPC comparados aos controles. Entretanto, FUKUCHI; GIAID, (1999) mostraram que a expressão de eNOS permanece inalterada em lesões ateroscleróticas muito precoces. Alguns estudos mostram a diminuição da expressão de eNOS, após o tratamento com LPC. Entretanto, o tempo de exposição a LPC utilizado foi maior, variando entre 2 horas (CHOI; PARK, 2010) a 24 horas (TARDIVEL et al., 2009). Todavia, KOZINA et al., (2014) não observaram nenhuma alteração na expressão proteica da eNOS ao tratar células HUVEC com LPC por um período de 15 minutos (ROSEN; TSAI; POU, 2002).

Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que a nNOS é importante para o relaxamento vascular dependente do endotélio (CAPETTINI; CORTES; LEMOS, 2010) por meio da produção de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CAPETTINI et al., 2009). Assim, realizamos ensaios de relaxamento vascular também utilizando o inibidor seletivo da nNOS, o TRIM. Observamos que os grupos incubados com TRIM apresentaram menor percentual de relaxamento vascular em comparação ao controle, mas a LPC não apresentou efeito adicional (sendo o grupo LPC+TRIM semelhante ao TRIM). Em concordância com esse resultado, nas células EA.hy926 tratadas com TRIM, há uma pequena redução de NO e uma maior redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esses resultados foram confirmados por western blot, mostrando a menor ativação de nNOS nas células tratadas com LPC. Esses dados estão de acordo com estudos prévios do nosso grupo mostrando a redução do relaxamento dependente de endotélio em razão de uma redução da liberação de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela nNOS (CAMPOS-MOTA et al., 2017).

Uma consequência do desacoplamento das NOS é o aumento na formação de ROS. Nos experimentos de citometria observamos um aumento da produção de radicais superóxido e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por estímulo com LPC. Ao contrário do mostrado por Mota *et al* 2017 que encontraram a diminuição da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células endoteliais EA.Hy926 tratadas com LPC. Outros estudos mostram o aumento da produção de ROS em células tratadas com LPC (DENG; LI, 2005; KUGIYAMA et al., 2015; OJALA et al., 2007; TAKESHITA et al., 2000). O que se soma a outros fenômenos para explicar o aumento na contração e a diminuição no relaxamento vascular.

Diversos trabalhos na literatura relatam os efeitos benéficos dos SCFAs. Particularmente, o butirato tem ganhado destaque sobre seus benefícios no sistema cardiovascular, a saber sua ação antioxidante (AGUILAR et al., 2016; HAMER et al., 2009), anti-lipidêmico (MORAES et al., 2003), anti-inflamatório (FERREIRA et al., 2012; VIEIRA et al., 2012; AGUILAR et al., 2016), antiobesogênico (AGUILAR et al., 2018; HENAGAN et al., 2015; JIAN et al., 2016) e antiaterogênico (AGUILAR et al., 2016, 2018; RAMOS et al., 2002). No presente trabalho, o butirato de sódio apresentou um importante efeito de reversão da disfunção endotelial causada por LPC, de maneira dependente da concentração.

A disfunção endotelial induzida pelo estresse oxidativo é o fenômeno de maior importância nos pacientes com doenças cardiovasculares e síndrome metabólica (GHOSH; WALKER, 2017). Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstram forte correlação entre o estado redox e respostas celulares patológicas (BILAN; BELOUSOV, 2016; WINTERBOURN, 2014). Nos experimentos de citometria observamos que o tratamento com butirato normalizou a produção de  $O_2^-$  em células EA.Hy926, que haviam sido previamente expostas a LPC. O tratamento também levou a diminuição da produção de  $H_2O_2$ , quando comparado ao grupo LPC. Esses dados estão de acordo com o efeito antioxidante do butirato, reduzindo o estresse oxidativo induzido pela LPC. Já é descrito que o butirato de sódio tem a capacidade de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como a catalase e heme oxidase-1. Em nossos estudos prévios observamos que a suplementação oral de butirato em modelo murino de aterosclerose reduziu a produção de  $O_2^-$  e nitrotirosina na lesão aterosclerótica (AGUILAR et al., 2016). Foi também observada a diminuição de ROS em células EA.hy926 pré-incubadas com LDLox e tratadas com butirato (AGUILAR et al., 2014). Esses efeitos foram relacionados à diminuição da expressão proteica da subunidade p22phox da NADPH oxidase (AGUILAR et al., 2016, 2018; DOS SANTOS et al., 2015).

O NO contribui em diversas etapas da regulação da função vascular, contratilidade cardíaca, transmissão sináptica e defesa celular, além de prevenir a formação de placa aterosclerótica em artérias de larga condutância (KUHLENCORDT et al., 2013). Demonstramos que o tratamento de células expostas a LPC, o butirato levou à normalização da produção de NO frente ao estímulo com a ACh. Sabe-se que as NOS geram intermediários como resultado do transporte de elétrons durante o seu ciclo enzimático, incluindo o  $H_2O_2$  (FREED; GUTTERMAN, 2017; HEINZEL et al., 1992; RHEE, 2006; TSAI; NIENABER; EAGLE, 2005). Diversos estudos demonstraram o papel do  $H_2O_2$  como um EDRF em modelos murinos e humanos de artérias de resistência (GODO; SHIMOKAWA, 2017; MATOBA et al., 2002). A sua produção, como EDRF, também está atrelada a atividade de nNOS sendo responsável por uma porção considerável da vasodilatação mediada por ACh em modelo murino (CAMPOS-MOTA et al., 2017; CAPETTINI et al., 2009; NAVIA-PELAEZ et al., 2018). Mostramos que a inibição da nNOS reduziu drasticamente a produção de NO e  $H_2O_2$  nas células tratadas com

LPC e butirato (0,01mM), e anulou a melhora vasodilatadora induzida por butirato (0,1mM) nos anéis de aorta pré-incubados com LPC. Nossos AChados de western blot mostram que a eNOS não foi afetada e sugerem que o butirato atua na ativação da nNOS e não em sua expressão proteica. O que nos demonstra que de alguma forma o butirato está levando a uma maior atividade de nNOS. Estudos publicados por GODO; SHIMOKAWA, (2017) demonstraram que, no endotélio, a eNOS é ativada por estresse de cisalhamento e diversos agonistas levam a elevados níveis de cálcio intracelular, interações com substratos, co-fatores, ativação de proteínas regulatórias e por último fosforilação e/ou desfosforilação. O controle dessa fosforilação é mediado pelas proteínas fosfatases PP1, PP2A e PP2B (calcinerina), embora ainda não se tenha elucidado a contribuição de cada fosfatase e os sítios de desfosforilação específicos (MICHELL et al., 2001). Nós observamos que não houve diferença na expressão de PP1 nas células tratadas com butirato quando comparado ao grupo LPC, mas isso não nos diz muito sobre a sua ativação visto que ela pode ou não estar acoplada ao seu inibidor NIPP1. Estudos demonstraram que um mecanismo associado à ativação de nNOS em aortas e células endoteliais estimuladas com ACh, é mediado por PP1, que desfosforila o resíduo Ser852 (sítio inibitório) da nNOS. Esse mecanismo está comprometido quando as células são expostas à LDLox e LPC, acarretando o desacoplamento de nNOS e a menor produção de NO (CAMPOS-MOTA et al., 2017; NAVIA-PELAEZ et al., 2018).

