

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

Anízia Karoline de Oliveira

**OTENAPROXESUL PREVINE O REMODELAMENTO VASCULAR INDUZIDO
POR ESTENOSE DA ARTÉRIA CARÓTIDA DE CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte
2021

Anízia Karoline de Oliveira

**OTENAPROXESUL PREVINE O REMODELAMENTO VASCULAR INDUZIDO
POR ESTENOSE DA ARTÉRIA CARÓTIDA DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof^o Dr. Stéfany Bruno de Assis Cau (Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG).

Co-orientador: Prof^o Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini (Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG).

Belo Horizonte
2021

043 Oliveira, Anízia Karoline de.
Otenaproxesul previne o remodelamento vascular induzido por estenose da artéria carótida de camundongos [manuscrito] / Anízia Karoline de Oliveira. - 2021.

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

Orientador: Profº Dr. Stéfany Bruno de Assis Cau. Co-orientador: Profº Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini.

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

1. Anti-Inflamatórios não Esteroides. 2. Ciclo-Oxigenase 1. 3. Sulfeto de Hidrogênio. 4. Remodelação Vascular. 5. Reestenose Coronária. 6. Naproxeno. I. Cau, Stéfany Bruno de Assis. II. Capettini, Luciano dos Santos Aggum. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 615

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis - CRB 6 - 2680



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO N° 540 DE ANÍZIA KAROLINE DE OLIVEIRA

"Otenaproxesul Previne o Remodelamento Vascular
Induzido por Estenose da Artéria Carótida de Camundongos"

ANÍZIA KAROLINE DE OLIVEIRA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **14 de maio de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Daniella Bonaventura, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia, FMRP/Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais - Coorientador

Prof. Dr. Stêfany Bruno de Assis Cau, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais - Orientador

Belo Horizonte, 14 de maio de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Bonaventura, Professora do Magistério Superior**, em 17/05/2021, às 17:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Luciano dos Santos Aggum Capettini, Professor do Magistério Superior**, em 17/05/2021, às 17:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Stefany Bruno de Assis Cau, Professor do Magistério Superior**, em 18/05/2021, às 12:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia, Usuário Externo**, em 14/06/2021, às 09:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Agradecimentos

Ao Prof^o Dr. Stêfany Cau, pela excelente orientação, pelas valiosas sugestões e estímulos dados.

Ao LAFACI, por todo aprendizado, pela convivência e amizade, das quais jamais esquecerei.

Ao Prof^o Dr. Luciano Capettini e ao LBV por toda a contribuição que possibilitou a realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a. Lucíola Barcelos e ao LAnCet pelas colaborações.

Ao LFV, pelas contribuições e pela amizade que tornaram a jornada mais leve.

Aos demais laboratórios do PPG Fis-Far, que de alguma forma ou de outra, contribuíram para realização deste trabalho.

Aos professores do PPG Fis-Far, por todos os ensinamentos dados nas disciplinas e por todos os esforços em prol da pesquisa e do crescimento acadêmico da instituição.

Às agências de fomento FAPEMIG, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro.

À UFMG, pelo apoio sempre concedido.

Aos meus irmãos, por todo o amor e companheirismo.

Aos meus pais, que me trouxeram ao mundo e sempre me apoiaram.

Acima de tudo, a Deus, sem a sua presença esta pesquisa seria inviável, pois é Dele proveniente todo o conhecimento.

Resumo

A hiperplasia neointimal é um evento crítico envolvido na fisiopatologia das doenças oclusivas arteriais, como a reestenose após a angioplastia com balão. Acredita-se que o aumento das ciclo-oxigenases (COXs) e a redução do sulfeto de hidrogênio (H₂S), um gasotransmissor endógeno, desempenham papéis importantes na remodelação vascular após lesão vascular. Assim, alguns anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), bem como doadores inorgânicos de H₂S, se mostraram efetivos para prevenir a reestenose. A hipótese do trabalho é que o Otenaproxesul, que é uma molécula híbrida do AINE Naproxeno acoplado a um grupamento doador de H₂S, previne a hiperplasia neointimal em camundongos submetidos à oclusão da artéria carótida. O objetivo foi investigar o efeito do Otenaproxesul versus seu protótipo, Naproxeno, no remodelamento arterial induzido por estenose carotídea. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), sob protocolo 13/2019. Camundongos machos C57BL/6 (10 semanas) foram submetidos à oclusão total da artéria carótida comum esquerda para promover a cessação do fluxo sanguíneo local. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (N= 5-7): sham (falso operado), estenose, estenose + Naproxeno (10 mg/kg) e estenose + Otenaproxesul (16 mg/kg). Para os tratamentos, as drogas foram administradas localmente por sua inclusão em um hidrogel de polímero (Pluronic®). Após 21 dias, foi realizada aferição da pressão arterial sistólica (PAS) e análise da perfusão sanguínea por laser doppler de ponto único nas artérias carótidas. Posteriormente, os animais foram submetidos à eutanásia, os tecidos foram coletados e processados para análise morfométrica em lâminas coradas com hematoxilina-eosina, imunomarcagem para COX-1, COX-2 e MMP-2, determinação por sondas fluorescentes dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), óxido nítrico (NO) e atividade gelatinolítica (zimografia *in situ*). Não houve alteração da PAS entre os grupos. O grupo estenose apresentou uma redução da perfusão local comparado ao grupo sham, e apenas o tratamento com Otenaproxesul foi capaz de reestabelecer essa perfusão. O espessamento neointimal e o estreitamento luminal induzidos pela estenose da artéria carótida foram reduzidos parcialmente pelo Naproxeno e abolidos pelo Otenaproxesul. A estenose foi acompanhada do aumento das COX-1 e -2. O Naproxeno e o Otenaproxesul reduziram os níveis de COX-1, entretanto, apenas Otenaproxesul preveniu o aumento de COX-2. A estenose da artéria carótida induziu o aumento na geração de EROs e a redução nos níveis de NO. Ambos os tratamentos causaram efeitos antioxidantes. Contudo, apenas o Otenaproxesul restaurou os níveis de NO. A expressão e a atividade de MMP-2 foram aumentadas pela oclusão da artéria carótida e reduzidas apenas pelo Otenaproxesul. Em conclusão, a oclusão da artéria carótida induziu a formação da camada neointima, processo que envolveu a regulação positiva das COXs. O tratamento com o Otenaproxesul foi superior ao Naproxeno sobre a melhora de parâmetros morfométricos e de perfusão, bem como sobre a regulação dos níveis de mediadores de hiperplasia intimal. Estes dados sugerem que o H₂S e a inibição

de COX têm efeitos sinérgicos sobre a melhora do remodelamento vascular e que Otenaproxesul é uma alternativa para prevenção de reestenose.

Palavras-chave: Anti-inflamatório não esteroide; ciclo-oxigenase; hiperplasia neointimal; remodelamento arterial; Otenaproxesul; sulfeto de hidrogênio.

Abstract

Neointimal hyperplasia is a critical event involved in the pathophysiology of arterial occlusive diseases, such as restenosis after balloon angioplasty. Increased cyclooxygenases (COXs) expression and reduced level of hydrogen sulfide (H₂S), an endogenous gasotransmitter, play a role in vascular remodeling after vascular injury. Therefore, some non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), as well as inorganic H₂S donors have been shown promising effects in preventing restenosis. We hypothesized that Otenaproxesul, which is a hybrid molecule of Naproxen coupled to an H₂S-realising group, prevents vascular injury in mice submitted to occlusion of the carotid artery. The aim was to investigate the effect of Otenaproxesul versus its prototype drug, Naproxen, on arterial remodeling induced by carotid stenosis. All the procedures were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA/UFMG), under protocol number 13/2019. Male C57BL/6 mice (10 weeks) were submitted to total occlusion of the left common carotid artery to promote the cessation of local blood flow. The animals were divided into four experimental groups (N= 5-7): sham (false operated), stenosis, stenosis + Naproxen (10 mg/kg) and stenosis + Otenaproxesul (16 mg/kg). For local drug delivery in the external carotid artery, drug-loaded hydrogel formulations were made using a commercial polymer hydrogel (Pluronic®). After 21 days, non-invasive systolic blood pressure (SBP) was measured, and blood perfusion in the carotid arteries was analyzed by single-point laser doppler. Thereafter, the animals were euthanized, the tissues were collected and processed for morphometric analysis on sectioned arteries stained with hematoxylin-eosin; immunostaining for COX-1, COX-2, and MMP-2; determination of reactive species of oxygen (ROS), nitric oxide (NO) levels, and gelatinolytic activity (*in situ* zymography) by fluorescent probes. There was no change in SBP between groups. Carotid artery ligation resulted in a reduction of doppler flow compared to the sham group, which was fully restored by Otenaproxesul. Neointimal thickening and luminal narrowing induced by carotid artery stenosis were partially reduced by Naproxen and abolished by Otenaproxesul. Stenosis was accompanied by stronger immunostaining for both COX-1 and -2. Naproxen and Otenaproxesul reduced COX-1 levels, whereas only Otenaproxesul reversed the increase in COX-2 fluorescence staining. Stenotic arteries presented increased ROS generation and reduced NO levels. Both drugs exhibited antioxidant effect. Importantly, only Otenaproxesul restored NO levels. The expression and activity of MMP-2 were increased by occlusion of the carotid artery, which was reduced only by Otenaproxesul. In conclusion, neointima formation is correlated to the positive regulation of COX enzymes. Otenaproxesul was superior to Naproxen in improving the morphometric and perfusion parameters, as well as in regulating the levels of mediators of intimal hyperplasia of injured arteries. These data suggest that H₂S and COX inhibition have synergistic effects on the amelioration of vascular remodeling and that Otenaproxesul is a therapeutic alternative for preventing restenosis.

Keywords: Non-steroidal anti-inflammatory; cyclooxygenase; neointimal hyperplasia; arterial remodeling; Otenaproxesul; hydrogen sulfide.

Lista de figuras

Figura 1: Arquitetura da parede arterial e seus componentes da matriz extracelular (MEC)	18
Figura 2: Componentes fisiopatológicos que levam ao remodelamento arterial na hiperplasia neointimal	19
Figura 3: A estrutura das gelatinases	21
Figura 4: Metaloproteinases de matriz (MMPs) na patogênese da hiperplasia neointimal	22
Figura 5: Síntese enzimática endógena de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S)	29
Figura 6: Mecanismo proposto de liberação de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S) e Naproxeno do Otenaproxesul após administração oral	32
Figura 7: Representação esquemática da cirurgia de oclusão da artéria carótida e do delineamento experimental	37
Figura 8: Representação esquemática do corte transversal da artéria carótida e fórmulas dos parâmetros morfométricos)	40
Figura 9: Ensaio da seletividade da atividade de MMPs	43
Figura 10: Efeito da estenose e dos tratamentos sobre a pressão arterial sistólica (PAS)	44
Figura 11: Efeito do tratamento local com Naproxeno e Otenaproxesul sobre a estenose	45
Figura 12: Efeito do tratamento com Naproxeno e Otenaproxesul sobre as alterações morfométricas das artérias carótidas	47
Figura 13: Efeito do tratamento local com Naproxeno e Otenaproxesul sobre a perfusão sanguínea local das artérias carótidas ocluídas e não ocluídas	49
Figura 14: Efeito dos tratamentos locais com Naproxeno e Otenaproxesul sobre a marcação para COX-1 vascular	50
Figura 15: Efeito dos tratamentos locais com Naproxeno e Otenaproxesul sobre a marcação para COX-2 vascular	52
Figura 16: Efeito do tratamento local com Naproxeno ou Otenaproxesul sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) vasculares	54
Figura 17: Efeito do tratamento local com Naproxeno ou Otenaproxesul sobre os níveis vasculares de Óxido Nítrico (NO)	56
Figura 18: Efeito do tratamento local com Naproxeno ou Otenaproxesul sobre a atividade gelatinolítica <i>in situ</i> e marcação para MMP-2 por imunofluorescência nas artérias carótidas	58

Figura 19: Efeitos do Naproxeno e Otenaproxesul sobre a proliferação de CMLVs na hiperplasia neointimal 67

Lista de abreviaturas

A- Área
AA- Ácido araquidônico
AINE- Anti-inflamatório não esteroideal
Akt- Proteína quinase B
AL- Área do lúmen
ALEE- Área da lâmina elástica externa
ALEI- Área da lâmina elástica interna
ApoE- Apolipoproteína E
AT- Área de secção transversal total
AVE- Acidente vascular encefálico
bFGF: Fator básico de crescimento de fibroblastos
BM- Membrana basal
CBS- Cistationina β -sintase
Cdk- Quinase dependente de ciclina
CE- Células endoteliais
CEUH- Células endoteliais umbilicais humanas
CMLVs- Células musculares lisas vasculares
COX- Ciclo-oxigenase
COX-1- Ciclo-oxigenase do tipo 1
COX-2- Ciclo-oxigenase do tipo 2
CPEs- Células progenitoras endoteliais
CSE- Cistationina γ -liase
DAF-FM- Diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína
DAPI- 4,6 diamidino-2-phenylindole
DHE- Dihidroetidina
DMSO- Dimetilsulfóxido
ECM- Espessura da camada média
ECN- Espessura da camada neointima

EGFR- receptor de EGF Fator de crescimento epidérmico
eNOS ou NOS3- Óxido nítrico sintase endotelial
EP3- Receptor para prostaglandina E₂
EROs- Espécies reativas de oxigênio
ET- Espessura total
FAs- Fibroblastos adventícios
FB- Fibroblastos
FKBP12- Proteína de ligação ao FK506
GSK- Glicogênio sintase quinase
GSK3β- Glicogênio sintase quinase 3 beta
H₂S- Sulfeto de Hidrogênio
HB-EGF- Fator de crescimento epidérmico de ligação à pró-heparina
HSPG-2- Proteoglicano 2 de sulfato de heparano
IAM- Infarto agudo do miocárdio
IL-1- Interleucina 1
IL-2- Interleucina 2
IL-8- Interleucina 8
iNOS ou NOS-2- Óxido nítrico sintase induzível
IP- Receptor para prostaciclina
LEE- Lâmina elástica externa
LEI- Lâmina elástica interna
MEC- Matriz extracelular
MMP-2- Metaloproteinase de matriz do tipo 2
MMP-9- Metaloproteinase de matriz do tipo 9
MMPs- Metaloproteinases de matriz
mRNA- Ácido ribonucléico mensageiro
mTOR- “Mammalian target of rapamycin”, Alvo da Rapamicina em Mamíferos
NaHS- Hidrossulfeto de sódio
NF-κB- Fator nuclear kappa B
nNOS ou NOS-1- Óxido nítrico sintase neuronal

NO- Óxido nítrico

NOS- Óxido nítrico sintase

ns-AINES- Anti-inflamatórios não esteroidais não seletivos

P- Perímetro

p21- Inibidor da quinase dependente de ciclina p21

p27- Inibidor da quinase dependente de ciclina p27

PAS- Pressão arterial sistólica

PDGF- Fator de crescimento derivado de plaquetas

PEO- Óxido de etileno

PFA- Paraformaldeído

PGD₂- Prostaglandina D₂

PGE₂- Prostaglandina E₂

PGF_{2α}- Prostaglandina F_{2α}

PGG₂- Prostaglandina G₂

PGH₂- Prostaglandina H₂

PGI₂- Prostaciclina

PGs- Prostaglandinas

PI3K- Fosfatidilinositol 3-quinase

PLP- Piridoxal-5'-fosfato

PPO- Óxido de polipropileno

R- Raio

RL- Raio do lúmen

RT-PCR- Reação da Transcriptase Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase

S-AINE- Anti-inflamatório não esteroidal liberador de sulfeto de hidrogênio

s-AINE- Anti-inflamatório não esteroidal seletivo

SF- Stents farmacológicos

TA- Túnica adventícia

TGF-β- Fator de crescimento transformante beta

TGI- Trato gastrointestinal

TI- Túnica íntima

TIMP- Inibidor tecidual de metaloproteinase

TM- Túnica média

TNF- α - Fator de necrose tumoral

TP- Receptor para tromboxano

TxA₂- Tromboxano A₂

VEGF- Fator de crescimento endotelial vascular

vWF- Fator de von Willebrand

Sumário

1. Introdução	16
1.1. Fisiopatologia da hiperplasia neointimal	19
1.2. Papel das ciclo-oxigenases (COXs) na fisiopatologia da reestenose ...	26
1.3. Otenaproxesul, um AINE doador de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S) com efeitos antiproliferativos	30
2. Hipótese	36
3. Objetivos	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4. Material e métodos	38
4.1 Animais	38
4.2 Procedimentos cirúrgicos e delineamento experimental	38
4.2.1 Tratamentos	39
4.3 Medidas do peso corporal e pressão arterial sistólica (PAS)	40
4.4 Procedimentos para análises	40
4.4.1 Coleta de tecidos	40
4.5 Análises morfológicas das artérias carótidas	41
4.6 Análise funcional do segmento estenótico por laser doppler “ <i>single point</i> ”	42
4.7 Imunomarcção de COX-1 e COX-2 nas camadas arteriais	43
4.8 Avaliação do estresse oxidativo	43
4.9 Análise dos níveis de Óxido Nítrico (NO)	44
4.10 Expressão de MMP-2 e atividade gelatinolítica por zimografia “ <i>in situ</i> ”.	44
4.11 Análise estatística	45
5. Resultados	46
6. Discussão	62
7. Conclusão	71
8. Referências	72

1. Introdução

As doenças vasculares estão relacionadas a elevados índices de mortalidade no mundo, como o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) e Acidente Vascular Cerebral (AVE). Biologicamente, as doenças vasculares são complexas e mais estudos são necessários para uma melhor compreensão sobre suas causas e consequências. A função vascular é definida por características estruturais e funcionais da parede vascular, que podem ser modificadas em resposta a estímulos hemodinâmicos, doenças ou envelhecimento, resultando no remodelamento arterial (Van Varik *et al.*, 2012).