O controle da produção de NO e da transcrição de genes relacionados a exacerbação dos sinais inflamatórios na aterosclerose estão associados a ativação de ERK1/2 (HU et al., 2000). O tratamento com butirato não alterou a expressão proteica de ERK1/2, mas levou a diminuição da sua ativação nos grupos tratados com as concentrações de 0,01mM e 0,1mM. Esse dado nos trouxe a hipótese de que o butirato pudesse afetar a atividade de fosfatases, envolvidas na desfosforilação de ERK1/2.

As fosfatases das proteínas quinases ativadas por mitógenos (*MAP kinase phosphatases*-MKPs) são uma família que consiste de 10 fosfatases dual específicas que são classificadas em três grupos baseadas na sua localização celular (ROSKOSKI, 2012). Um dos membros melhor estudados é a MKP-1 que possui um papel principal na dinâmica da regulação de processos fisiológicos como regeneração do músculo esquelético, imunidade adaptativa e no metabolismo

(ROTH et al., 2009; SHI et al., 2010). Nossos resultados mostram que há uma menor expressão de MKP-1 nas células tratadas com butirato 0,01mM, semelhante a expressão vista no grupo LPC e que há um aumento dessa expressão nas demais concentrações. A expressão de MKP-1 é altamente regulada pelo seu nível de transcrição e pela estabilidade da proteína. Ferrante *et al* em 2003 mostraram por *microarray* que animais tratados com butirato de sódio apresentaram aumento de MKP-1, assim como uma diminuição da atividade de ERK1/2, o que mostrou estar relacionada a uma melhora dos animais que apresentavam doença de Huntington (FERRANTE et al., 2003). Alguns estudos em linhagens de adipócitos mostraram que os níveis de MKP-1 aumentam durante a diferenciação desses adipócitos com o concomitante decréscimo da atividade de ERK1/2 (SAKAUE et al., 2004). Vimos que a expressão de MKP-1 foi aumentada pelo butirato a 0,1 e 0,5mM, em relação a LPC, o que confirma a propriedade do butirato em regular positivamente a expressão de MKP-1, no entanto, na concentração de 0,01mM a MKP-1 se manteve similar a LPC, sugerindo que outros mecanismos para a desfosforilação de ERK1/2 possam estar envolvidos. A ERK1/2 pode ser ativada não somente por receptores de tirosina quinase, mas também de forma não canônica por GPRs. Estes criam uma série de *inputs* críticos para o metabolismo celular que envolve a desfosforilação de ERK1/2 de uma maneira dependente de PP2, mas não de PP1 (Watson, 2018).

O cálcio intracelular é importante para respostas mecano-sensíveis nas células endoteliais (DEMÉR et al., 1993). De forma similar à eNOS, a atividade da nNOS é regulada pelos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  e pela ativação de proteínas quinases e fosfatases (LIN et al., 2003). Avaliamos o influxo citosólico de cálcio e a mobilização de cálcio reticular. Observamos que o tratamento com LPC aumenta expressivamente o influxo de cálcio e seu armazenamento no retículo. O tratamento com butirato normalizou o influxo de cálcio e sua mobilização no retículo. Esses resultados, sugerem que o butirato poderia contribuir para o restabelecimento da atividade de nNOS, por mecanismos que regulariam os níveis e a disponibilidade de cálcio, tornando a nNOS mais sensível a níveis mais baixos de cálcio. O que não se tem estabelecido de forma clara é se a abertura de canais de cálcio é deflagrada após a depleção das reservas de  $Ca^{2+}$  intracelular. A PKA pode fosforilar o resíduo Ser1417 para ativar a nNOS (OSUKA et al., 2013). Alguns estudos sugerem a

ativação PP1 e calcinerina pela PKA, levando a ativação de nNOS em células neuronais(LIU et al., 2004; RAMEAU et al., 2007).

São descritos dois mecanismos principais pelos quais o butirato exerce os seus efeitos, que são: Inibição direta de histonas desacetilases (HDACs) e sua ligação ao seu receptor acoplado à proteína G (GPRs). O butirato é um potente inibidor de HDACs apresentando aproximadamente 80% de eficiência inibitória (KASUBUCHI et al., 2015). Em nosso estudo, o butirato melhorou o relaxamento vascular nas preparações de anéis de aorta estimuladas com LPC, portanto reduzindo a disfunção vascular. Esse efeito não ocorreu com o uso do inibidor de HDAC, o TSA, sugerindo que o mecanismo de ação do butirato, em nosso modelo de disfunção induzida por LPC, não depende de sua atuação nas HDACs.

O receptor GPR43 é o principal receptor envolvido efeitos dos SCFAs na inflamação e desordens imunológicas (ULVEN, 2012). Em nosso estudo, a inibição de GPR43 nas células EA.Hy926 por si só reduziu a síntese de NO e aumentou a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, sem que fosse observado exacerbação por LPC. O que pode ser explicado pelo fato de que a ativação do receptor GPR43 é conectado, tanto a Gi quanto Gq, prevalecendo as ações geradas por Gq, levando ao aumento dos níveis de cAMP e aumentando os níveis de cálcio citoplasmáticos, assim como alternativamente a sinalização via β-arrestinas, que vai produzir efeitos anti inflamatórios via inibição de NF-κB (BROWN et al., 2003). Além disso, a inibição levou a um aumento da entrada de cálcio para o citoplasma no controle, bem como a diminuição da liberação de cálcio do retículo; mostrando que ele possui papel importante na regulação da abertura de canais de cálcio presentes na membrana. Em estudos prévios o ligante ortostérico GLPG0974 mostrou grande potência em antagonizar a elevação do Ca<sup>2+</sup> mediada pelo acetato (PIZZONERO et al., 2014).

Noroomid *et al.* em 2020 mostraram recentemente que o butirato derivado da microbiota apresenta um efeito protetor sobre o desenvolvimento de hiperplasia neointimal após injúria arterial. Este efeito foi associado à recuperação endotelial, *in vivo*, bem como à promoção da migração de células endoteliais, observado *in vitro* em células HUVEC de forma dependente de GPR41 (FFAR3) e não de GPR43 (FFAR2) (NOOROMID et al., 2020). Em nosso trabalho, nós observamos que o butirato acelerou o processo de cicatrização/fechamento da fenda na camada de células endoteliais EA.Hy926 *in vitro*. Este resultado demonstra uma propriedade

extremamente benéfica do butirato que é estabelecer um efeito protetor na integridade da camada endotelial. Um dos eventos importantes na disfunção endotelial e aterogênese consiste justamente no dano ao endotélio como, por exemplo, pelo estresse de cisalhamento (fluxo turbilhonar) e também em procedimentos cirúrgicos para revascularização, tais como *stenting*, angioplastia com balão e *by-pass* (NOOROMID et al., 2020).

Em resumo, fornecemos indícios de que o efeito apresentado pelo butirato sobre o aumento da produção de NO via nNOS, em nosso modelo, não se dá por ativação via GPR43. Assim, se faz necessários outros estudos para avaliar a possível participação do GPR41 e/ou GPR109 nos efeitos protetores apresentados aqui.