O remodelamento arterial também pode ocorrer como resultado de lesões mecânicas decorrentes de procedimentos cirúrgicos vasculares como angioplastia com balão com ou sem implante de *stent*, endarterectomia ou enxerto de *bypass* cirúrgico (Libby *et al.*, 2019). Como resultado disso, ao longo do tempo ocorre o espessamento da parede vascular e desenvolvimento da hiperplasia neointimal, também conhecida por reestenose, o que limita o sucesso das intervenções vasculares (Nakazaki *et al.*, 2019; Zain *et al.*, 2020).

A hiperplasia neointimal é uma resposta fisiológica de cicatrização que ocorre devido à lesão da camada endotelial das artérias com consequente proliferação e migração de células musculares lisas vasculares (CMLVs) da camada média para a camada íntima. É um quadro extremamente complexo que engloba diversas linhagens celulares e múltiplas vias de sinalização molecular. Sendo assim, existem vários alvos possíveis para a inibição desse processo (Herring *et al.*, 2014; Herring *et al.*, 2017; Nakazaki *et al.*, 2019).

Com a descoberta do processo de reestenose após implante de *stents*, vários estudos foram realizados com intuito de reduzir as taxas de hiperplasia neointimal. Dessa forma, surgiram os *stents* farmacológicos (SF), que liberam drogas antiproliferativas que reduzem a proliferação de CMLVs (Moses *et al.*, 2003). Essa descoberta levou ao aumento da expectativa no meio clínico quanto à prevenção da reestenose. Entretanto, foi demonstrado que o seu uso leva à uma redução considerável, mas não abole completamente a hiperplasia neointimal (Moses *et al.*, 2003; Stone *et al.*, 2004).

Inicialmente, pensava-se que a proliferação de CMLVs ocorria principalmente pela liberação do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Em consequência disso, diversos fármacos antitrombóticos e antiplaquetários foram testados em modelos animais. Contudo, não apresentaram resultados promissores em humanos. Dessa forma, drogas que atuavam na inibição da mitose celular foram produzidos para serem incorporados aos SF e promoverem localmente seus efeitos antiproliferativos (Huang e Houghton, 2001; Richardson e Kaye, 2005).

Ensaio experimentais e clínicos avaliaram diversos fármacos, em especial o Sirolimus e o Paclitaxel, que exibiram uma acentuada diminuição da reestenose após implante de *stent*. O Sirolimus, também conhecido por Rapamicina, é uma lactona macrocíclica natural produzida pelo *Streptomyces hygroscopicus*, e possui propriedades imunossupressoras e antiproliferativas em células de mamíferos. Sua ação se dá pela inibição alostérica da proteína “*Mammalian target of rapamycin*” (mTOR) ao formar um complexo com a proteína imunofilina ou FKBP12, e impede a continuidade do ciclo celular, parando na fase G1 para a fase S (Chung *et al.*, 1992; Kuo *et al.*, 1992; Price *et al.*, 1992). O Paclitaxel é um agente citotóxico contra diversos tumores, que atua no bloqueio da progressão do ciclo celular. Seu efeito é conhecido por promover a estabilização de microtúbulos formados, impedindo sua despolimerização que é necessária à replicação celular e, dessa forma, bloqueia o processo de divisão celular (Li *et al.*, 2014). Ambos os compostos atuam na inibição da progressão do ciclo celular impedindo a proliferação de CMLVs.

A taxa de reestenose angiográfica foi significativamente reduzida em cerca de 70-80% com os SF, entretanto, a hiperplasia neointimal permanece como um assunto importante de estudos em andamento (Moses *et al.*, 2003). Para uma prevenção efetiva da hiperplasia neointimal, além dos efeitos antiproliferativos e antimigratórios de CMLVs, as drogas liberadas dos *stents* devem facilitar o processo de reendotelização, a fim de se evitar a trombose tardia, além de atuar na inibição da resposta inflamatória após lesão vascular induzida pelo procedimento endovascular e na modulação de mediadores locais envolvidos na hiperplasia neointimal. Como os SF são amplamente utilizados na

prevenção da reestenose, são necessárias drogas mais eficazes e que melhorem os desfechos clínicos (García-García *et al.*, 2006).

Atualmente, o Sirolimus e Paclitaxel dominam a prática clínica, à medida que alternativas terapêuticas vão surgindo. Diversas drogas estão sob investigação na busca por mecanismos relacionados ao desenvolvimento da hiperplasia neointimal, sejam como compostos únicos ou combinados com agentes antiproliferativos. Dentre essas drogas, alguns estudos investigaram o efeito de anti-inflamatórios não esteroidais, os AINEs, que são drogas que inibem a atividade das enzimas ciclo-oxigenases (COXs), como potenciais agentes terapêuticos para o tratamento da reestenose (Raines e Ferri, 2005).

AINES, como o sulindaco, diclofenaco, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico e indometacina, mostraram uma inibição dose-dependente e não citotóxica do crescimento de CMLVs através de mecanismos de bloqueio do ciclo celular (Brooks *et al.*, 2003; Raines e Ferri, 2005).

Paralelamente, muitos estudos têm discutido sobre o envolvimento do sulfeto de hidrogênio (H₂S) nesse processo, mostrando que ele limita a inflamação, inibe a proliferação de CMLVs e protege os vasos sanguíneos (Lu *et al.*, 2014; Osmond e Kanagy, 2014; Polhemus e Lefer, 2014; Wallace, Motta, *et al.*, 2018). Nesse contexto, moléculas doadoras de H₂S vêm sendo sintetizadas, algumas vezes, de forma mista com outro fármaco já existente. Baskar *et al.* (2008) demonstraram em um estudo *in vitro* que um AINE ligado à uma fração doadora de H₂S, o S-diclofenaco, foi capaz de inibir a proliferação de CMLVs de aortas de maneira dose dependente e não citotóxica (Baskar *et al.*, 2008).

Dessa forma, nós avaliamos os efeitos do Otenaproxesul, uma molécula doadora de H₂S derivada do Naproxeno, um dos AINEs mais utilizados na prática clínica. O Naproxeno apresenta risco cardiovascular reduzido se comparado a outros AINEs, principalmente em relação àqueles que são inibidores seletivos da ciclo-oxigenase do tipo 2 (COX-2) (Angiolillo e Weisman, 2017). Além disso, o fato de não elevar substancialmente a pressão arterial sistólica e da sua capacidade de inibir a agregação plaquetária, contribuem para o seu melhor perfil de segurança (Angiolillo e Weisman, 2017).

Assim, sabendo dos efeitos anti-inflamatórios e antiproliferativos do Otenaproxesul, este estudo visa investigar os efeitos conjuntos da inibição das

COXs e de liberação do H₂S sobre o processo de remodelamento arterial que ocorre na hiperplasia neointimal, e analisar o envolvimento de mediadores locais na formação de neointima. Compreender como esses componentes participam da fisiopatologia da hiperplasia neointimal é importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes para melhorar os resultados a longo prazo e obter o controle completo da reestenose.

1.1 Fisiopatologia da hiperplasia neointimal

Embora seja comum o desenvolvimento da hiperplasia neointimal, que em geral é assintomática em seu estado inicial, uma intervenção percutânea bem sucedida melhora a qualidade de vida de pacientes com isquemia grave (Inoue *et al.*, 2011). Porém, a reestenose é um fator de limitação a longo prazo dos procedimentos cirúrgicos endovasculares. Esse processo é definido pelo espessamento da camada íntima, que ocorre como uma resposta adaptativa em decorrência da lesão vascular gerada pela angioplastia, implante de *stent* ou reparo cirúrgico (Mitra e Agrawal, 2006). Com a progressão da reestenose, esse remodelamento é associado a mudanças estruturais, mecânicas e hemodinâmicas que predispõem a complicações vasculares.

Os vasos sanguíneos são formados por três camadas distintas: íntima, média e adventícia. A camada íntima possui uma monocamada de células endoteliais (CE), na camada média são encontradas CMLVs, enquanto a adventícia é constituída de elementos do tecido conjuntivo (Figura 1) (Inoue *et al.*, 2011; Zain *et al.*, 2020). Na hiperplasia neointimal, ocorre o acúmulo de fibroblastos e CMLVs na camada íntima da artéria e deposição de componentes da matriz extracelular (MEC). O resultado desse processo é o espessamento da camada íntima, denominada neointima, levando a redução da área luminal (Figura 2) (Godin *et al.*, 2000).

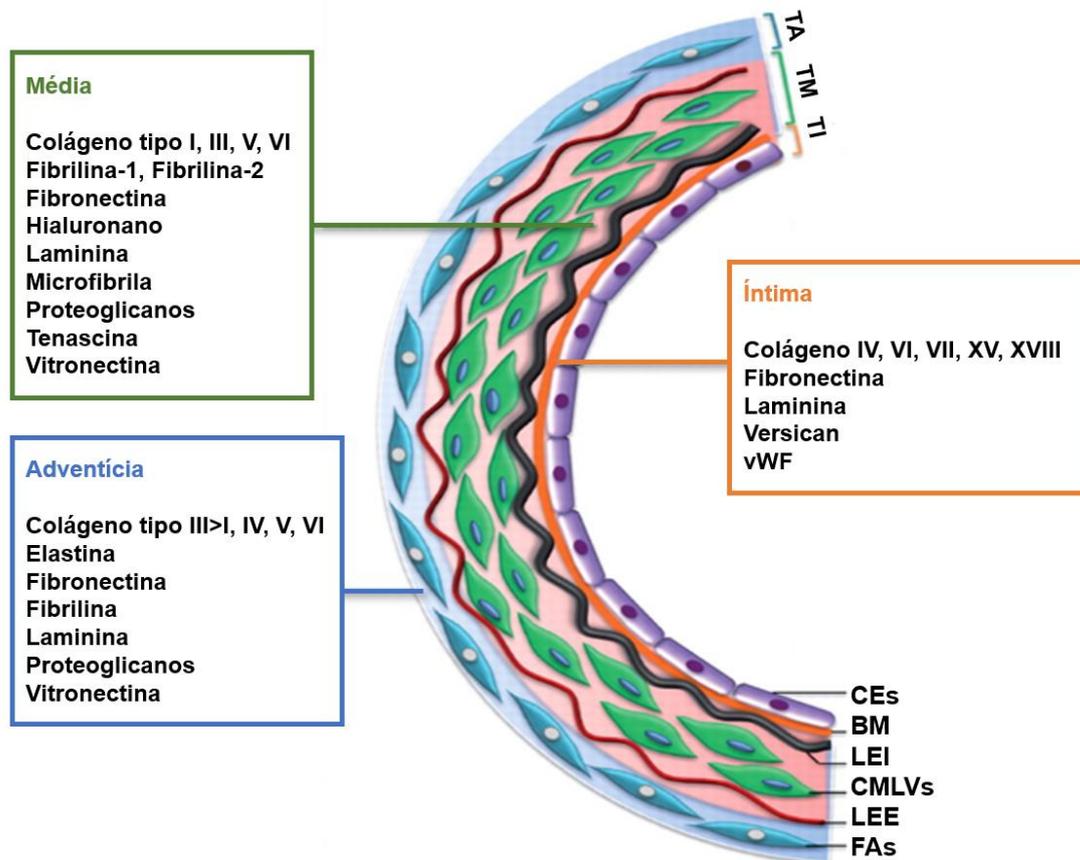


Figura 2: Arquitetura da parede arterial e seus componentes da matriz extracelular (MEC). A parede do vaso tem uma arquitetura de três camadas: a túnica íntima, a túnica média e a túnica adventícia. Os principais elementos da parede arterial compreendem o componente celular da vasculatura como CE, CMLVs, FAs e o componente MEC do vaso, que contribuem para a estrutura de uma vasculatura funcional. CE: célula endotelial; BM: membrana basal; LEI: lâmina elástica interna; CMLVs: células musculares lisas vasculares; LEE: lâmina elástica externa; HSPG-2: proteoglicano 2 de sulfato de heparano; vWF: fator de von Willebrand; TI: túnica íntima; TM: túnica média; TA: túnica adventícia; FAs: fibroblastos adventícios. (Chelladurai et al., 2012).

Devido à lesão endotelial arterial, uma cascata de eventos é iniciada para o desenvolvimento da camada neoíntima. Os procedimentos cirúrgicos endoluminais provocam danos ao endotélio arterial resultando na exposição do colágeno e do fator tecidual, desencadeando a ativação de plaquetas e a cascata de coagulação com posterior formação de um tampão plaquetário (Mitra e Agrawal, 2006; Inoue *et al.*, 2011). Na ausência de endotélio intacto, plaquetas e leucócitos se acumulam no local e liberam uma série de fatores de crescimento e citocinas, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de

crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante beta (TGF- β), fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1, interleucina (IL)-8, aminas vasoativas, prostaglandinas, fator de Von Willebrand (vWF), espécies reativas de oxigênio (EROs) dentre outros (Figura 2) (Otsuka *et al.*, 2012; Van Varik *et al.*, 2012).

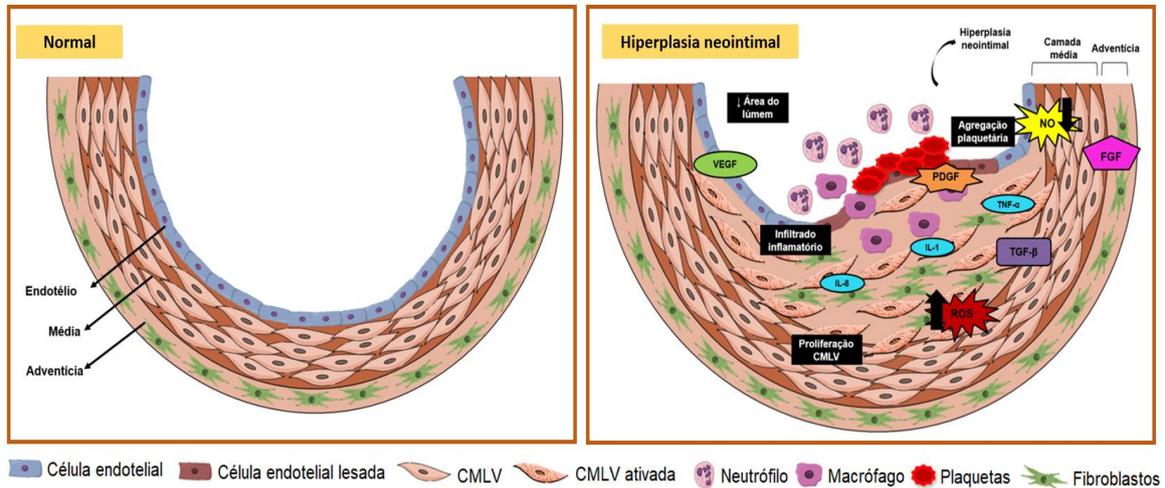


Figura 2: Componentes fisiopatológicos que levam ao remodelamento arterial na hiperplasia neointimal. Imagens representativas em corte transversal da parede arterial. Condições normais. Hiperplasia neointimal. A hiperplasia neointimal apresenta como característica principal o espessamento da parede arterial, causado pela degradação da fibra elástica e deposição de matriz extracelular, como o colágeno, que contribuem para a adaptação da parede arterial. O processo é complexo envolvendo agregação plaquetária, liberação de citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, estresse oxidativo, entre outros. Abreviaturas: COXs, ciclo-oxigenases; FGF, fator de crescimento derivado de fibroblastos; IL-1, interleucina 1; IL-8, interleucina 8; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; EROs, espécies reativas de oxigênio; TGF- β , fator de crescimento transformador beta; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa. Adaptado de Hu e Wa, 2012.

Em seguida, é iniciada a formação de um tecido de granulação, onde CEs se proliferam por toda a extensão da lesão, ao passo que CMLVs e macrófagos substituem o coágulo de fibrina pelo tecido de granulação. Esse novo tecido formado é composto por macrófagos, que além de ampliar a resposta inflamatória através da secreção de várias citocinas e quimiocinas, vão fagocitar fragmentos celulares (Campbell e Campbell, 2012). Os macrófagos, juntamente com as plaquetas e CEs, também liberam fatores de crescimento que irão

favorecer a proliferação das CMLVs e CEs, que são importantes para curar a superfície que foi lesionada (Wight e Potter-Perigo, 2011).

A partir daí, o tecido inicia o processo de remodelamento onde as CMLVs proliferam e migram da camada média em direção à camada íntima em resposta à estímulos mitogênicos e se diferenciam do seu fenótipo contrátil para um sintético. Em estado normal, as CMLVs exibem um fenótipo de células contráteis, devido a presença de algumas proteínas, tais como, α -actina, miosina, SM-22 α , smoothelin e caldesmon-h. Entretanto, em condições patológicas, as CMLVs assumem um estado ativado em resposta à vários estímulos, incluindo ativação de fatores de crescimento e liberação de citocinas pelo endotélio lesado e leucócitos infiltrantes, levando à transição fenotípica do seu estado contrátil para o estado ativado (Campbell e Campbell, 2012; Herring *et al.*, 2017). Esse processo é acompanhado por um aumento da secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs) e da produção de componentes da MEC, particularmente, os proteoglicanos, que facilitam a remodelação da MEC (Owens *et al.*, 2004; Rensen *et al.*, 2007).

As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco (Zn^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}) que degradam várias proteínas que constituem a MEC, como as fibras de colágeno, elastina, fibronectina e laminina. Por essas funções, as MMPs participam da remodelação fisiológica de tecidos e no controle da migração e proliferação de células adjacentes (Van Varik *et al.*, 2012). Um desequilíbrio entre a síntese e a degradação das MMPs provoca alterações indesejáveis na estrutura da MEC (Galis e Khatri, 2002; Newby, 2006).

Foram descritas cerca de 28 isoformas de MMPs, que se diferem de acordo com a sua estrutura, tipo celular e com o substrato que elas degradam. As gelatinases, MMP-2 e MMP-9, são encontradas na camada íntima e camada média das artérias, onde a MMP-2 é expressa de maneira constitutiva, e por outro lado, a MMP-9 é expressa de forma induzida. As MMP-2 e MMP-9 possuem estruturas diferentes das outras MMPs, pois apresentam domínios semelhantes à fibronectina, que conferem especificidade ao substrato como colágeno, gelatina (colágeno desnaturado) e elastina (Figura 3) (Bäck *et al.*, 2010).

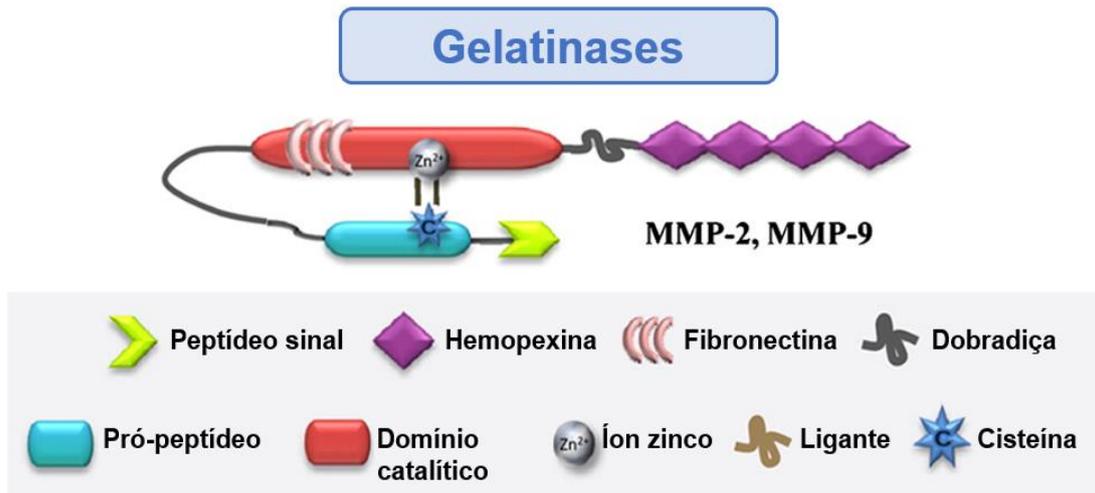


Figura 3: A estrutura das gelatinases. As MMP-2 e MMP-9 apresentam uma sequência sinalizadora (sequência sinal N) ligada a um domínio pró-peptídico (pró-peptídeo + interruptor de cisteína) acoplado a um íon Zn^{2+} . Em seguida, está disposto o domínio catalítico com três repetições de fibronectina ligados ao domínio de hemopexina junto a porção C-terminal. (Fanjul-Fernández et al., 2010)

Em artérias, a síntese de MMPs pode ser induzida por citocinas, peptídeos vasoativos e EROs (Liu *et al.*, 2016; Willecke *et al.*, 2019). A atividade de degradação de MEC exercida pelas MMP-2 e MMP-9 são fundamentais para migração celular e remodelamento arterial na hiperplasia neointimal (Godin *et al.*, 2000; Johnson e Galis, 2004). A atividade aumentada dessas enzimas está envolvida na deposição de MEC, o que leva ao aumento da rigidez arterial (Figura 4).

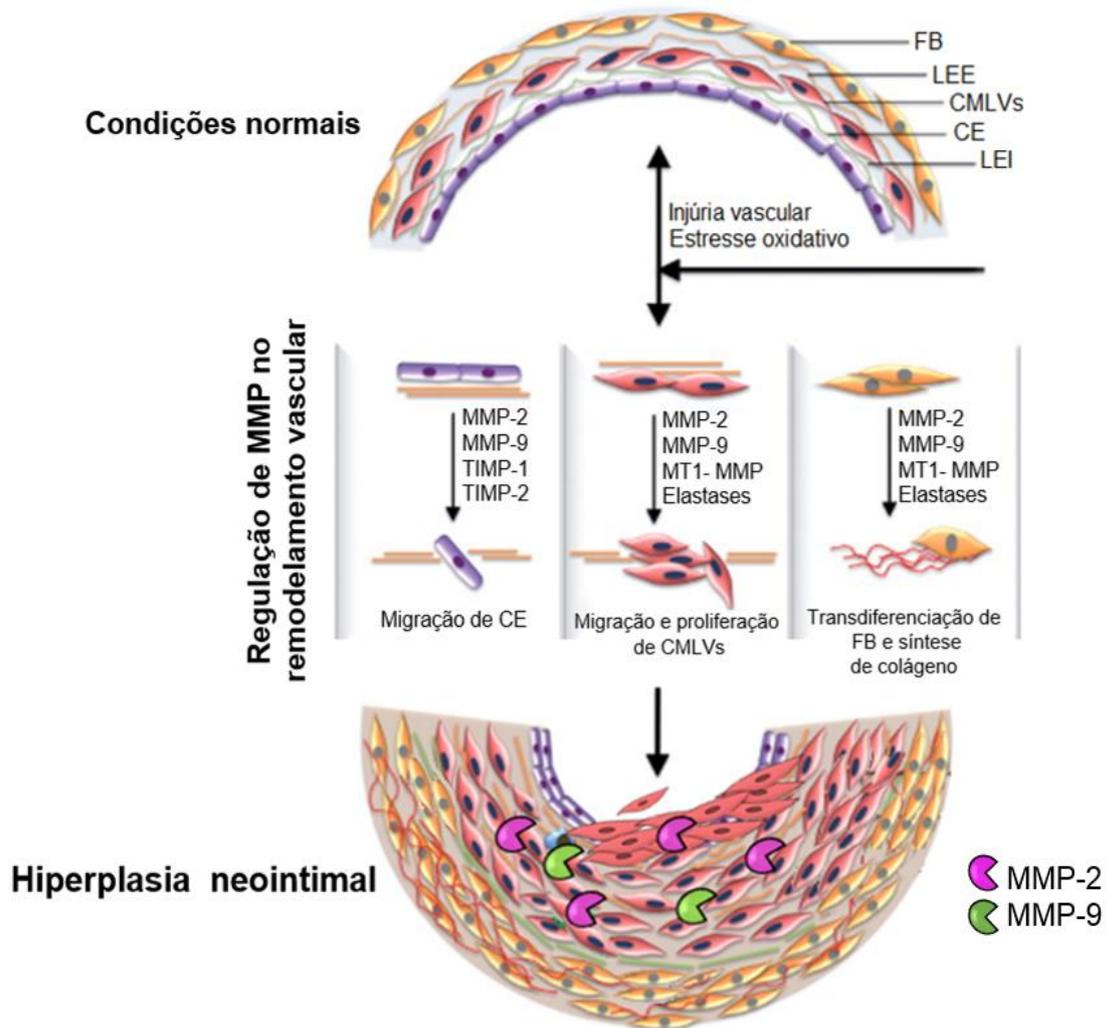


Figura 4: Metaloproteínases de matriz (MMPs) na patogênese da hiperplasia neointimal. Estímulos mecânicos (exógenos) e hemodinâmicos, estresse oxidativo, inflamação, causam lesão vascular e, subsequentemente, promovem a produção anormal de fatores de crescimento e citocinas (como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento transformador- β (TGF) - β , fator de necrose tumoral (TNF) - α , e citocinas como a interleucina (IL) -1 β que arbitram as alterações fisiopatológicas na vasculatura por meio da modulação da expressão e regulação de MMP. A desregulação de MMPs está implicada em vários processos fisiopatológicos, como migração de células endoteliais (CE), migração e hiperplasia de células musculares lisas vasculares (CMLVs), transdiferenciação de fibroblastos (FB), aumento da renovação da matriz extracelular e recrutamento de células inflamatórias, facilitando a progressão do processo de remodelação vascular e estabelecimento da hiperplasia neointimal. FB: fibroblastos; LEE: lâmina elástica externa; LEI: lâmina elástica interna; bFGF: fator básico de crescimento de fibroblastos; EROs: espécies reativas de oxigênio; TIMP: inibidor tecidual de metaloproteinase; MT1: membrana tipo 1. Adaptado de Chelladurai et al., 2012.

Johnson e Galis, 2004, demonstraram que a deficiência genética de MMP-2 e MMP-9 reduziram a migração de CMLVs *in vitro* e limitou a formação da hiperplasia neointimal *in vivo*. Outros estudos confirmaram esses resultados, mostrando uma diminuição no desenvolvimento da hiperplasia neointimal em animais *knockout* para ambas as enzimas (Kuzuya *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2014). Além disso, foi demonstrado *in vitro* a migração de CMLVs após estímulo com TNF- α ocorre de forma dependente de MMP-9 e a proliferação dessas células após estimulação com PDGF ocorre por um mecanismo dependente de MMP-2 (Guo *et al.*, 2014).

Outro componente importante na fisiopatologia da hiperplasia neointimal é o óxido nítrico (NO). O NO é um gás produzido endogenamente, com meia-vida na ordem de segundos e é amplamente difusível, o que facilita sua ação em células adjacentes (Barbato e Tzeng, 2004). Sua síntese ocorre através de uma família de óxido nítrico sintases (NOS) que produzem NO e citrulina por meio da oxidação da L-arginina. Existem três isoformas de NOS, sendo que, duas delas são expressas de maneira constitutiva: a NOS neuronal (nNOS ou NOS-1) e a NOS endotelial (eNOS ou NOS3). A terceira isoforma é induzível, iNOS ou NOS-2, e é expressa por uma variedade de células, como macrófagos, células endoteliais, CMLVs, entre outras (Cyr *et al.*, 2020).

O NO possui papel protetor em lesões vasculares, como inibição da proliferação e migração de CMLVs, aumento da proliferação e migração de células endoteliais, suprime a agregação plaquetária e promove inibição da adesão de leucócitos, monócitos e de plaquetas ao endotélio (Rudic *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006; Bahnson *et al.*, 2015). A junção desses efeitos auxilia no controle de eventos associados ao desenvolvimento da hiperplasia neointimal (Bahnson *et al.*, 2015). Na vasculatura, o NO é produzido em especial pela enzima eNOS e seu papel na hiperplasia neointimal tem sido estudado por meio de animais *knockout* para a NOS e inibidores de NOS. Camundongos *knockout* para a eNOS e submetidos à cirurgia de ligadura da artéria carótida apresentaram remodelamento arterial exacerbado, se comparados a animais selvagens, além de exibir uma resposta hiperplásica da parede arterial (Rudic *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006; Bahnson *et al.*, 2015). A inibição farmacológica da eNOs também exibiu resultados similares. Em um modelo de lesão da artéria

carótida em ratos e tratados com N-Nitro-L-Arginina, apresentaram um aumento do crescimento de CMLVs na íntima das artérias carótidas (Fischer *et al.*, 2004). Por outro lado, o tratamento com doador de NO, seja administrado de forma sistêmica ou local, inibiu a hiperplasia neointimal após intervenções vasculares (Havelka *et al.*, 2013; Bahnson *et al.*, 2016). Esses estudos sugerem que uma falha na via de síntese de NO promove remodelamento arterial anormal e formação da hiperplasia neointimal, evidenciando o papel crítico do NO endógeno na manutenção da homeostase vascular.

1.2 Papel das ciclo-oxigenases (COXs) na fisiopatologia da reestenose

Diversos estudos demonstraram a participação das ciclo-oxigenases (COXs), COX-1 e COX-2, na fisiopatologia na reestenose (Rudic *et al.*, 2005; Ogawa *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2014). Estas isoenzimas possuem função importante no controle da homeostase vascular, além de serem mediadores-chaves da inflamação, inclusive em doenças vasculares (Mccadam *et al.*, 2000; Parente e Perretti, 2003). Em condições fisiológicas, as COXs catalisam a conversão do ácido araquidônico (AA) em vários mediadores lipídicos, chamados prostaglandinas (PGs) e tromboxanos. A catálise do AA pelas COXs resulta na produção da prostaglandina PGG₂, e um domínio peroxidase catalisa a redução de PGG₂ em um endoperóxido instável, a PGH₂ (Grosser *et al.*, 2017). Através da ação de determinadas sintases a jusante da via de sinalização, a PGH₂ é convertida em tromboxano A₂ (TxA₂), nas prostaglandinas PGE₂, PGD₂, PGF_{2α} e prostaciclina (PGI₂) (Harirforoosh *et al.*, 2013; Grosser *et al.*, 2017).

A isoforma COX-1 é expressa de forma constitutiva em vários tecidos do organismo, apesar de também apresentar participação em situações patológicas como a inflamação. A COX-1 é a única isoenzima expressa em plaquetas, onde estimula a síntese de TxA₂, levando à agregação plaquetária, vasoconstrição e proliferação de CMLVs, que contribuem para o remodelamento vascular (Grosser *et al.*, 2006; Grosser *et al.*, 2017). O TxA₂ é um dos componentes responsáveis pelo risco aumentado de eventos cardiovasculares quando sua produção e sua atividade estão aumentadas. Dessa forma, a inibição de COX-1

suprime a síntese de TxA₂, diminuindo consideravelmente efeitos adversos no sistema cardiovascular (Grosser *et al.*, 2017).

Por outro lado, a expressão de COX-2 é aumentada em especial durante processos inflamatórios, apesar de já ter sido demonstrado sua expressão constitutiva em tecidos do sistema nervoso central, rim e também em células endoteliais (Harris *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2007; Rios *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014; Yagami *et al.*, 2016; Marqués *et al.*, 2020). A COX-2 tem sua síntese induzida por estímulos como estresse de cisalhamento, fatores de crescimento, além de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-2 e TNF- α (Harris *et al.*, 2004; Krotz *et al.*, 2005).