## **8. CONCLUSÃO**

Os resultados apresentados neste trabalho nos permitem concluir que o butirato em baixa concentração reverteu a disfunção endotelial aguda induzida por LPC, pelo aumento na produção de NO via nNOS, assim como pela redução na produção de ROS. Esse efeito parece não ser dependente do receptor GPR43 nem da inibição de HDACs. Porém, o receptor GPR43 é, de alguma forma, importante para a manutenção da homeostase das células endoteliais.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, E. C. et al. Butyrate impairs atherogenesis by reducing plaque inflammation and vulnerability and decreasing NFκB activation. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 24, n. 6, p. 606–613, 2014.

AGUILAR, E. C. et al. Oral butyrate reduces oxidative stress in atherosclerotic lesion sites by a mechanism involving NADPH oxidase down-regulation in endothelial cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 34, p. 99–105, 2016.

AGUILAR, E. C. et al. Sodium butyrate modulates adipocyte expansion, adipogenesis, and insulin receptor signaling by upregulation of PPAR-γ in obese Apo E knockout mice. **Nutrition**, v. 47, p. 75–82, 2018.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical journal**, v. 357, n. Pt 3, p. 593–615, 2001.

ANDERSON, J. W. et al. Health benefits of dietary fiber. **Nutrition Reviews**, v. 67, n. 4, p. 188–205, 2009.

BILAN, D. S.; BELOUSOV, V. V. Genetically encoded probes for NAD<sup>+</sup>/NADH monitoring. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 100, p. 32–42, 2016.

BODE-BÖGER, S. M. et al. L-arginine-induced vasodilation in healthy humans: Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 46, n. 5, p. 489–497, 1998.

BOGER, R. H.; BODE=BOGER, S. M. Asymmetric Dimethylarginine, Derangements of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Pathway, and Cardiovascular Diseases. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 26, n. 5, p. 539–546, 2000.

BROWN, A. J. et al. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 13, p. 11312–11319, 2003.

CALABRESE, V. et al. Nitric oxide in the central nervous system: Neuroprotection versus neurotoxicity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 10, p. 766–775, 2007.

CAMPOS-MOTA, G. P. et al. Role of ERK1/2 activation and nNOS uncoupling on endothelial dysfunction induced by lysophosphatidylcholine. **Atherosclerosis**, v. 258, p. 108–118, 2017.

CAPETTINI, L. et al. Decreased production of neuronal NOS-derived hydrogen peroxide contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 6, p. 1738–1748, nov. 2011.

CAPETTINI, L. S. A. et al. Vasodilator and antioxidant effect of xanthenes isolated from Brazilian medicinal plants. **Planta Medica**, v. 75, n. 2, p. 145–148, 2009.

CAPETTINI, L. S. A.; CORTES, S. F.; LEMOS, V. S. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 643, n. 2–3, p. 260–266, 2010.

CHAI, J. T.; DIGBY, J. E.; CHOUDHURY, R. P. GPR109A and vascular inflammation. **Current atherosclerosis reports**, v. 15, n. 5, 2013.

CHANG, G. et al. Sodium butyrate modulates mucosal inflammation injury mediated by gpr41/43 in the cecum of goats fed a high concentration diet. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. AUG, p. 1–10, 2019.

CHEN, Y. et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibition improves myocardial function and prevents cardiac remodeling in diabetic mice. **Cardiovascular Diabetology**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2015.

CHLOPICKI, S. Perspectives in pharmacology of endothelium: From bench to bedside. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 4, p. vi–ix, 2015.

CHOI, J. H.; XIE, Q. W. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 2, p. 599–604, 1992.

CHOI, S.-H.; PARK, S. Y. Superóxide generated by lysophosphatidylcholine induces endothelial nitric oxide synthase downregulation in human endothelial cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 233–240, 2010.

CHOUDHARY, C. et al. Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions. **Science**, v. 325, n. 5942, p. 834–840, 2009.

COOKE, J. P.; OKA, Y. Atherogenesis and the arginine hypothesis. **Current atherosclerosis reports**, v. 3, n. 3, p. 252–259, 2001.

COX, D. A.; COHEN, M. . Lysophosphatidylcholine stimulates phospholipase D in human coronary endothelial cell: role of PKC. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 271, n. 4, p. 1704–1706, 1996.

CROSET, M. et al. Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. **Biochemical Journal**, v. 345, n. 1, p.

61–67, 2000.

DAIBER, A. et al. The “exposome” concept-how environmental risk factors influence cardiovascular health. **Acta Biochimica Polonica**, v. 66, n. 3, p. 269–283, 2019.

DART, A. M.; CHIN-DUSTING, J. P. F. Lipids and the endothelium. **Cardiovascular Research**, v. 43, n. 2, p. 308–322, 1999.

DEMER, L. L. et al. Mechanical stimulation induces intercellular calcium signaling in bovine aortic endothelial cells. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 264, n. 6 33-6, 1993.

DENG, P. Y.; LI, Y. J. Calcitonin gene-related peptide and hypertension. **Peptides**, v. 26, n. 9, p. 1676–1685, 2005.

DOS SANTOS, L. C. et al. Combination of azathioprine and aminosalicilate treatment prevent risk of cardiovascular disease in women with ulcerative colitis by reducing inflammation. **Medical Science Monitor**, v. 21, p. 2305–2315, 2015.

DULLAART, R. P. F. et al. Role of elevated lecithin: Cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein activities in abnormal lipoproteins from proteinuric patients. **Kidney International**, v. 44, n. 1, p. 91–97, 1993.

EBERMANN, L.; SPILLMANN, F. The angiotensin-(1-7) receptor agonist AVE0991 is cardioprotective in diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 590, n. 3, p. 276–280, 2008.

FERRANTE, R. J. et al. Histone Deacetylase Inhibition by Sodium Butyrate Chemotherapy Ameliorates the Neurodegenerative Phenotype in Huntington’s Disease Mice. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 28, p. 9418–9427, 2003.

FORSTERMANN, U.; POLLOCK, J. S. Isoforms of nitric-oxide synthase: purification and regulation. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 258–264, 1994.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

FREED, J. K.; GUTTERMAN, D. D. Communication Is Key: Mechanisms of Intercellular Signaling in Vasodilation. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 69, n. 5, p. 264–272, 2017.

FREEDMAN, J. E.; SAUTER, R. Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. **Circ Res**, v. 28, n. 3, p. 345–

352, 1999.

FROESE, D. E. et al. Inhibition of endothelium-dependent vascular relaxation by lysophosphatidylcholine: impact of lysophosphatidylcholine on mechanisms involving endothelium-derived nitric oxide and endothelium derived hyperpolarizing factor. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 197, n. 2, p. 1015–1023, 1999.

FU, X. et al. Nondigestible carbohydrates, butyrate, and butyrate-producing bacteria. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, p. S130–S152, 2019.

FUKUCHI, M.; GIAID, A. Endothelial expression of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 in human coronary artery disease. Specific reference to underlying lesion. **Lab Invest**, v. 79, n. 6, p. 659–670, 1999.

FULTON, D.; GRATTON, J.; SESSA, W. C. Post-Translational Control of Endothelial Nitric Oxide Synthase : Why Isn ' t Calcium / Calmodulin Enough ? v. 299, n. 3, p. 818–824, 2001.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. No TitleThe obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373–376, 1980.

GAN, Y. et al. Dual effects of histone deacetylase inhibition by trichostatin A on endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 340, n. 1, p. 29–34, 2006.

GAO, H. et al. Identification of  $\beta$ -arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF- $\kappa$ B pathways. **Molecular Cell**, v. 14, n. 3, p. 303–317, 2004.