Diversos inibidores da atividade das COXs, os AINES, são amplamente utilizados na clínica devido a eficácia no tratamento da dor e inflamação. Apesar de serem eficientes no tratamento dessas condições, o uso crônico pode provocar efeitos adversos, como o aparecimento de úlceras gástricas decorrentes da inibição de COX-1 no trato gastrointestinal (TGI) (Harirforoosh *et al.*, 2013; Grosser *et al.*, 2017; García-Rayado *et al.*, 2018), além de agravarem a hipertensão pré-existente em indivíduos, tornando-os propensos a desenvolver hipertensão arterial por disfunção renal (Zheng e Du, 2014; Bruno *et al.*, 2019). Na tentativa de reduzir tais efeitos colaterais, surgiram os AINEs seletivos (s-AINES), que atuam na inibição seletiva da isoforma COX-2, enquanto os não seletivos (ns-AINES) inibem ambas as enzimas. Com o surgimento dos inibidores seletivos de COX-2, esperava-se que esses fármacos não apresentassem os efeitos colaterais sobre o TGI. Entretanto, surgiram relatos de eventos trombóticos no sistema cardiovascular, seguidos de morte, em pacientes com doença cardiovascular prévia (Khan *et al.*, 1998; Parente e Perretti, 2003; Krotz *et al.*, 2005). Possivelmente, tal efeito ocorre devido à um desequilíbrio entre a síntese de TxA₂ proveniente de COX-1 plaquetária, e da PGI₂ pelo endotélio, via COX-1 e COX-2. Como o TxA₂ possui efeitos pró-trombóticos e vasoconstritores, enquanto a PGI₂ é antitrombótica e vasodilatadora, a inibição de COX-2 leva à uma redução de PGI₂ endotelial, e a síntese de TxA₂ pelas plaquetas é mantida, favorecendo a agregação plaquetária e formação de trombos (Araujo *et al.*, 2005; Hilário *et al.*, 2006).

Neste trabalho, discutiremos o papel das COXs na fisiopatologia da hiperplasia neointimal e os efeitos da inibição farmacológica dos AINEs sobre esse processo. Diversos estudos experimentais e clínicos demonstraram evidências que implicam a COX-1 e COX-2. O primeiro relato descrito de que os AINEs podem exercer efeitos sobre o crescimento celular foi demonstrado por Waddell e Loughry (1983), mostrando que o sulindaco reduziu significativamente o tamanho de pólipos colônicos de pacientes com síndrome de Gardner (Waddell e Loughry, 1983). Estudos posteriores demonstraram que o salicilato de sódio, aspirina e o sulindaco, se administrados em elevadas concentrações, são capazes de inibir células tumorais e CMLVs (Aas *et al.*, 1995; Marra e Liao, 2001). Esses resultados levaram a investigação sobre qual seria o potencial terapêutico desses fármacos para o tratamento de doenças vasculo-proliferativas, como a hiperplasia neointimal. Dessa forma, Reis *et al.* (2000) mostraram que o sulindaco reduziu consideravelmente a área neointimal formada após lesão por balão na artéria femoral em camundongos selvagens e com deficiência da apolipoproteína E (Reis *et al.*, 2000).

Marra *et al.* (2000) formularam a hipótese de que a inibição da proliferação de CMLV humanas após o tratamento com altas doses de salicilatos ocorre devido a paragem da fase G1/S do ciclo celular como consequência da regulação positiva dos inibidores de CDK, p21 e p27. Um outro estudo demonstrou o efeito dos AINEs não salicilatos, o diclofenaco, ibuprofeno, indometacina e sulindaco também afetam o crescimento celular por meio do bloqueio na fase G1 do ciclo celular. Porém, os salicilatos aspirina e salicilato de sódio mostraram uma inibição do ciclo pós G1, sugerindo um envolvimento das fases tardias G2/ M do ciclo celular (Brooks *et al.*, 2003).

Alguns estudos *in vivo* utilizando modelos animais de lesão arterial demonstraram uma regulação positiva de COX-2 na camada neointima formada. Isso foi confirmado por análise quantitativa de RT-PCR, mostrando um aumento da expressão de mRNA para COX-2. Por outro lado, o tratamento sistêmico desses animais com um inibidor seletivo de COX-2, meloxicam, suprimiu de maneira significativa o avanço da formação de neointima se comparado aos animais que não receberam tratamento (Ogawa *et al.*, 2009).

Um outro estudo investigou a expressão de COX-1 e COX-2 em artérias após lesão por angioplastia com balão, assim como avaliou o efeito de um inibidor seletivo para COX-1, outro para COX-2 e uma combinação para ambas as enzimas. As artérias lesadas apresentaram expressão aumentada tanto de COX-1, quanto de COX-2 em comparação às artérias normais. A inibição farmacológica de COX-1 ou das duas isoformas levou à uma diminuição da hiperplasia da íntima. Em contrapartida, a inibição de COX-2 não apresentou efeito sobre a reestenose, sugerindo que parte do efeito de prevenção do desenvolvimento de neoíntima ocorre pela inibição de COX-1 (Connolly *et al.*, 2002).

Por outro lado, Yang *et al.*, 2004 mostraram um efeito benéfico na inibição de COX-2. Foi avaliado o efeito do inibidor seletivo para COX-2, o celecoxibe, sobre a proliferação de CMLVs por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo* e possíveis vias de sinalização envolvidas nesse processo. Nos estudos *in vitro*, o celecoxibe reduziu a proliferação de CMLVs por indução da apoptose. O mesmo efeito foi observado nos experimentos *in vivo*, onde foi mostrado uma redução da neoíntima em artérias de animais submetidas a lesão por desnudação. Após a lesão da parede arterial, algumas vias de sinalização são ativadas em CMLVs, dentre elas, o eixo Akt/GSK está ligado à formação da neoíntima. Nos experimentos *in vitro*, o celecoxibe suprimiu a fosforilação da Akt e GSK, efeitos associados à diminuição do número de CMLVs. Já nos experimentos *in vivo*, a inibição da proliferação de CMLVs pelo celecoxibe foi revertida pela transfecção de Akt constitutivamente ativa nas artérias lesadas. Tais achados fornecem mais evidências sobre os efeitos antiproliferativos da inibição de COX e que esse efeito pode ser mediado pelo eixo Akt/GSK (Yang *et al.*, 2004).

Zhang *et al.*, 2013 avaliaram a formação de neoíntima em animais *knockout* para COX-2 e o papel da PGE₂ sobre a proliferação de CMLVs. O remodelamento vascular foi induzido por lesão em artérias femorais levando ao desenvolvimento da camada neoíntima, que não foi observada em animais *knockout* para COX-2. Além disso, a deficiência de COX-2 resultou na diminuição de PGE₂, associando esse prostanóide à aceleração do processo de reestenose, por meio da ativação do receptor EP3 (Zhang *et al.*, 2013).

Diante das diversas demonstrações *in vivo* e *in vitro*, os estudos indicam que principalmente a COX-2 contribui para a progressão da patogênese da hiperplasia neointimal e que a administração de drogas que bloqueiam sua via de sinalização se torna promissora para prevenção desse quadro.

1.3 Otenaproxesul, um AINE doador de sulfeto de hidrogênio (H₂S) com efeitos antiproliferativos

Os AINEs correspondem à um dos fármacos mais utilizados na clínica para o tratamento da inflamação, dor, e outras doenças, ainda que apresentem efeitos prejudiciais ao TGI e ao sistema cardiovascular (Grosser *et al.*, 2006; Wallace, 2008). Além das prostaglandinas liberadas pelas COXs, existem outros mediadores que participam do controle da homeostase gástrica, dentre eles, o NO modula alguns dos mesmos efeitos na defesa da mucosa, como por exemplo fluxo sanguíneo, muco e liberação de bicarbonato, da mesma forma que as PGs, e facilitar o reparo de úlceras (Brown *et al.*, 1993; Elliott *et al.*, 1995; Wallace, 2008). Esses efeitos do NO foram investigados por meio de AINEs liberadores de NO, demonstrando efeitos similares aos AINEs convencionais, porém, com efeitos adversos reduzidos no sistema gastrointestinal e cardiovascular (Wallace e Del Soldato, 2003; Wallace, 2010). Ao longo dos anos, a busca por novos fármacos que reduzissem tais efeitos adversos foram incessantes, e um novo gasotransmissor com efeitos similares aos do NO passou a ser estudado, o sulfeto de hidrogênio (H₂S).

O H₂S é um gás antes conhecido apenas por seus efeitos poluentes ao meio ambiente, mas hoje em dia é reconhecido por suas ações biológicas e como mediador farmacológico. Em mamíferos, o H₂S endógeno é sintetizado em células endoteliais e CMLVs a partir de L-cisteína e homocisteína pela ação das enzimas citosólicas dependentes de piridoxal-5'-fosfato (PLP), denominadas cistationina γ -liase (CSE) e cistationina β -sintase (CBS) (Figura 6) (Wu *et al.*, 2015; Donadoni *et al.*, 2019). Fisiologicamente, os níveis séricos de H₂S podem variar entre 30-100 μ M, enquanto no cérebro podem chegar a 160 μ M e, mesmo com a administração de drogas liberadoras de H₂S em doses que produzem efeitos farmacológicos, os níveis de H₂S no plasma dificilmente ultrapassam a

faixa normal (Wang, 2002; Distrutti *et al.*, 2006; Fiorucci *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). Isso ocorre devido à eficiência de seus sistemas metabólicos, de eliminação e sequestro do H₂S (Fiorucci *et al.*, 2002; Fiorucci *et al.*, 2006).

Biossíntese endógena de H₂S

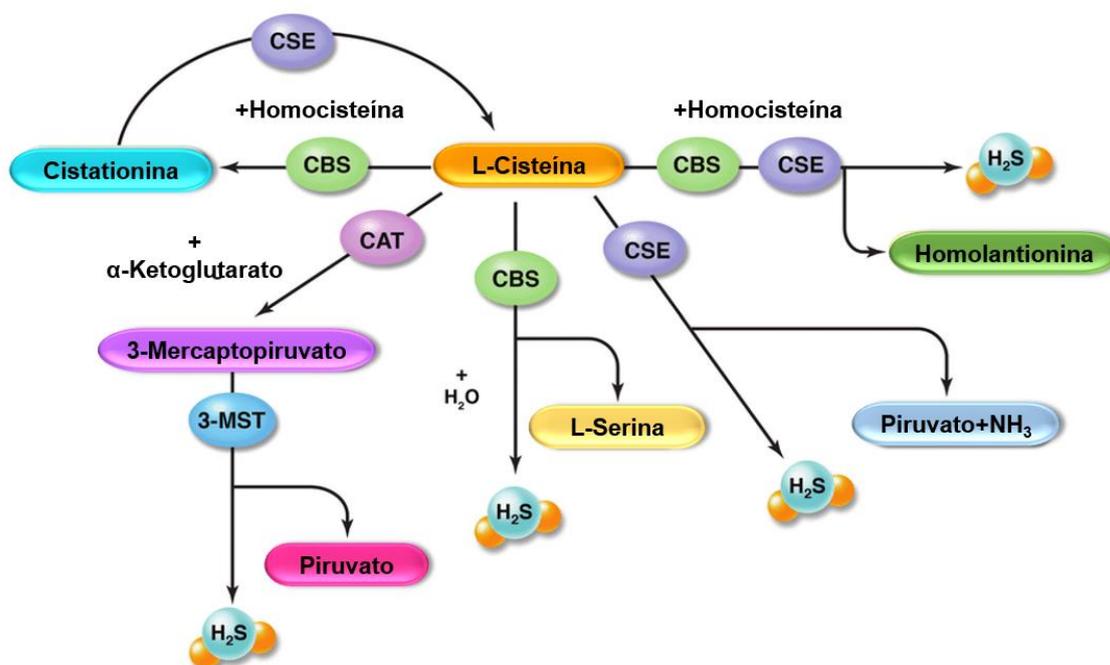


Figura 5: Síntese enzimática endógena de sulfeto de hidrogênio (H₂S). A produção endógena de H₂S em sistemas de mamíferos foi atribuída a três enzimas específicas do tecido: cistationina beta sintase (CBS), cistationina gama liase (CSE) e 3-mercaptopiruvato (3-MST). O substrato para a produção de H₂S endógeno é a L-cisteína. A produção de H₂S conduzida por CBS está associada à condensação de homocisteína com L-cisteína para produzir cistationina e H₂S. CSE converte L-cisteína em piruvato, amônia e H₂S. CAT produz 3-mercaptopiruvato por meio da condução da reação de L-cisteína com α-ketoglutarato. O 3-mercaptopiruvato é então metabolizado por 3-MST para gerar H₂S. (Donnarumma *et al.*, 2017)

O H₂S possui funções fisiológicas em diferentes órgãos, dentre eles, alguns estudos demonstraram sua síntese no TGI, contribuindo para a defesa da mucosa e resolução de úlceras e colite (Fiorucci *et al.*, 2005; Linden *et al.*, 2008; Wallace, 2010). No sistema cardiovascular, o H₂S inibe a aderência e infiltração de leucócitos circulantes ao endotélio vascular e participa da regulação da pressão arterial sistêmica (Zanardo *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008). Diversos estudos em modelos animais relataram o envolvimento do H₂S na

regulação da patogênese de distúrbios vasculares (Yang *et al.*, 2008; Mani *et al.*, 2013). Seus efeitos são conhecidos por facilitar angiogênese e promover formação de novos vasos, indução da proliferação e migração de células endoteliais e recrutamento de células progenitoras endoteliais (CPEs) em processos de cicatrização em modelos de lesão arterial, além de efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, vasodilatadores e de inibição do crescimento de CMLVs em doenças vásculo-proliferativas (Cai *et al.*, 2007; Papapetropoulos *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2014; Polhemus e Lefer, 2014; Hu *et al.*, 2019)

Além disso, alguns autores avaliaram a administração exógena do H₂S para um melhor entendimento sobre seus efeitos. Hu, *et. al.*, 2019 observaram que o tratamento com um doador inorgânico de H₂S melhorou o processo de reendotelização e inibiu a hiperplasia neointimal em um modelo de lesão da artéria carótida em camundongos (Hu *et al.*, 2019). Esse mesmo efeito foi observado por Ma, *et.al.*, 2012, demonstrando uma redução significativa da proliferação de CMLVs e aumento da apoptose das mesmas na camada neointima (Ma *et al.*, 2012). Outro estudo *in vitro* realizado com CMLVs provenientes de veias humanas de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização e tratadas com o doador de H₂S, hidrossulfeto de sódio (NaHS), demonstrou inibição da proliferação e migração dessas células ao promover a proliferação e migração de células endoteliais umbilicais humanas (CEUH) (Longchamp *et al.*, 2019). Esses efeitos do H₂S sobre o crescimento de CMLVs sugerem uma nova estratégia para limitar a proliferação de CMLVs e desenvolvimento da hiperplasia intimal.

Diante de todos esses efeitos benéficos, o H₂S tem sido explorado na concepção de novos AINEs (S-AINEs). O liberador de H₂S derivado do diclofenaco, S-diclofenaco, mostrou ser mais eficaz que o fármaco original na diminuição da inflamação e promoveu menos danos no trato gastrointestinal (Lanas e Scheiman, 2007; Wallace *et al.*, 2007). Além disso, foi demonstrado em um estudo *in vitro* que o S-diclofenaco, foi capaz de inibir a proliferação de CMLV de aortas de maneira dose dependente e não citotóxica (Baskar *et al.*, 2008).

No presente estudo, nós avaliamos os efeitos de um novo liberador de H₂S derivado do Naproxeno, o Otenaproxesul. O Naproxeno corresponde à um dos AINEs amplamente utilizados devido sua toxicidade cardiovascular reduzida,

principalmente em relação àqueles que são inibidores seletivos de COX-2 (Angiolillo e Weisman, 2017). O Otenaproxesul (antes denominado ATB-346) foi sintetizado como uma alternativa de primeira linha para o tratamento de osteoartrite, artrite reumatoide e diminuição geral da dor.

Utilizando modelo animal, foi demonstrado que o tratamento oral com o Otenaproxesul apresentou resultados superiores aos do Naproxeno no que diz respeito à segurança gastrointestinal na prevenção de úlceras gástricas, além de apresentar uma inibição de COX-2 significativamente maior em dose equimolar ao Naproxeno (Wallace, 2010). No ensaio clínico de Fase I, o Otenaproxesul mais uma vez exibiu efeitos melhores comparados ao Naproxeno, demonstrando uma supressão da atividade de COX por um tempo mais prolongado. Na Fase II de estudo clínico, os testes foram realizados em pacientes com osteoartrite para análise da ação prolongada observada pelo tratamento com o Otenaproxesul. Os resultados mostraram que a administração do Otenaproxesul durante dez dias levou à uma redução substancial e significativa da dor se comparada ao tratamento com Naproxeno (Wallace, Vaughan, *et al.*, 2018). O grau de alívio da dor foi reduzido no quarto dia de tratamento, que foi comparado com ensaios clínicos com o Naproxeno (Boucher, 2008) e Celecoxibe em indivíduos com osteoartrite (Wittenberg *et al.*, 2006). Tais efeitos foram associados a inibição substancial de COX, em aproximadamente 85% após a administração do Otenaproxesul (Wallace, Vaughan, *et al.*, 2018). Nos ensaios clínicos de Fase IIB, foi avaliada a segurança gastrointestinal em pacientes saudáveis, tratados com o Otenaproxesul (250 mg uma vez ao dia) e com o Naproxeno (550 mg duas vezes ao dia). Os resultados demonstraram que ambos os fármacos suprimiram a atividade de COX, entretanto 42% dos pacientes tratados com o Naproxeno desenvolveram úlceras gástricas, enquanto apenas 3% dos pacientes que receberam o Otenaproxesul apresentaram danos ao TGI (Wallace e Nagy, 2020).

A ausência de lesão gástrica após a administração oral do Otenaproxesul provavelmente ocorre devido a liberação rápida de H₂S, demonstrando efeito de manutenção da defesa e reparação da mucosa gastrointestinal (Wallace, 2010; Blackler, Motta, *et al.*, 2015). Além disso, seus efeitos também foram avaliados em outras condições patológicas como no crescimento de células tumorais (De

Cicco *et al.*, 2016). De Cicco, *et. al.*, 2016, demonstraram que o Otenaproxesul reduziu a proliferação de células de melanoma humano *in vitro*, efeito associado à inibição da ativação do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B), resultando em apoptose. O mesmo foi observado em um modelo de melanoma *in vivo*, exibindo uma diminuição significativa dos tumores através de propriedades inibidoras da sinalização Akt. Tais achados reforçam a nossa hipótese sobre os efeitos antiproliferativos do Otenaproxesul sobre a reestenose.

O metabolismo do Otenaproxesul e o mecanismo de liberação do H₂S desse composto não foram completamente elucidados. Estudos *in vitro* mostraram que o H₂S é liberado em baixas concentrações em solução tampão e sua liberação é aumentada ao entrar em contato com tecido ou agentes redutores, tais como ditioneitol, L-cisteína ou glutatona (Fomenko *et al.*, 2014). O mecanismo proposto para o metabolismo ocorre pela hidrólise da porção tiol resultando na liberação de H₂S e do naproxeno-4-hidroxi-benzamida (Figura 5) (Fomenko *et al.*, 2014).

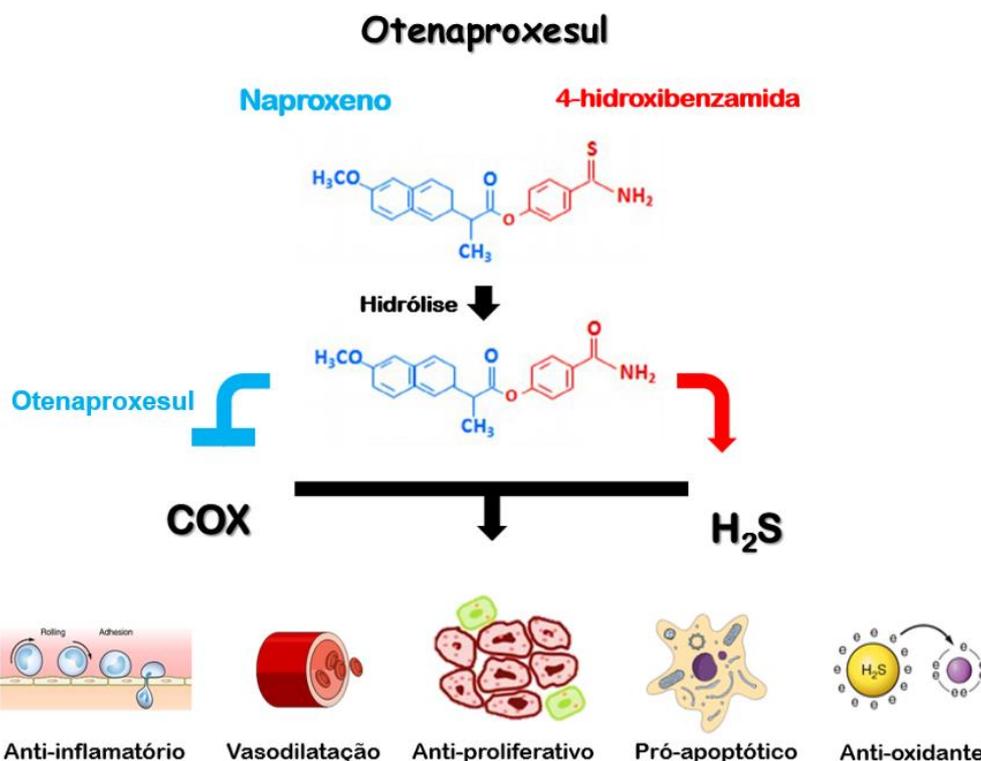


Figura 6: Mecanismo proposto de liberação de sulfeto de hidrogênio (H₂S) e Naproxeno do Otenaproxesul após administração oral. Os efeitos biológicos consistentes com a liberação de H₂S são evidentes dentro de minutos após administração de Otenaproxesul (por exemplo, vasodilatação gástrica). Embora a supressão da síntese de prostaglandina gástrica e a síntese de tromboxano no

sangue total possam ser observadas dentro de 15 minutos após a administração de Otenaproxesul, um aumento significativo nos níveis sanguíneos de Naproxeno ocorre apenas ao longo de várias horas. O H₂S suprime a adesão de leucócitos ao endotélio vascular e a migração de leucócitos para o espaço subendotelial, reduzindo assim a formação de edema. Também promove a reparação tecidual por seus efeitos como vasodilatador, antiproliferativo, pró-apoptótico e antioxidante. (Chan e Wallace, 2013; Gemici et al., 2015).

Considerando que o aumento das COXs e a redução do H₂S são eventos comuns em doenças vasculares proliferativas, o Otenaproxesul, que sabidamente inibe COX e libera H₂S, ainda não foi testado em modelo de hiperplasia neointimal. Apesar do uso terapêutico de drogas liberadoras de H₂S estar em suas fases iniciais, os dados apresentados até agora proporcionam motivos para otimismo, pois podem trazer benefícios em condições nas quais a sua síntese endógena está prejudicada.

2. Hipótese

Otenaproxesul, que é uma molécula híbrida do AINE Naproxeno acoplado a grupamento doador de H₂S, previne a formação da camada neointima em camundongos submetidos à oclusão da artéria carótida.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos da administração local do Otenaproxesul sobre o remodelamento vascular de artérias carótidas ocluídas de camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar morfológicamente a formação de neoíntima nas artérias carótidas e se a hiperplasia neointimal será atenuada ou revertida pelo Otenaproxesul.
- b) Comparar os efeitos do Otenaproxesul aos do Naproxeno, que corresponde à droga protótipo.
- c) Investigar os efeitos e mecanismos do Naproxeno e do Otenaproxesul sobre o remodelamento arterial, por meio da determinação local (*in situ*) de COX-1, COX-2, da produção de espécies reativas de oxigênio, dos níveis de óxido nítrico, dos níveis de MMP-2 e sua atividade.

4. Material e métodos

4.1 Animais

Os experimentos foram executados utilizando camundongos C57BL/6 com 10 semanas de idade para realização da cirurgia de oclusão da artéria carótida. Os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo da UFMG (CEBIO-ICB/UFMG) e mantidos em um ambiente com temperatura controlada, com disponibilidade de comida e água à vontade, sob regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG) sob número de 13/2019 (Anexo I).

4.2 Procedimentos cirúrgicos e delineamento experimental

Inicialmente, os animais receberam pentabiótico (24.000 UI/Kg, via intramuscular), 12 horas antes dos procedimentos cirúrgicos. Para indução da estenose, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Para realizar a oclusão, a artéria carótida esquerda foi exposta através de uma incisão na linha média do lado ventral do pescoço e foi feita ligadura total próxima à sua bifurcação utilizando um fio estéril de seda trançada número 7,0 (Ethicon®) (Godin *et al.*, 2000). A incisão foi fechada por sutura sob condições assépticas. Ao final da cirurgia, os camundongos receberam o analgésico tramadol 12,5 mg/Kg por via subcutânea, a cada 8h, totalizando três administrações. Os animais foram acondicionados sob aquecimento para recuperação da anestesia. Os camundongos foram separados em quatro grupos experimentais:

- **Grupo sham (falso operado):** os animais tiveram o fio posicionado ao redor da artéria, sem comprimi-la;
- **Grupo estenose:** os animais tiveram a artéria carótida comum esquerda isolada e ligada à altura da sua bifurcação;
- **Grupo estenose e tratado com Otenaproxesul:** os animais tiveram a artéria carótida ligada à altura da sua bifurcação e foram tratados localmente com o Otenaproxesul (16 mg/Kg);

- **Grupo estenose e tratado com Naproxeno:** os animais tiveram a artéria carótida ligada à altura da sua bifurcação e foram tratados localmente com o Naproxeno (10 mg/Kg).

Em todos os grupos experimentais os animais foram eutanasiados aos 21 dias (Godin *et al.*, 2000) após a cirurgia de ligação da carótida para as avaliações descritas adiante (Figura 7).

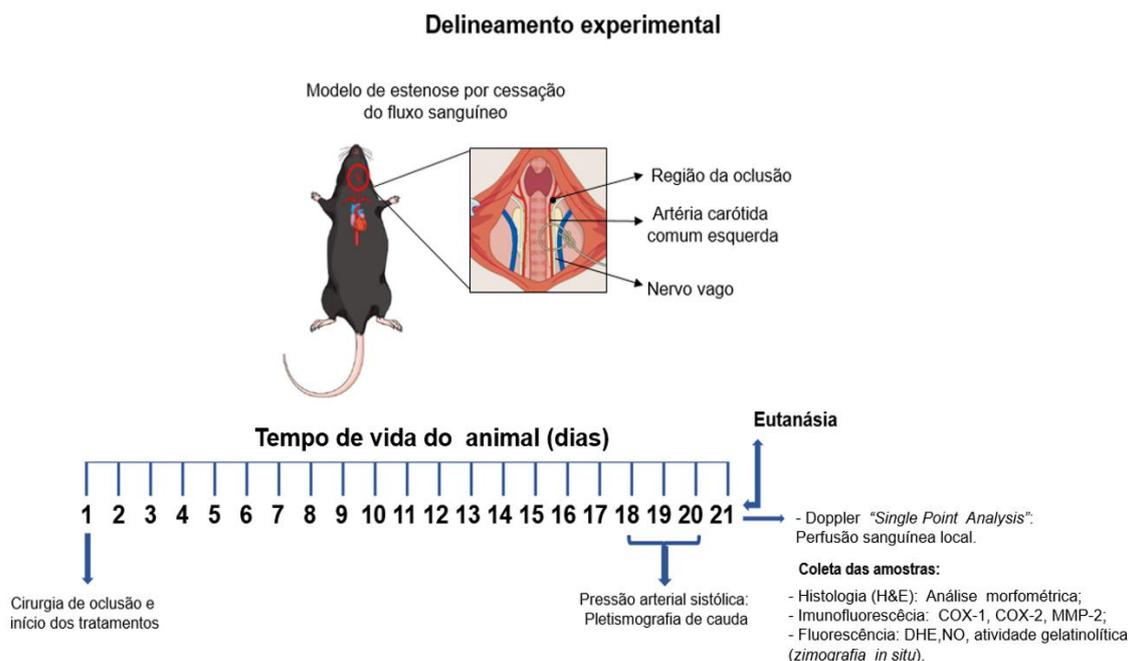


Figura 7: Representação esquemática da cirurgia de oclusão da artéria carótida e do delineamento experimental.

4.2.1 Tratamentos

Após a oclusão da artéria carótida comum esquerda, os animais sham receberam, no meio periadventicial, uma solução contendo 40% de gel Pluronic F-127® (Sigma-Aldrich) mantida em gelo e sendo aplicada na artéria carótida imediatamente após a oclusão. Já os animais tratados receberam a mesma formulação em gel contendo o Otenaproxesul (16 mg/Kg), ou Naproxeno (10 mg/Kg). As doses das drogas são equimolares e escolhidas conforme estudo prévio (Ekundi-Valentim *et al.*, 2013). O Otenaproxesul foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) e o Naproxeno em álcool etílico absoluto e, posteriormente, foram adicionados ao gel de Pluronic (30 µL). O Pluronic é um hidrogel sintético composto por copolímeros anfifílicos formado por unidades de

óxido de etileno (PEO) e óxido de polipropileno (PPO) e funciona por meio de um mecanismo reversível de gelificação e que permite manter as moléculas encapsuladas em sua estrutura, favorecendo a adesão do fármaco em seu local de ação. O gel permanece em estado líquido enquanto resfriado e gelifica à temperatura corporal, permanecendo no local onde foi administrado.

4.3 Medida da pressão arterial sistólica (PAS)

A análise da PAS foi realizada utilizando o método não invasivo de pletismografia de cauda, através do sistema CODA, Software versão 4.1. O sistema CODA capta a PAS pelas alterações de volume da cauda dos animais. Antes de realizar as medidas, no 18º e 19º dia, foram feitas aferições para ambientação de cada animal. No 20º dia foi feita a aferição e tomada como a medida de PAS oficial.

4.4 Procedimentos para análises

Foram realizadas repetições do protocolo experimental conforme tratamento das amostras. As repetições consistiram dos grupos: sham, estenose, estenose + Otenaproxesul e estenose + Naproxeno, todos eutanasiados após 21 dias da oclusão da carótida. As amostras de artérias carótidas foram retiradas conforme o tipo de análise: 1) coleta para obtenção de material em parafina; 2) coleta para a obtenção de material em meio para congelamento (Tissue-Tek OCT Compound; Sakura®, USA) e 3) análise da perfusão sanguínea local por Doppler “*single point*”. Não é possível fazer secções múltiplas da mesma artéria carótida, pois trata-se de um vaso relativamente curto, justificando a necessidade das três repetições.

4.4.1 Coleta de tecidos

Para coleta das artérias carótidas, os animais foram eutanasiados por sangria sob anestesia geral com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), pela via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram perfundidos por perfuração cardíaca com tampão fosfato-salino (PBS) 10mM sob pressão constante (70mmHg) por três minutos e, posteriormente, com solução tamponada de paraformaldeído (PFA) 4%. Depois disso, foi feita toracotomia para exposição e

retida do pescoço, com posterior dissecação para remoção da cervical, mantendo as artérias carótidas e tecidos circundantes. Para os experimentos de histologia, após a perfusão com PBS e PFA, as amostras foram embebidas em PFA 4% para inclusão em parafina e posterior microtomia. Para os experimentos de imunofluorescência, os animais foram eutanasiados como descrito anteriormente e apenas as artérias carótidas foram isoladas e dissecadas e, posteriormente, colocadas em meio para congelamento de tecidos (Tissue-Tek OCT Compound; Sakura®, USA) e imediatamente congeladas.

4.5 Análises morfológicas das artérias carótidas

Uma vez coletadas, as amostras foram retiradas e lavadas em solução fisiológica e imediatamente fixadas em PFA 4% por 24 horas. Após desidratação em álcool, as amostras foram incluídas em parafina e cortadas transversalmente em micróto mo em secções de 4 µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para determinação de parâmetros estruturais.