GEBHART, V. et al. Site and mechanism of uncoupling of nitric-oxide synthase: Uncoupling by monomerization and other misconceptions. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 89, n. March, p. 14–21, 2019.

GENG, J. et al. Rosuvastatin protects against oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial cell injury of atherosclerosis in vitro. **Molecular Medicine Reports**, v. 19, n. 1, p. 432–440, 2019.

GHIADONI, L. et al. Central blood pressure, arterial stiffness, and wave reflection: New targets of treatment in essential hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 11, n. 3, p. 190–196, 2009.

GHOSH, A.; WALKER, J. M. Cardio-Oncology. **British Journal of Clinical**

**Pharmacology**, v. 78, n. 1, p. 11–13, 2017.

GIELIS, J. F. et al. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 7, p. 765–776, 2011.

GODO, S.; SHIMOKAWA, H. Endothelial Functions. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 37, n. 9, p. e108–e114, 2017.

GRAY, S. G.; EKSTRÖM, T. J. The human histone deacetylase family. **Experimental Cell Research**, v. 262, n. 2, p. 75–83, 2001.

GUILLOTEAU, P. et al. From the gut to the peripheral tissues: The multiple effects of butyrate. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, n. 2, p. 366–384, 2010.

HADI, H. .; CARR, C. S. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. **vascular health risk manag**, v. 1, n. 3, p. 183–198, 2005.

HAMER, H. M. et al. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. **Clinical Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 88–93, 2009.

HARA, T. et al. Free fatty acid receptors and their role in regulation of energy metabolism. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 164, p. 77–116, 2013.

HATANO, Y. et al. Vascular relaxing activity and stability studies of 10,10-difluoro-13,14-dehydroprostacyclin. v. 77, n. 11, p. 6846–6850, 1980.

HEINZEL, B. et al. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. **Biochemical Journal**, v. 281, n. 3, p. 627–630, 1992.

HENAGAN, T. M. et al. Sodium butyrate epigenetically modulates high-fat diet-induced skeletal muscle mitochondrial adaptation, obesity and insulin resistance through nucleosome positioning. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 11, p. 2782–2798, 2015.

HOFFMAN, J. B.; PETRIELLO, M. C.; HENNING, B. Butyrate modulates Cav-1 and its binding partner AhR, leading to differential Cyp1a1 and Cyp1b1 Gene expression in vascular endothelial cells. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 30, n. S1, p. 1175–1188, 2016.

HONG, F. FANG et al. Roles of eNOS in atherosclerosis treatment. **Inflammation Research**, v. 68, n. 6, p. 429–441, 2019.

HU, Y. et al. Lesions of Cholesterol-Fed Rabbits. p. 18–26, 2000.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 9265–9269, 1987.

IGNARRO, L. J.; GROSS, R. A. Stimulation of mammalian adenylate cyclase activity with guanosine 5'-tetrphosphate and other guanine nucleotides. **BBA - General Subjects**, v. 541, n. 2, p. 170–180, 1978.

JACOBI, S. K.; ODLE, J. Nutritional factors influencing intestinal health of the neonate. **Advances in Nutrition**, v. 3, n. 5, p. 687–696, 2012.

JIAN, H. et al. Butyrate alleviates high fat diet-induced obesity through activation of adiponectin-mediated pathway and stimulation of mitochondrial function in the skeletal muscle of mice. **Oncotarget**, v. 7, n. 35, p. 56071–56082, 2016.

KABAROWSKI, J. H. S. et al. Lysophosphatidylcholine as a Ligand for the Immunoregulatory Receptor G2A. **Science**, v. 293, n. 5530, p. 702–705, 2001.

KASUBUCHI, M. et al. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2839–2849, 2015.

KIM, M. H. et al. Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. **Gastroenterology**, v. 145, n. 2, p. 396- 406.e10, 2013.

KIMURA, I. et al. Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 19, p. 8030–8035, 2011.

KOH, A. et al. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1332–1345, 2016.

KONDO, N. et al. Thrombin induces rapid disassembly of claudin-5 from the tight junction of endothelial cells. **Experimental Cell Research**, v. 315, n. 17, p. 2879–2887, 2009.

KOUGIAS, P. et al. Lysophosphatidylcholine and secretory phospholipase A2 in vascular disease: Mediators of endothelial dysfunction and atherosclerosis. **Medical Science Monitor**, v. 12, n. 1, p. 5–16, 2006.

KOZINA, A. et al. Oleoyl-Lysophosphatidylcholine Limits Endothelial Nitric Oxide Bioavailability by Induction of Reactive Oxygen Species. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113443, 24 nov. 2014.

KUGIYAMA, K. et al. Remnant Lipoprotein Levels in Fasting Serum Predict. **Circulation**, p. 2858–2861, 2015.

KUHLENCORDT, P. J. et al. NIH Public Access. v. 26, n. 7, p. 1–14, 2013.

LAW, S. H. et al. An updated review of lysophosphatidylcholine metabolism in human diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1–24, 2019.

LEE, S. U. et al.  $\beta$ -Arrestin 2 Mediates G protein-coupled receptor 43 signals to nuclear factor- $\kappa$ B. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 11, p. 1754–1759, 2013.

LEONEL, A. J.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Butyrate: Implications for intestinal function. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 15, n. 5, p. 474–479, 2012.

LEUNG, S. W. S.; HUANG, M.; MAN, R. Y. Detrimental vascular effects of lysophosphatidylcholine is limited by other phospholipid components of low-density lipoprotein. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 250, n. 2, p. 159–166, 2003.

LI, H.; FORSTERMANN, U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. **Curr Opin Lipidol**, v. 13, n. 2, p. 161–167, 2013.

LI, M. et al. The anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on lipopolysaccharide- or tumor necrosis factor  $\alpha$ -stimulated endothelial cells via activation of GPR41/43 and inhibition of HDACs. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. MAY, p. 1–12, 2018.

LIN, M. I. et al. Phosphorylation of Threonine 497 in Endothelial Nitric-oxide Synthase Coordinates the Coupling of L-Arginine Metabolism to Efficient Nitric Oxide Production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 45, p. 44719–44726, 2003.

LIU, H. et al. Butyrate: A double-edged sword for health? **Advances in Nutrition**, v. 9, n. 1, p. 21–29, 2018.

LIU, P. et al. The mechanisms of lysophosphatidylcholine in the development of diseases. **Life Sciences**, v. 247, n. December 2019, p. 117443, 2020.

LIU, R. et al. Superoxide enhances tubuloglomerular feedback by constricting the afferent arteriole. **Kidney International**, v. 66, n. 1, p. 268–274, 2004.

LOUIS, P.; FLINT, H. J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 29–41, 2017.

LUO, S. et al. Molecular Mechanisms of Endothelial NO Synthase Uncoupling. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 22, p. 3548–3553, 2014.

MAGALHÃES, K. G. et al. Schistosomal-derived lysophosphatidylcholine are involved in eosinophil activation and recruitment through toll-like receptor-2-dependent mechanisms. **Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 9, p. 1369–1379, 2010.

MARON, B. A.; MICHEL, T. Subcellular localization of oxidants and redox modulation of endothelial nitric oxide synthase. **Circulation Journal**, v. 76, n. 11, p. 2497–2512, 2012.

MARTIN, P. M. et al. Expression and localization of GPR109A (PUMA-G/HM74A) mRNA and protein in mammalian retinal pigment epithelium. **Molecular Vision**, v. 15, n. November 2008, p. 362–372, 2009.