Os cortes foram fotografados utilizando microscópio de luz branca (Axio Scope.A1, Carl Zeiss) acoplado à uma câmera digital. As imagens foram obtidas pelo programa ZEN Lite, em um aumento de 200x e, posteriormente analisadas usando o programa ImageJ (NIH - National Institutes of Health). Para a análise morfométrica, as camadas das artérias foram consideradas círculos perfeitos e foram aplicadas fórmulas geométricas. O valor do perímetro foi obtido pelo programa por seleção das lâminas elásticas interna e externa, e da borda do lúmen (Figura 8). As espessuras foram determinadas pelo cálculo do raio do círculo ($R=P/2\pi$) e, a partir deste, foram determinadas as áreas ($A= \pi r^2$). A camada média está compreendida entre as lâminas elástica externa e interna. A camada íntima ou neoíntima entre a lâmina elástica interna e a borda do lúmen (Figura 8). Assim, a partir das áreas compreendidas pela lâmina elástica externa (ALEE), lâmina elástica interna (ALEI) e borda lúmen (AL), foram feitas subtrações para determinação das áreas de secção transversais totais ($AT= ALEE-AL$), área da camada média ($ALEE-ALEI$) e área da camada neoíntima ($ALEI - AL$). Semelhantemente, para determinar a espessura, os raios totais (ET), da camada média (ECM) e da camada neoíntima (ECN) foram dados pela

subtração do raio do círculo interno à camada de interesse. O raio do lúmen (RL) corresponde à medida da espessura da luz do vaso.

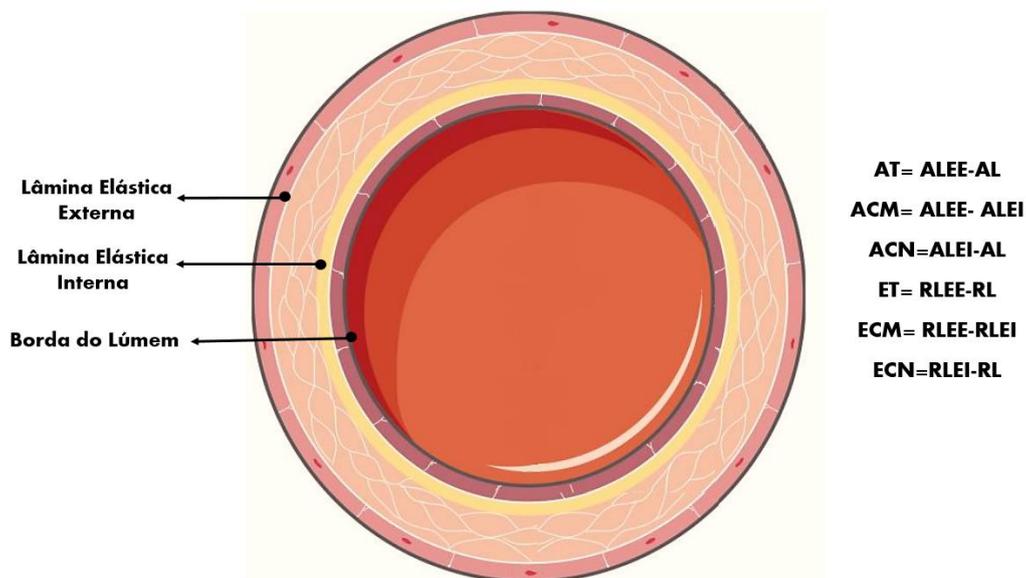


Figura 8: Representação esquemática do corte transversal da artéria carótida e fórmulas dos parâmetros morfométricos. Perímetro da lâmina elástica externa, círculo delimitado pela linha branca; Perímetro da lâmina elástica interna, círculo delimitado pela linha amarela; Perímetro do lúmen, círculo delimitado pela linha cinza.

4.6 Análise funcional do segmento estenótico por laser doppler “*single point*”

A fim de confirmar os dados morfológicos, a extensão da estenose foi determinada funcionalmente por laser doppler (moorLDI, software version 5.3). Para tanto, foi feita a análise “*single point*”, que em vez de escanear uma área como é feito tradicionalmente, consiste em incidir o laser em um ponto fixo (*single point analysis*), que capta o fluxo sanguíneo local conforme a concentração de hemácias. Inicialmente, os animais foram anestesiados como descrito anteriormente, e foi feita uma incisão à altura da traqueia para exposição e isolamento da artéria carótida comum esquerda. Em seguida, o laser foi posicionado próximo à bifurcação da artéria, durante dez minutos à 20 Hz. Deste modo, o fluxo registrado é uma medida indireta do estreitamento do segmento de artéria no qual o laser foi posicionado (antes da amarração).

4.7 Imunomarcção de COX-1 e COX-2 nas camadas arteriais

Para avaliar a presença das enzimas COXs na estenose e o efeito dos tratamentos, os cortes congelados foram incubados com anticorpos primários para cada uma das isoformas: anti-COX-1 (diluição 1:100, rabbit polyclonal, SC7950, Santa Cruz) e anti-COX-2 (diluição 1:100, rabbit polyclonal, SC7951, Santa Cruz), *overnight*, em câmara úmida e escura, e posteriormente as lâminas foram lavadas três vezes com PBS por dez minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo vermelho Alexa 594 (diluição 1:200, A11037, Santa Cruz), nas mesmas condições explicadas anteriormente. Logo depois, os cortes foram incubados com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI), um marcador fluorescente azul de núcleo (diluição 1:500), durante 10 minutos e posteriormente lavados com PBS. Através de um microscópio de fluorescência (Axio Scope.A1, Carl Zeiss) acoplado a uma câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram fotografadas no aumento de 200x. As concentrações relativas de COXs foram vistas como intensidade de fluorescência vermelha emitida corrigida pela área total do vaso (para evitar que os valores fossem superestimados pela hipertrofia), e foram quantificadas através do programa ImageJ (NIH - National Institutes of Health).

4.8 Avaliação do estresse oxidativo

Para investigação da produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) vasculares, foi utilizada a sonda di-hidroetidina (DHE, Sigma Aldrich, D7008) que reage com o ânion superóxido levando à formação de 2-hidroxi-etídeo e de etídeo, produtos que intercalam ao DNA e emitem fluorescência vermelha no núcleo celular. Inicialmente as criossecções foram incubadas com uma solução permeabilizante de Triton X-100 a 1% durante 10 minutos. Depois disso, as artérias foram incubadas com a solução de DHE (10^{-5} M) na estufa a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS por cinco minutos. Para montagem das lâminas, foi utilizado glicerol 60% para conservação do tecido e da fluorescência. Através de um microscópio de fluorescência (Axio Scope.A1, Carl Zeiss) acoplado a uma câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram registradas no aumento de 400x. As concentrações

de EROs encontradas nos tecidos foram vistas por emissão de fluorescência vermelha, e quantificada pelo programa ImageJ (NIH - National Institutes of Health).

4.9 Análise dos níveis de Óxido Nítrico (NO)

Para determinação da produção de NO nas artérias carótidas, foi utilizada a sonda DAF-FM (diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína; Invitrogen, Carlsbad, USA) que, quando nitrada, forma a triazolofluoresceína (DAF2T), um produto altamente fluorescente. Inicialmente as crio-seções foram incubadas com uma solução permeabilizante de Triton X-100 a 1% durante dez minutos. Em seguida, as artérias foram incubadas com a solução de DAF (10^{-5} M) na estufa a 37°C durante 30 minutos. Depois disso, os cortes foram lavados três vezes com PBS por cinco minutos. Para montagem das lâminas, foi utilizado glicerol 60% para conservação do tecido e da fluorescência. Através de um microscópio de fluorescência (Axio Scope.A1, Carl Zeiss) acoplado a uma câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram registradas no aumento de 400x. Os níveis de NO observados nos tecidos foram vistos por emissão de fluorescência verde, e quantificada pelo programa ImageJ (NIH - National Institutes of Health).

4.10 Expressão de MMP-2 e atividade gelatinolítica por zimografia *in situ*

Para determinação dos níveis de MMP-2 e colocalizar a atividade gelatinolítica *in situ*, as artérias carótidas foram incubadas com DQ *gelatin* (diluição 1:100, D-12060, Molecular Probes), utilizada como substrato fluorescente, durante 1 hora em temperatura ambiente e posteriormente lavados com PBS. Em seguida, os cortes de carótidas foram fixados com acetona (PA) por 10 minutos e incubados com anticorpo primário para MMP-2, anti-MMP-2 (diluição 1:20, MAB13405, Milipore) por uma hora, em câmara úmida e escura, em temperatura ambiente, e posteriormente lavados com PBS. Depois disso, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário Alexa Fluor 568 (diluição 1:200, A11004, Santa Cruz), por 1 hora nas mesmas condições citadas acima. Para montagem das lâminas, foi utilizado glicerol 60% para conservação do

tecido e da fluorescência. Através de um microscópio de fluorescência (Axio Scope.A1, Carl Zeiss) acoplado a câmera fotográfica, os cortes das artérias carótidas foram fotografadas em aumento de 400x. A atividade gelatinolítica da MMP-2 foi vista como intensidade de fluorescência verde emitida e os níveis de MMP-2 foram vistos como intensidade de fluorescência vermelha. Para quantificação da expressão de MMP-2 e sobreposição com sua atividade gelatinolítica foi utilizado o Programa ImageJ (NIH - National Institutes of Health).

Para confirmar a especificidade da atividade da gelatinase, cortes foram pré-incubados com Fenantrolina (inibidor de metaloproteinasas, 1 mM) e PMSF (inibidor de serino e cisteíno-proteases, 1 mM) e usados como controles. A Fenantrolina causou um efeito notório sobre a degradação de gelatina, enquanto o PMSF causou efeito desprezível, o que confirma a especificidade da degradação da sonda (gelatina) por metaloproteinasas.

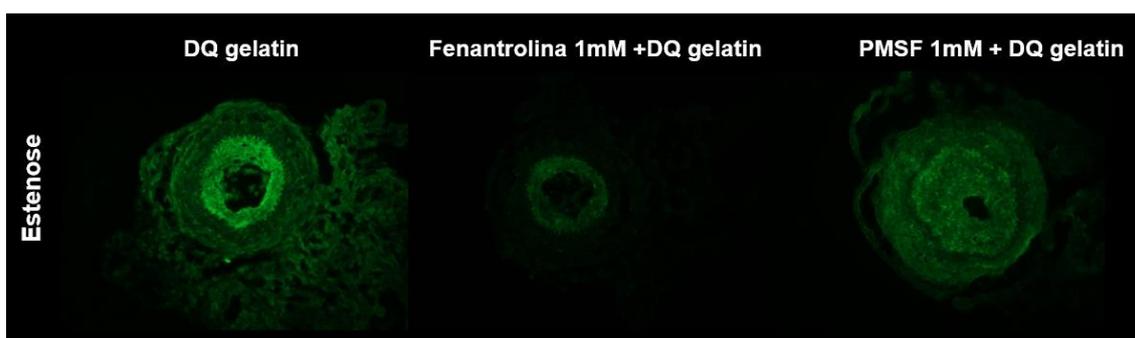


Figura 9: Ensaio da seletividade da atividade gelatinolítica por metaloproteinase. Fotomicrografias ilustrativas de cortes transversais das artérias carótidas pré-incubadas com Fenantrolina e PMSF com aumento de 200x. A pré-incubação com Fenantrolina reduziu a atividade das gelatinases, enquanto o PMSF apresentou pouco efeito.

4.11 Análise estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente utilizando a análise de variância (ANOVA) de um fator, seguida pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média seguida de erro padrão da média (média \pm E.P.M.) e considerados significativamente diferentes quando valores de $p < 0,05$.

5. Resultados

As medidas da pressão arterial sistólica ao longo dos 21 dias foram semelhantes entre os quatro grupos experimentais ($P > 0,05$; figura 10A). Não foram observadas diferenças significativas nos valores de pressão arterial entre os camundongos do grupo sham e estenose ao final do estudo. Além disso, os tratamentos não promoveram alterações nesses valores ($P > 0,05$; figura 10A).

A

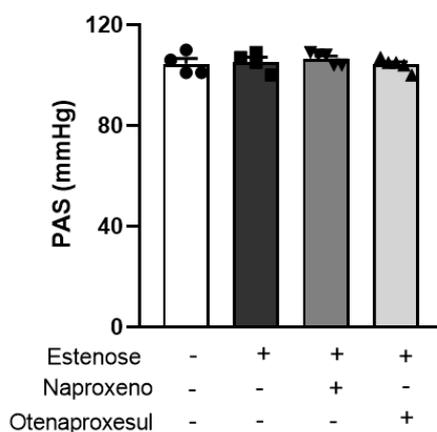


Figura 10: Efeito da estenose e dos tratamentos sobre a pressão arterial sistólica (PAS). Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos nas medidas da PAS, em mmHg (A) ao final do protocolo (N= 4-7; $P > 0,05$, One Way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey).

A estenose da artéria carótida é acompanhada de alterações morfológicas vasculares expressivas. Como observado na figura 11, a oclusão da artéria carótida causou remodelamento vascular visto pelo espessamento da parede arterial e estreitamento da luz arterial. Claramente, o Otenaproxesul preveniu as alterações morfológicas de forma mais eficaz se comparado ao Naproxeno.

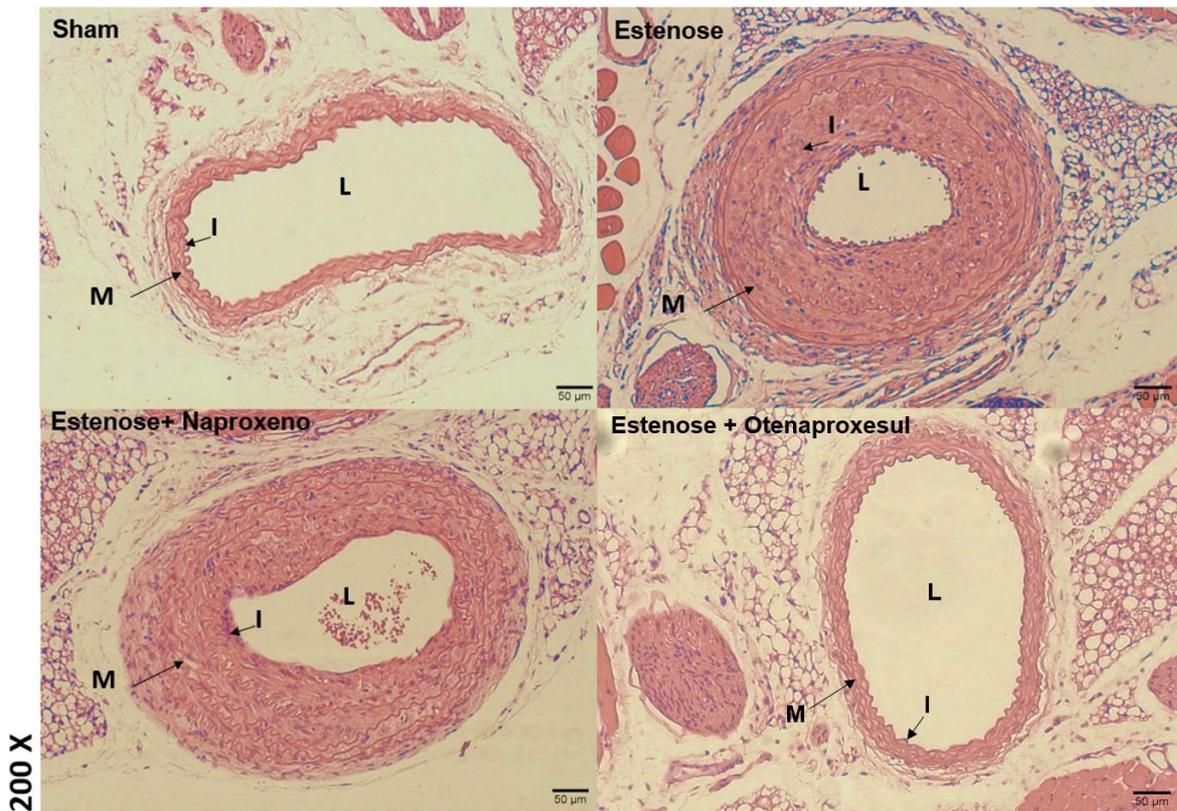


Figura 11: Efeito do tratamento local com Naproxeno e Otenaproxesul sobre a estenose. Fotomicrografias ilustrativas de cortes transversais das artérias carótidas coradas em H&E com aumento de 200x. L- Lúmen; I- Íntima; M- Média.

Foi observado um aumento na área (em μm^2 : sham= 9.119 ± 634 x estenose= 27.688 ± 3.412 ; $P < 0,001$) e espessura (em μm : sham= $12,8 \pm 0,5$ x estenose= $54,8 \pm 5,3$; $P < 0,0001$) totais das artérias carótidas submetidas à estenose em relação às artérias do grupo sham (Figura 12A e B). O tratamento com o Naproxeno não levou à nenhuma alteração dos parâmetros. Os animais tratados com Otenaproxesul apresentaram uma redução, na área total (em μm^2 : estenose= 27.688 ± 3.412 x Otenaproxesul= 14.611 ± 1.656 ; $P < 0,05$) e na espessura total (em μm : estenose= $54,8 \pm 5,3$ x Otenaproxesul= $24,0 \pm 2,8$; $P < 0,0001$) em relação aos animais que não receberam tratamento.

Para caracterizar a hipertrofia vascular, as camadas média e íntima foram quantificadas separadamente, bem como o lúmen vascular. Quanto à camada média, não foi observada diferença significativa das artérias carótidas submetidas à estenose em relação às artérias do grupo sham (Figura 12C e D;

$P > 0,05$). O tratamento com o Naproxeno exacerbou o espessamento (dados da espessura) e a hiperplasia da área da camada média (dados da área) induzidos pela estenose. Os animais tratados com Otenaproxesul não apresentaram diferenças em relação aos animais que não receberam tratamento.

Junto a isso, houve um aumento da proliferação celular na camada íntima das artérias carótidas dos camundongos submetidos à cirurgia de estenose em relação aos camundongos do grupo sham, caracterizando hiperplasia neointimal. A neointima nos animais submetidos à estenose foi visível ao final do 21º dia, representado pelo aumento da área (em μm^2 : sham= 548 ± 125 x estenose= 15.889 ± 2.770 ; $P < 0,0001$) e espessura da camada íntima (em μm : sham= $0,7 \pm 0,2$ x estenose= $35,6 \pm 5,5$; $P < 0,0001$), que correspondem aos principais determinantes de remodelamento vascular neste modelo (Figura 12E e F). No grupo que recebeu tratamento com Naproxeno, foi observado uma redução significativa apenas na espessura (em μm : estenose= $35,6 \pm 5,5$ x Naproxeno= $14,3 \pm 6,4$; $P < 0,001$), e não da área da camada neointima em comparação com o grupo estenose. De maneira interessante, a formação da camada neointima foi abolida com o tratamento com Otenaproxesul nas artérias carótidas submetidas à estenose (Figura 12E e F).

O aumento do número de células na camada neointima levam à redução das dimensões do lúmen das artérias. Assim, as figuras 12G e H mostram que a estenose das artérias carótidas foi associada à redução significativa da área (em μm^2 : sham= 36.757 ± 2.081 x estenose= 8.878 ± 830 ; $P < 0,0001$) e raio (em μm : sham= $108 \pm 3,1$ x estenose= $52 \pm 5,2$; $P < 0,0001$) do lúmen em relação ao grupo sham. O tratamento com o Naproxeno reverteu parcialmente o estreitamento do lúmen, o que foi observado pela diferença significativa apenas do raio (em μm : estenose= $52 \pm 5,2$ x naproxeno= $69 \pm 5,8$; $P < 0,05$), mas não da área em comparação ao grupo estenose. Os camundongos submetidos à cirurgia de estenose e tratados com Otenaproxesul apresentaram reversão do estreitamento luminal das artérias carótidas, mostrando uma prevenção da redução da área (em μm^2 : estenose= 8.878 ± 830 x Otenaproxesul= 23.167 ± 2.049 ; $P < 0,001$) e raio (em μm : estenose= $52 \pm 5,2$ x Otenaproxesul= $85,3 \pm 3,6$; $P < 0,0001$) do lúmen em relação ao grupo estenose (Figura 12G e H).

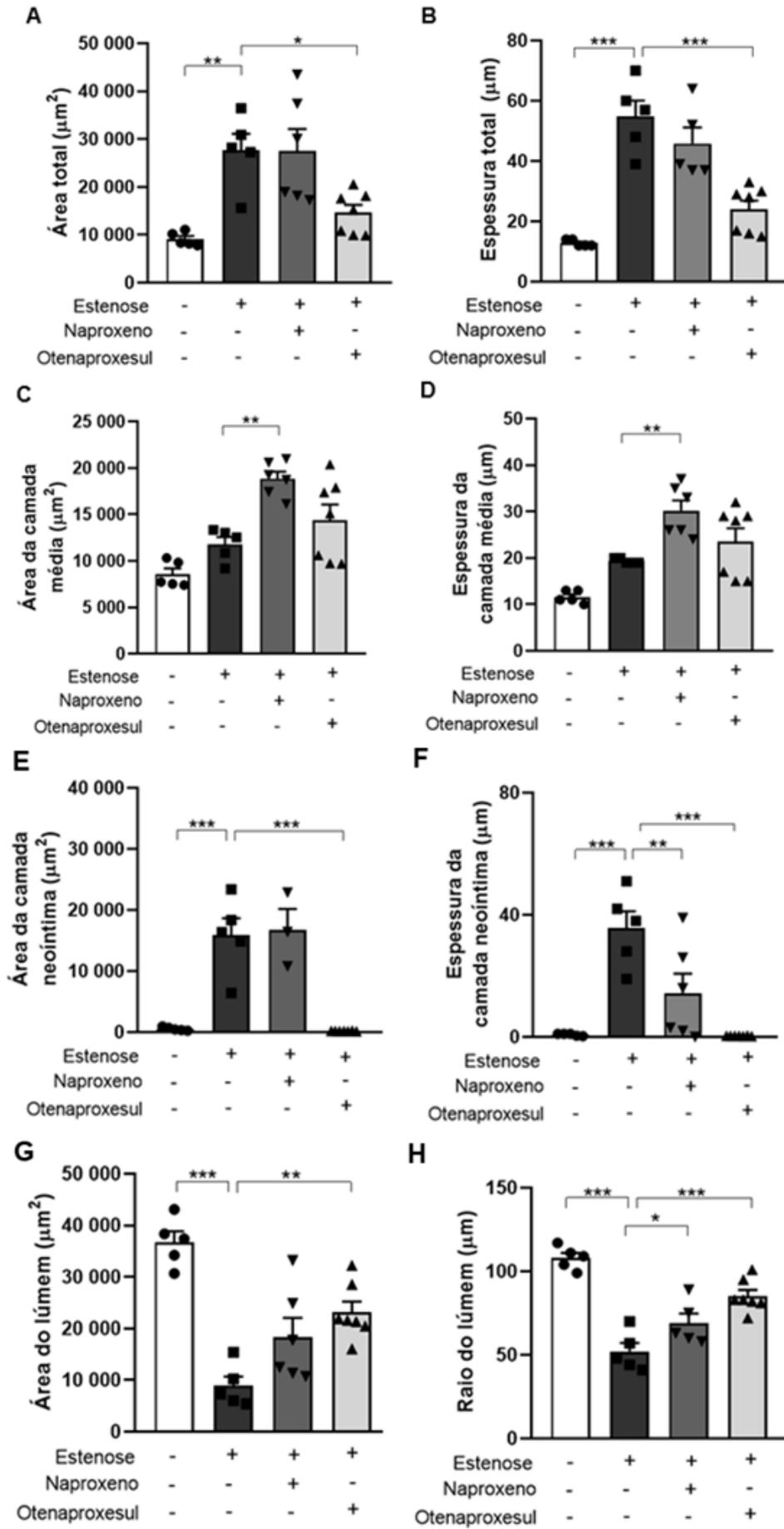


Figura 12: Efeito do tratamento com Naproxeno e Otenaproxesul sobre as alterações morfológicas das artérias carótidas. Gráfico da área total (A), em μm^2 , e espessura total (B), em μm , área da camada média (C), em μm^2 , e espessura da camada média (D), em μm , área da camada neoíntima (E), em μm^2 , e espessura da camada neoíntima (F), em μm , área do lúmen (G), em μm^2 , e raio do lúmen (H), em μm , das artérias carótidas ocluídas e não ocluídas. Os parâmetros de área e espessura totais foram aumentados no grupo estenose e reduzidos apenas no grupo tratado com Otenaproxesul. O tratamento local com o Naproxeno demonstrou um aumento tanto na área quanto na espessura da camada média. O Naproxeno reduziu a espessura da camada neoíntima e nenhuma camada neoíntima quantificável foi encontrada no grupo Otenaproxesul. O Naproxeno reduziu parcialmente o estreitamento luminal e foi reduzido consideravelmente pelo tratamento com Otenaproxesul. (N= 5-7). *P<0,05; **P<0,001; ***P<0,0001, todos *versus* grupo estenose. One Way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

O remodelamento induzido pela estenose reduz a passagem de sangue pelas áreas remodeladas das artérias carótidas. A figura 13 demonstra uma redução significativa da perfusão sanguínea na região anterior à amarradura das artérias do grupo estenose se comparadas ao grupo sham (em unidades arbitrárias (UA): sham= 731,1 ± 75,7 x estenose= 379,4 ± 35,2; P<0,05). Essa redução é associada principalmente à diminuição do lúmen das artérias carótidas estenosadas. Apenas nos animais com estenose tratados com Otenaproxesul houve uma restauração da perfusão sanguínea na área pré-obliterada (em UA: estenose=379,4 ± 35,2 x Otenaproxesul =723,0 ± 83,2; P<0,05).

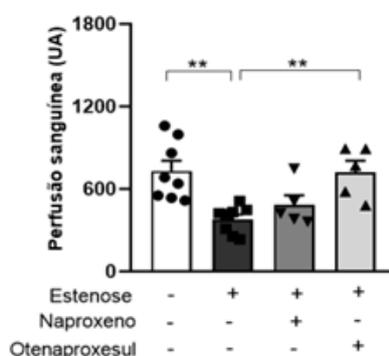
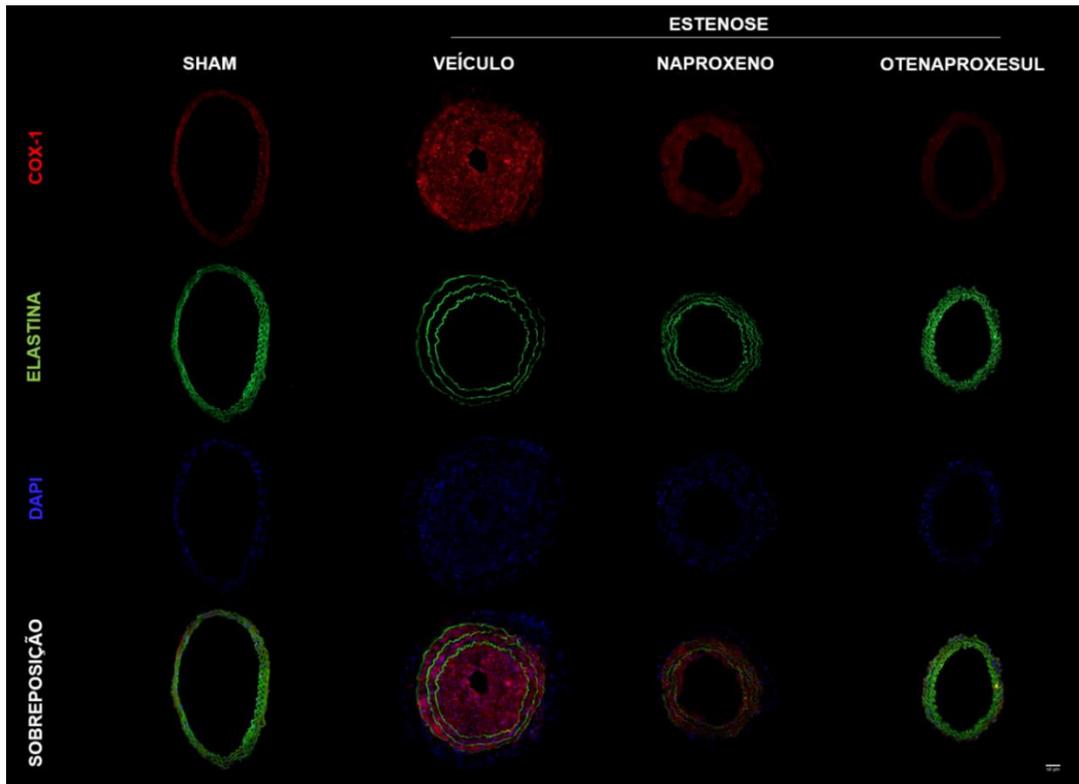


Figura 13: Efeito do tratamento local com Naproxeno e Otenaproxesul sobre a perfusão sanguínea local das artérias carótidas ocluídas e não ocluídas determinadas por laser doppler *single point*. A estenose da artéria carótida reduziu o fluxo sanguíneo local, e foi aumentado ao ser tratado com Otenaproxesul (N= 5-8). *P<0,05 versus grupo estenose. One Way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

Uma vez que componentes inflamatórios, como as COXs, apresentam um papel importante no processo de remodelamento arterial na estenose, e que o Naproxeno e o Otenaproxesul atuam inibindo essas enzimas, foi realizada a detecção de COX-1 e COX-2 nas artérias carótidas. Como as análises de imunofluorescência mostram (Figura 14A), a imunomarcaçã de COX-1 foi significativamente aumentada nas artérias carótidas do grupo estenose se comparadas ao grupo sham (em intensidade de fluorescência/ μm^2 : sham= 589 ± 131 x estenose= 7.773 ± 1.070; P<0,001). O tratamento com Naproxeno reduziu a fluorescência para COX-1 (em intensidade de fluorescência/ μm^2 : estenose= 7.773 ± 1.070 x Naproxeno= 2.530 ± 182; P<0,0001) após os 21 dias

de estudos. Os camundongos tratados com Otenaproxesul também apresentaram uma fluorescência para COX-1 claramente menor (em intensidade de fluorescência/ μm^2 : estenose= 7.773 ± 1.070 x Otenaproxesul= 1.316 ± 178 ; $P < 0,001$) das artérias carótidas em relação ao grupo estenose.

A



B

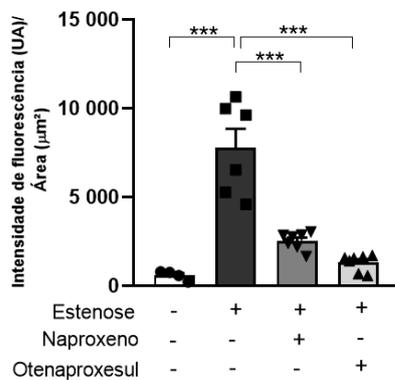
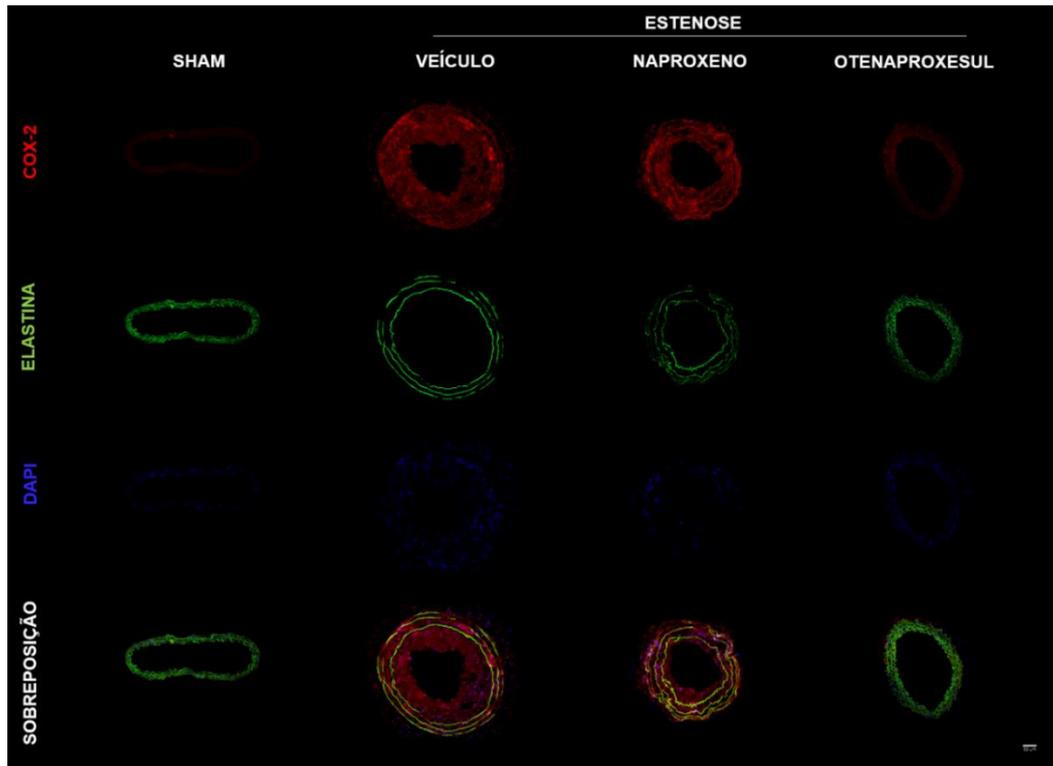


Figura 14: Efeito dos tratamentos locais com Naproxeno e Otenaproxesul sobre a marcação para COX-1 vascular. (A) Fotomicrografias ilustrativas em aumento de 200x da fluorescência vermelha, resultante da detecção de COX-1, autofluorescência da elastina em verde, e núcleos marcados com DAPI em azul. (B) Quantificação da intensidade de fluorescência presente nas artérias carótidas. A estenose foi acompanhada de aumento da COX-1, que foi reduzido pelos tratamentos (N= 6-7). ***P<0,0001, todos *versus* grupo estenose. One Way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

A imunomarcção para COX-2 foi significativamente aumentada nas artérias carótidas do grupo estenose se comparadas ao grupo sham (em intensidade de fluorescência/ μm^2 : sham= $2.529 \pm 381,9$ x estenose= 18.986 ± 1.887 ; $P < 0,001$, figura 15A e B). O tratamento com Naproxeno não promoveu alteração da imunomarcção para COX-2 em comparação com o grupo estenose. As artérias dos camundongos tratados com Otenaproxesul apresentaram fluorescência para COX-2 reduzida (em intensidade de fluorescência/ μm^2 : estenose= 18.986 ± 1.887 x Otenaproxesul= 6.717 ± 1.007 ; $P < 0,001$, figura 15A e B) em relação ao grupo estenose.