MARTO, C. J. et al. Measurements of elastic electron-proton scattering at large momentum transfer. v. 48, n. 1, 1993.

MATOBA, T. et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, n. 3, p. 909–913, 2002.

MATSUMOTO, T.; KOBAYASHI, T.; KAMATA, K. Role of Lysophosphatidylcholine (LPC) in Atherosclerosis. p. 3209–3220, 2007.

MEZA, C. A. et al. Endothelial dysfunction: Is there a hyperglycemia-induced imbalance of NOX and NOS? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, 2019.

MICHELL, B. J. et al. Coordinated Control of Endothelial Nitric-oxide Synthase Phosphorylation by Protein Kinase C and the cAMP-dependent Protein Kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 21, p. 17625–17628, 2001.

MIYOSHI, M.; USAMI, M.; OHATA, A. Short-chain fatty acids and trichostatin A alter tight junction permeability in human umbilical vein endothelial cells. **Nutrition**, v. 24, n. 11–12, p. 1189–1198, 2008.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Prostaglandins in the pathogenesis and prevention of vascular disease. **Blood Reviews**, v. 1, n. 2, p. 141–145, 1987.

MORDI, I. et al. Endothelial dysfunction in human essential hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 34, n. 8, p. 1464–1472, 2016.

MOUNT, P. F.; KEMP, B. E.; POWER, D. A. Regulation of endothelial and

myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 42, n. 2, p. 271–279, 2007.

MUROHARA, T. et al. LPC in oxidized LDL elicits vasocontraction and inhibits endothelium-dependent relaxation. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 267, n. 6, p. 2435–2441, 1994.

NAVIA-PELAEZ, J. M. et al. Modulation of nNOS ser852 phosphorylation and translocation by PKA/PP1 pathway in endothelial cells. **Nitric Oxide**, v. 72, p. 52–58, 2018.

NOOROMID, M. et al. Microbe-Derived Butyrate and Its Receptor, Free Fatty Acid Receptor 3, But Not Free Fatty Acid Receptor 2, Mitigate Neointimal Hyperplasia Susceptibility After Arterial Injury. **Journal of the American Heart Association**, v. 9, n. 13, p. e016235, 2020.

OEMAR, B. .; TSCHUDI, M. . Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. **Circulation**, v. 97, n. 25, p. 2494–2498, 1998.

OHARA, Y. et al. Lysophosphatidylcholine increases vascular superoxide anion production via protein kinase C activation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 14, n. 6, p. 1007–1013, 1994.

OJALA, P. J. et al. Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on human neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 6, p. 1501–1509, 2007.

OSUKA, K. et al. Activation of JAK-STAT3 signaling pathway in chronic subdural hematoma outer membranes. **Neuroscience Letters**, v. 534, n. 1, p. 166–170, 2013.

PENG, Z. Y. et al. Protective effect of neferine on endothelial cell nitric oxide production induced by lysophosphatidylcholine: the role of the DDAH–ADMA pathway. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 89, n. 4, 2011.

PIAZZA, M. et al. Structure and dynamics of calmodulin (CaM) bound to nitric oxide synthase peptides: Effects of a phosphomimetic CaM mutation. **Biochemistry**, v. 51, n. 17, p. 3651–3661, 2012.

PIZZONERO, M. et al. Discovery and optimization of an azetidine chemical series as a free fatty acid receptor 2 (FFA2) antagonist: From hit to clinic. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 23, p. 10044–10057, 2014.

POHL, U.; DE WIT, C.; GLOE, T. Large arterioles in the control of blood flow:

Role of endothelium-dependent dilation. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 168, n. 4, p. 505–510, 2000.

RABELINK, T. J.; WIJEWICKRAMA, D. C.; DE KONING, E. J. Peritubular endothelium: The Achilles heel of the kidney? **Kidney International**, v. 72, n. 8, p. 926–930, out. 2007.

RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 23, p. 5839–5848, 2018.

RADU, C. G. et al. T cell chemotaxis to lysophosphatidylcholine through the G2A receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 1, p. 245–250, 2004.

RAJENDRAN, P.; RENGARAJAN, T. The vascular endothelium and human disease. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 10, p. 1057–1069, 2013.

RAMEAU, G. A. et al. Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 13, p. 3445–3455, 2007.

RAMOS, M. G. et al. Butyrate induces apoptosis in murine macrophages via caspase-3, but independent of autocrine synthesis of tumor necrosis factor and nitric oxide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 2, p. 161–173, 2002.

RHEE, S. G. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. **Science**, v. 312, n. 5782, p. 1882–1883, 2006.

RIEDERER, M. et al. impact of endothelial lipase on cellular lipid composition. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1821, n. 7, p. 1003–1011, 2012.

RITZHAUPT, A. et al. The characterization of butyrate transport across pig and human colonic luminal membrane. **Journal of Physiology**, v. 507, n. 3, p. 819–830, 1998.

ROPERO, S.; ESTELLER, M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. **Molecular Oncology**, v. 1, n. 1, p. 19–25, 2007.

ROSEN, G. M.; TSAI, P.; POU, S. Mechanism of free-radical generation by nitric oxide synthase. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 4, p. 1191–1199, 2002.

ROSKOSKI, R. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation.

**Pharmacological Research**, v. 66, n. 2, p. 105–143, 2012.

ROTH, R. J. et al. MAPK phosphatase-1 facilitates the loss of oxidative myofibers associated with obesity in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 12, p. 3817–3829, 2009.

SAKAUE, H. et al. Role of MAPK phosphatase-1 (MKP-1) in adipocyte differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 38, p. 39951–39957, 2004.

SANTOLINI, J. What does “NO-Synthase” stand for? **Frontiers in Bioscience - Landmark**, v. 24, n. 1, p. 133–171, 2019.

SCALIA, R.; STALKER, T. J. Microcirculation as a target for the anti-inflammatory properties of statins. **Microcirculation**, v. 9, n. 6, p. 431–442, 2002.

SHI, H. et al. MAP kinase phosphatase-1 deficiency impairs skeletal muscle regeneration and exacerbates muscular dystrophy. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, n. 8, p. 2985–2997, 2010.

STÜBINGER, G. et al. Targeted profiling of atherogenic phospholipids in human plasma and lipoproteins of hyperlipidemic patients using MALDI-QIT-TOF-MS/MS. **Atherosclerosis**, v. 224, n. 1, p. 177–186, 2012.

STUEHR, D.; POU, S.; ROSEN, G. M. Oxygen Reduction by Nitric-oxide Synthases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 18, p. 14533–14536, 2001.

SUENAGA, H.; KAMATA, K. Lysophosphatidylcholine potentiates vascular contractile responses by enhancing vasoconstrictor-induced increase in cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 361, n. 2–3, p. 217–226, 1998.

SUENAGA, H.; KAMATA, K. Lysophosphatidylcholine potentiates vascular contractile responses in rat aorta via activation of tyrosine kinase. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 3, p. 789–799, 2002.

TAKESHITA, S. et al. Shear stress enhances glutathione peroxidase expression in endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 273, n. 1, p. 66–71, 2000.

TANAKA, S. et al. Relationship of enhanced butyrate production by colonic butyrate-producing bacteria to immunomodulatory effects in normal mice fed an insoluble fraction of *Brassica rapa* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v.

82, n. 9, p. 2693–2699, 2016.

TARDIVEL, S. et al. Protective effects of EPA and deleterious effects of DHA on eNOS activity in Ea hy 926 cultured with lysophosphatidylcholine. **Lipids**, v. 44, n. 3, p. 225–235, 2009.

TRAN, Q. K.; OHASHI, K.; WATANABE, H. Calcium signalling in endothelial cells. **Cardiovascular Research**, v. 48, n. 1, p. 13–22, 2000.

TSAI, T. T.; NIENABER, C. A.; EAGLE, K. A. Acute aortic syndromes. **Circulation**, v. 112, n. 24, p. 3802–3813, 2005.

ULVEN, T. Short-chain free fatty acid receptors FFA2/GPR43 and FFA3/GPR41 as new potential therapeutic targets. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, n. October, p. 1–9, 2012.

VANHOUTTE, P. M. No Title Endothelial dysfunction in hypertension. **Hypertension**, v. 5, p. 83–93, 1996.

VIJAY, N.; MORRIS, M. Role of Monocarboxylate Transporters in Drug Delivery to the Brain. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 10, p. 1487–1498, 2014.

WINK, D. A. et al. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 6, p. 873–891, 2011.

WINTERBOURN, C. Current methods to study reactive oxygen species - Pros and cons. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 2, p. 707, 2014.

XIA, Z. et al. Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 17, p. 5425–5436, 1996.

XU, J.; LU, X.; SHI, G. P. Vasa vasorum in atherosclerosis and clinical significance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 5, p. 11574–11608, 2015.

YANAGISAWA, M. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v. 332, p. 411–415, 1988.

YIN, J. C. et al. Cellular interplay via cytokine hierarchy causes pathological cardiac hypertrophy in RAF1-mutant Noonan syndrome. **Nature Communications**, v. 8, n. May, p. 1–11, 2017.

YUYUN, M. F.; NG, L. L.; NG, G. A. Endothelial dysfunction, endothelial nitric

oxide bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5-methyltetrahydrofolate in cardiovascular disease. Where are we with therapy? **Microvascular Research**, v. 119, n. September 2017, p. 7–12, 2018.

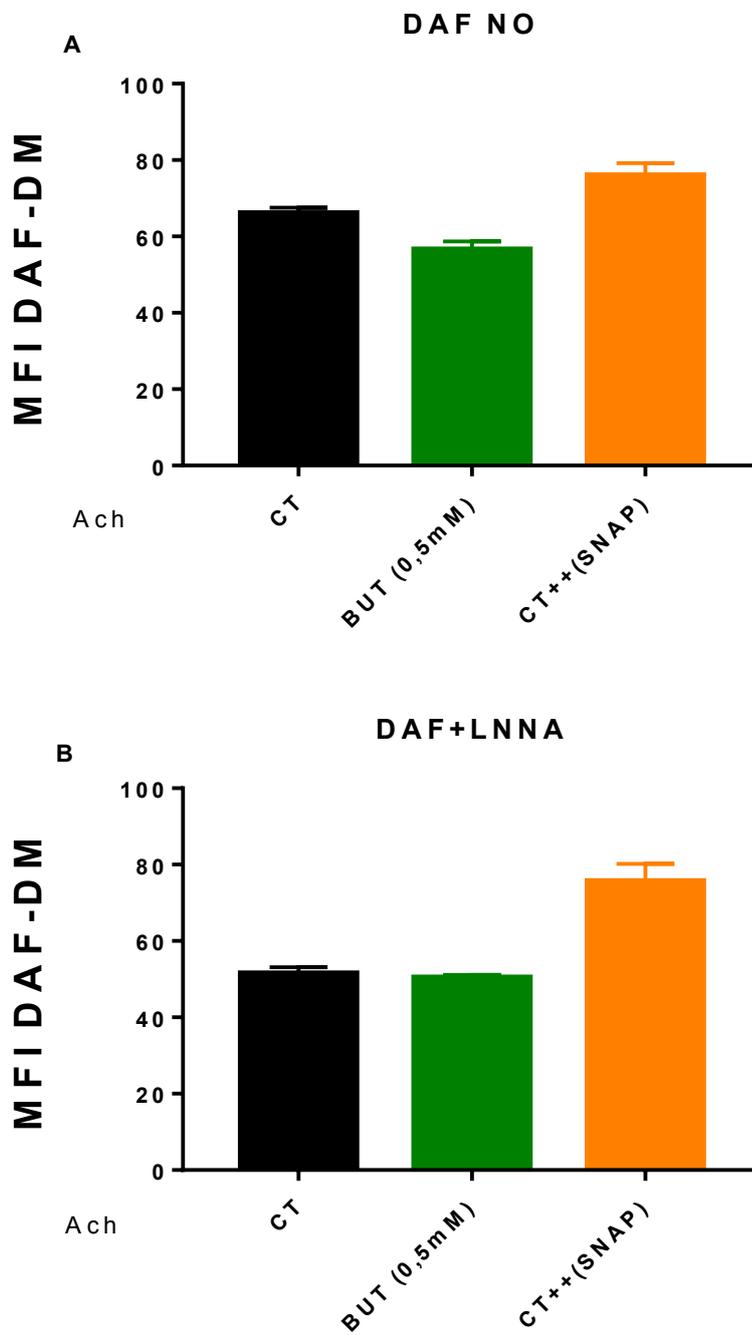
ZHANG, X. et al. Mechanism of the protective effect of yulangsan flavonoid on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 4, p. 1050–1062, 2014.

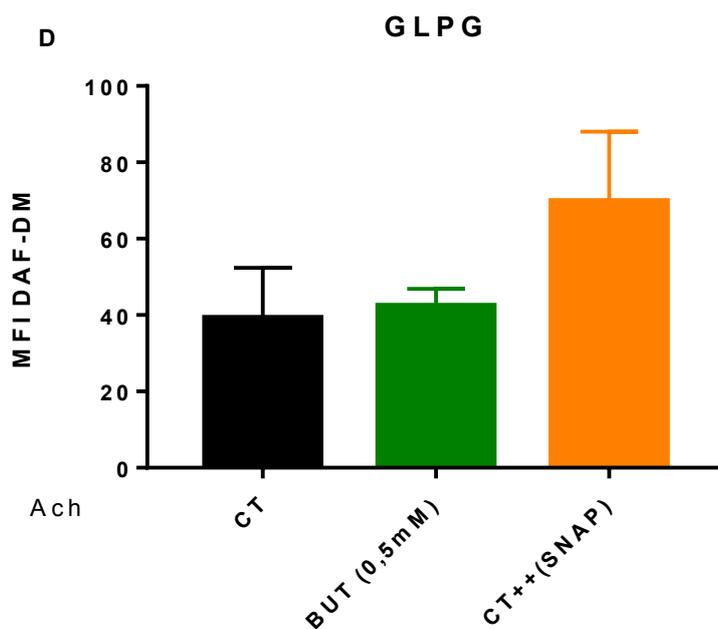
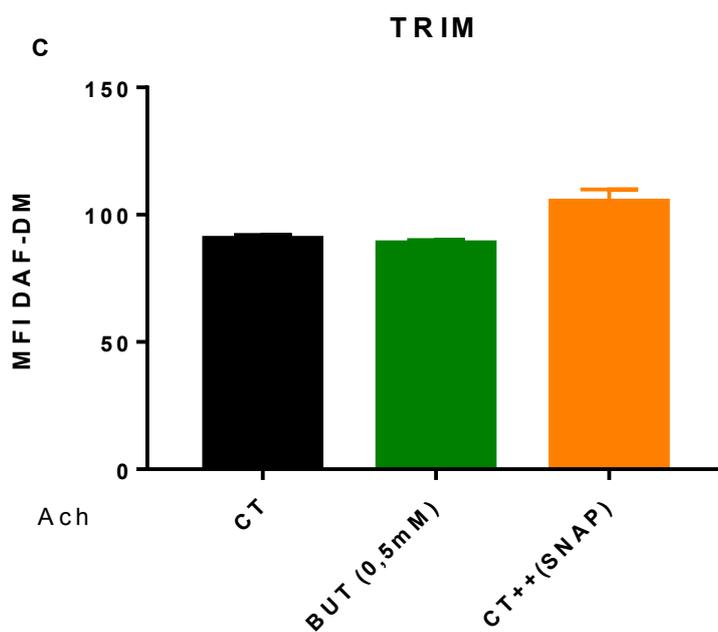
ZHANG, Y. H. Nitric oxide signalling and neuronal nitric oxide synthase in the heart under stress. **F1000Research**, v. 6, n. May, 2017.

ZHOU, Q. G. et al. Neuronal nitric oxide synthase and affective disorders. **IBRO Reports**, v. 5, n. December 2017, p. 116–132, 2018.

## 10. ANEXOS

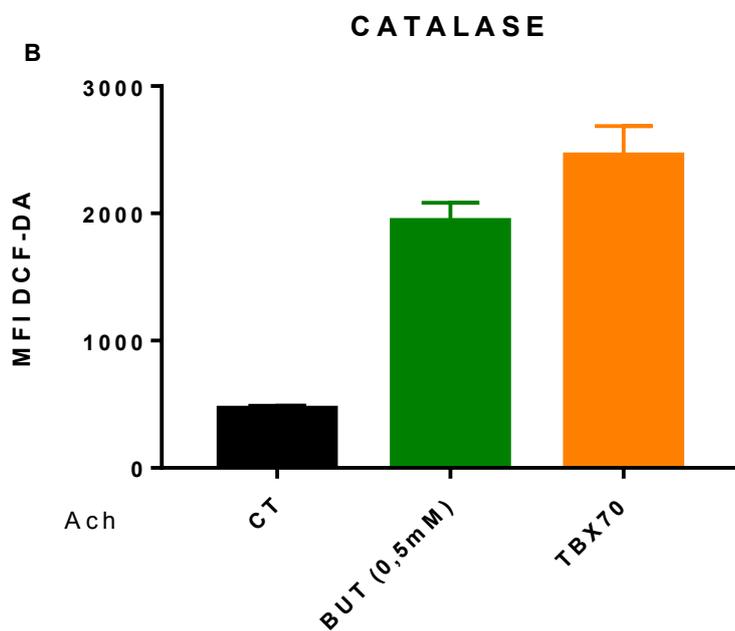
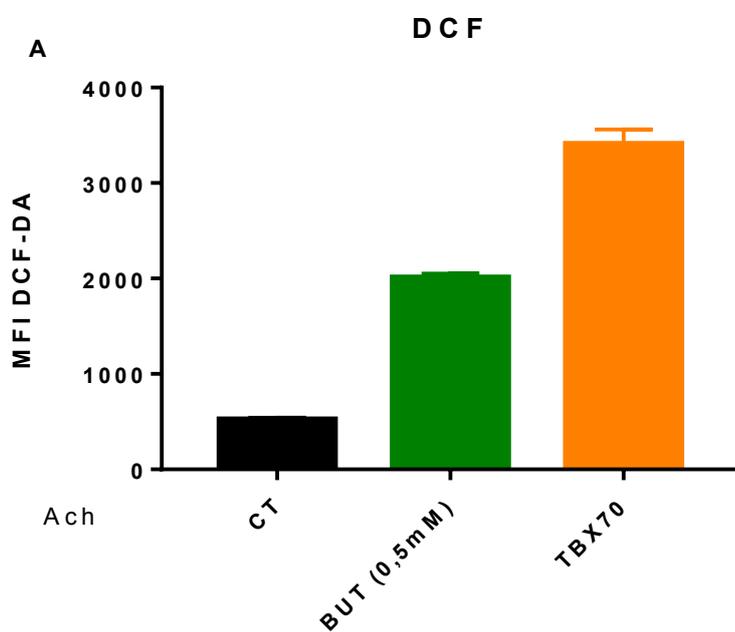
### 10.1. Anexo 1

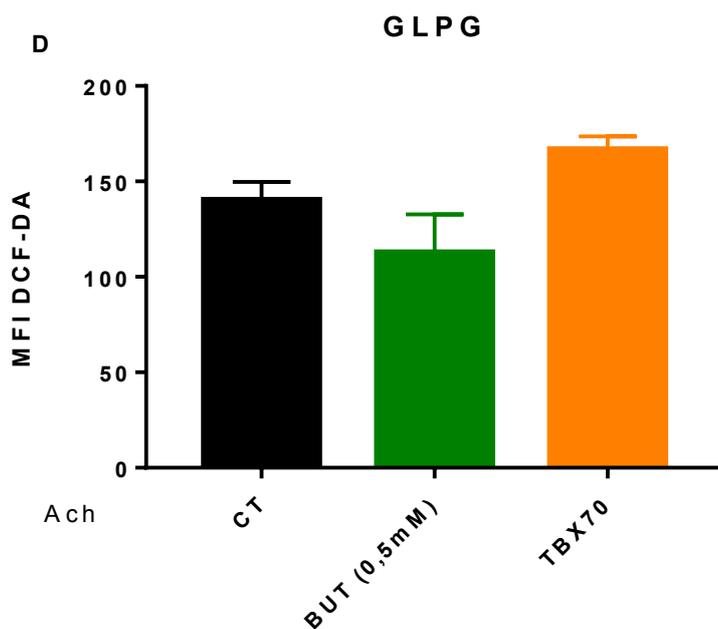
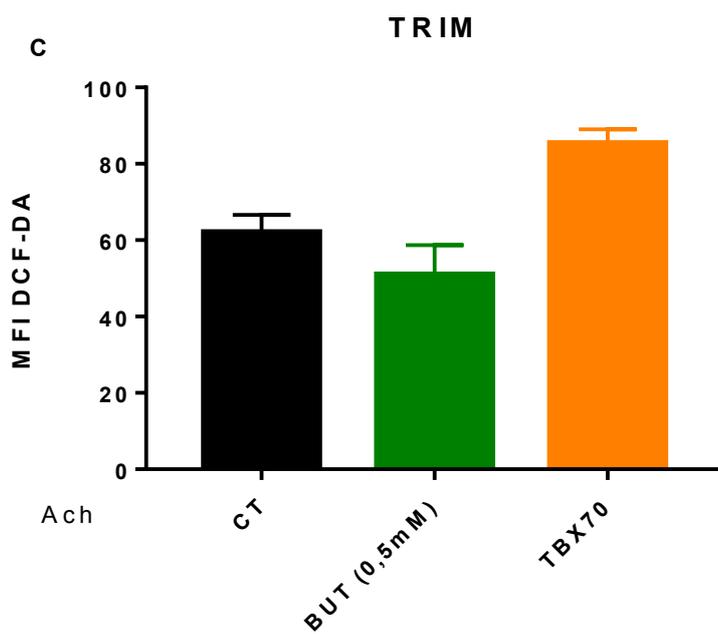




Controles internos para a produção de NO por células endoteliais EA.Hy926 tratadas com butirato e controle positivo SNAP, estimuladas com ACh. Na ausência (A) ou presença dos inibidores (B) L-NNA, (C) TRIM e (D) GLPG0974. Os resultados foram expressos como média±EPM.

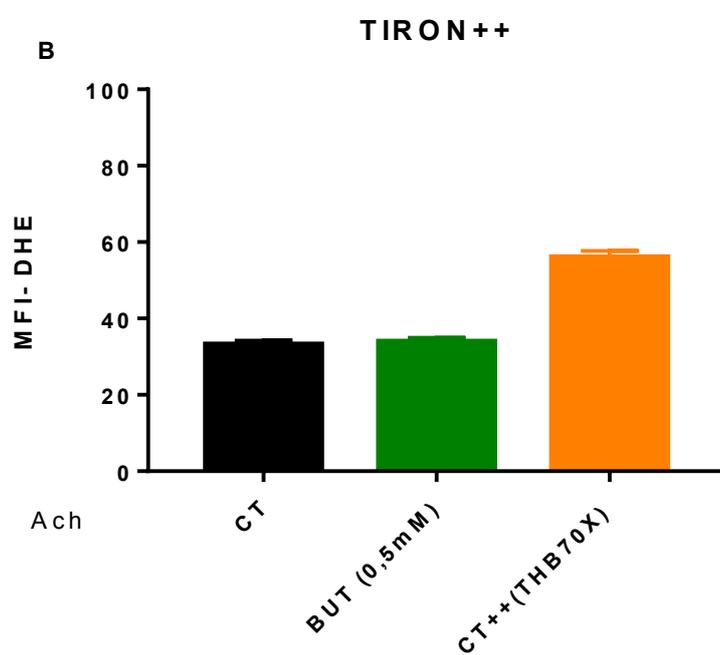
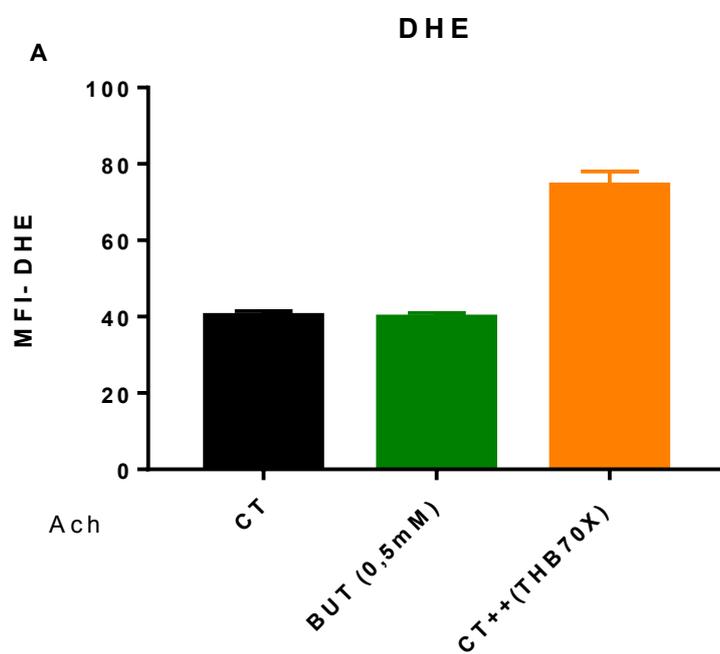
## 10.2. Anexo 2

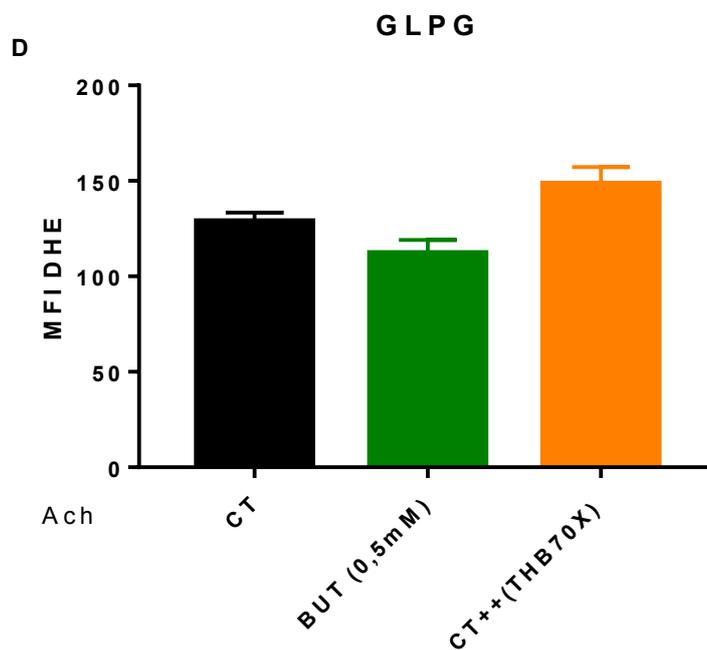
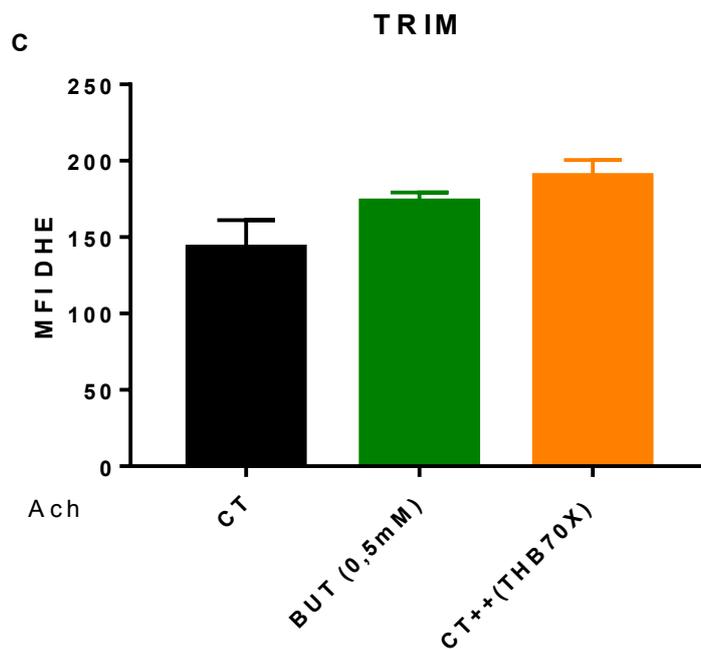




Controles internos para a produção de ROS por células endoteliais EA.Hy926 tratadas com butirato e controle positivo TBX70, estimuladas com ACh. Na ausência (A), presença do *scavenger* (B) Catalase ou dos inibidores (C) TRIM e (D) GLPG0974. Os resultados foram expressos como média±EPM.

### 10.3. Anexo 3





Controles internos para a produção de ROS por células endoteliais EA.Hy926 tratadas com butirato e controle positivo THB70X, estimuladas com ACh. Na ausência (A), presença do *scavenger* (B) Tiron++ ou dos inibidores (C) TRIM e (D) GLPG0974. Os resultados foram expressos como média±EPM.