A



B

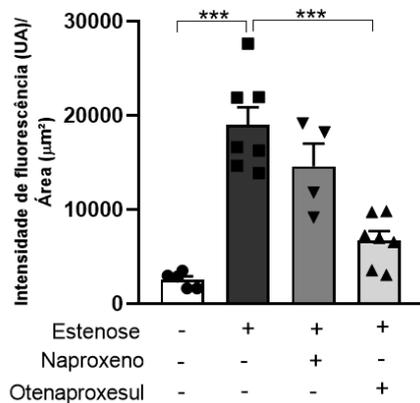
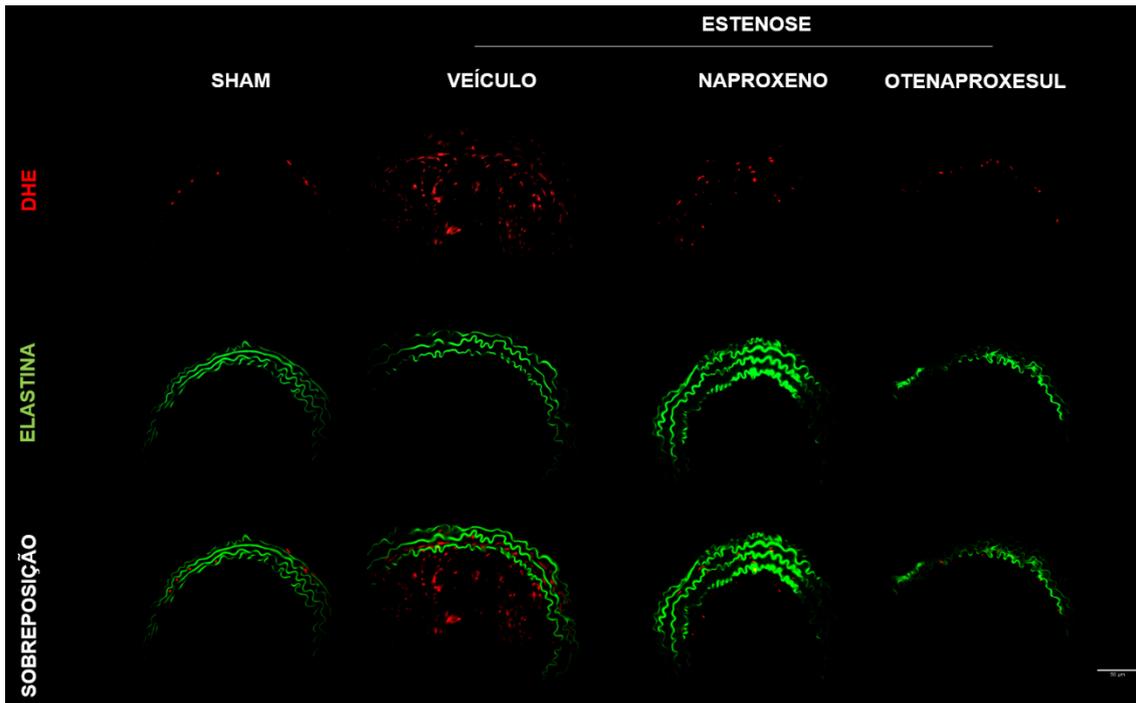


Figura 15: Efeito dos tratamentos locais com Naproxeno e Otenaproxesul sobre a marcação para COX-2 vascular. (A) Fotomicrografias ilustrativas em aumento de 200x da fluorescência vermelha, resultante da detecção de COX-2, autofluorescência da elastina em verde, e núcleos marcados com DAPI em azul (B) Quantificação da intensidade de fluorescência presente nas artérias carótidas. A estenose foi acompanhada de aumento da COX-2, que foi reduzida apenas com o tratamento com Otenaproxesul (N= 6-7). *** $P < 0,0001$, todos *versus* grupo estenose. One Way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

Dado que o Otenaproxesul possui importantes efeitos antioxidantes (Mostafa *et al.*, 2016), foi analisado o efeito dos tratamentos sobre o estresse oxidativo vascular associado à estenose (Figura 16A). Observou-se um aumento significativo das concentrações de EROs nas artérias carótidas dos camundongos submetidos à estenose se comparados ao grupo sham (em intensidade de fluorescência/ μm^2 : sham= 86 ± 5 x estenose= 9.070 ± 2.574 ; $P < 0,0001$, figura 16B). O tratamento com Naproxeno atenuou significativamente os níveis de EROs (em intensidade de fluorescência/ μm^2 : estenose= 9.070 ± 2.574 x Naproxeno= 1.918 ± 286 ; $P < 0,05$, figura 16B). Já o tratamento com Otenaproxesul reduziu drasticamente as concentrações de EROs nas artérias carótidas em relação ao grupo estenose (em A intensidade de fluorescência/ μm^2 : estenose= 9.070 ± 2.574 x Otenaproxesul= 375 ± 15 ; $P < 0,001$, figura 16B).

A



B

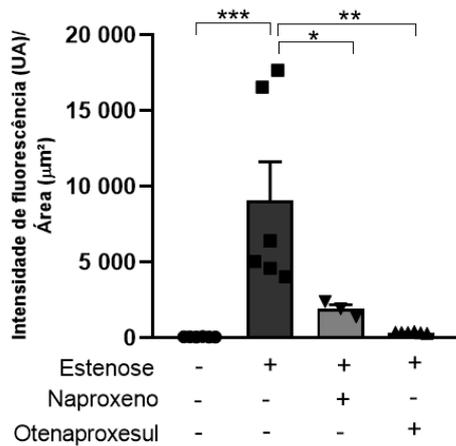
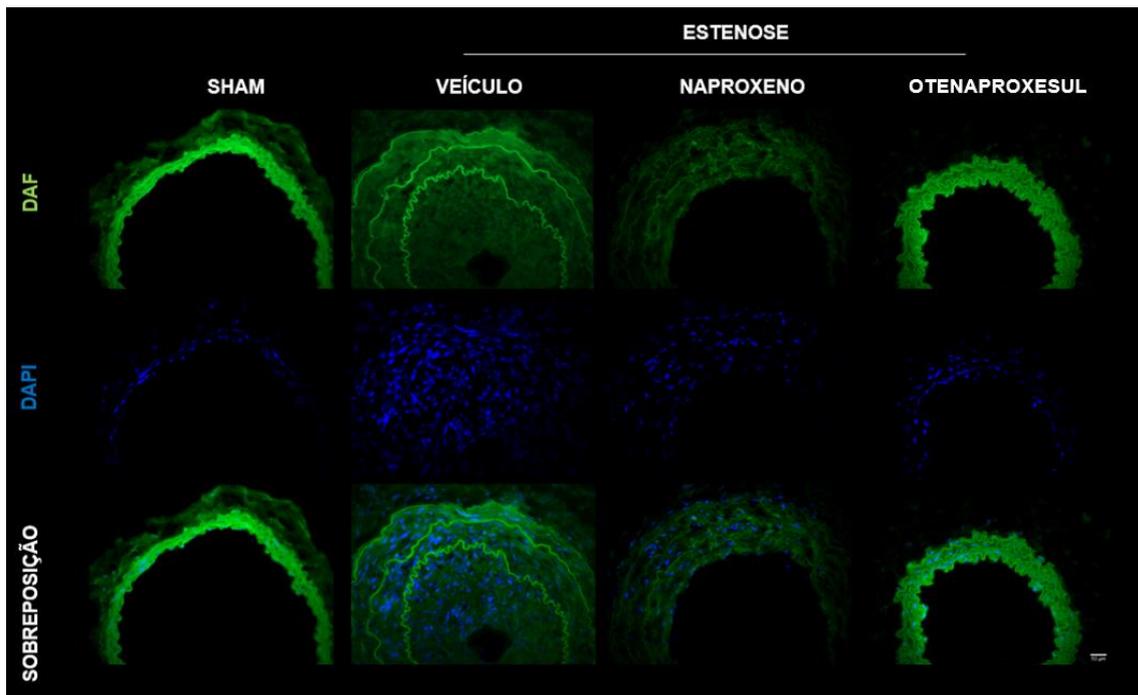


Figura 16: Efeito do tratamento local com Naproxeno ou Otenaproxesul sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) vasculares. (A) Fotomicrografias ilustrativas em aumento de 400x da fluorescência vermelha, resultante dos produtos da reação do DHE com ânion superóxido e autofluorescência da elastina em verde. Quantificação da intensidade de fluorescência presente nas artérias carótidas (B). A estenose promoveu aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio, que foi reduzido por ambos os tratamentos (N= 3-7). *P<0,05, **P<0,001; ***P<0,0001, todos *versus* grupo estenose. One Way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

Existe um “*cross talk*” entre as vias de sinalização do H₂S e do NO na regulação do tônus vascular. Em condições patológicas, a síntese de H₂S endógeno é reduzida, resultando em profundo estresse oxidativo e diminuição de cofatores importantes para a síntese de NO. Como consequência disso, ocorre o desacoplamento da eNOS, o que leva a redução da biodisponibilidade de NO exacerbando a disfunção vascular (Altaany *et al.*, 2013). Dessa forma, nós avaliamos como estariam os níveis de NO na hiperplasia neointimal e após os tratamentos, visto que em lesões vasculares a biodisponibilidade do NO é reduzida. Foi observado que a oclusão da artéria carótida levou à uma redução dos níveis de NO no grupo estenose em comparação com o grupo sham (em intensidade de fluorescência/ μm^2 : sham= 5.017 ± 285 x estenose= 2.620 ± 536 ; $P < 0,001$, figura 17B). O tratamento com Naproxeno não apresentou diferença significativa nos níveis de NO (em intensidade de fluorescência/ μm^2 : estenose= 2.620 ± 536 x Naproxeno= 2.583 ± 151 ; figura 17B). Já o tratamento com Otenaproxesul foi capaz de restituir os níveis de NO (em intensidade de fluorescência/ μm^2 : estenose= 2.620 ± 536 x Otenaproxesul= 3.917 ± 157 ; $P < 0,05$, figura 17B).

A



B

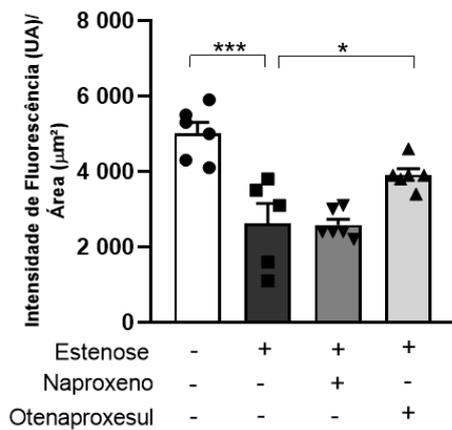
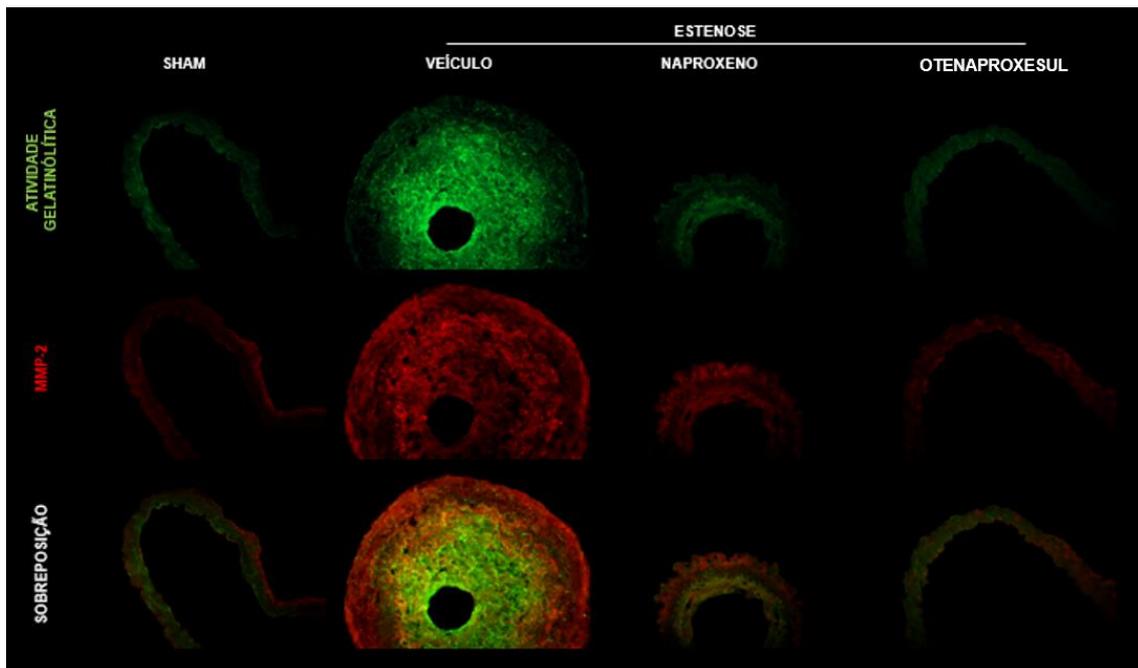


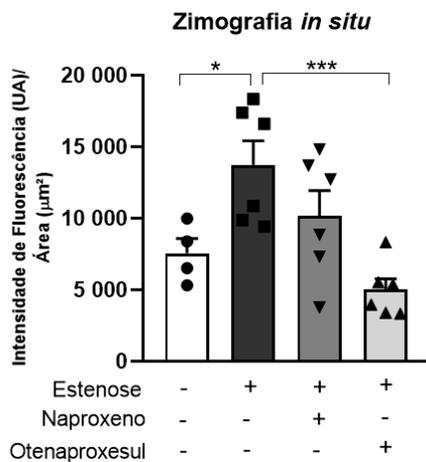
Figura 17: Efeito do tratamento local com Naproxeno ou Otenaproxesul sobre os níveis vasculares de Óxido Nítrico (NO). (A) Fotomicrografias ilustrativas em aumento de 400x da fluorescência verde, resultante da nitração do DAF e núcleos marcados com DAPI em azul. (B) Quantificação da intensidade de fluorescência presente nas artérias carótidas. A estenose promoveu redução dos níveis de NO, que foi restituído com o tratamento com Otenaproxesul (N= 5-6). * $P < 0,05$; *** $P < 0,0001$, todos *versus* grupo estenose. One Way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

A MMP-2 tem papel importante durante o processo de remodelamento vascular que ocorre na hiperplasia neointimal (Johnson e Galis, 2004; Newby, 2006). Dessa forma, foi realizada a análise do efeito dos tratamentos com Naproxeno e Otenaproxesul sobre a expressão e atividade gelatinolítica dessa enzima. Foi observado um aumento significativo da atividade e expressão de MMP-2 das artérias carótidas dos camundongos submetidos à estenose se comparados ao grupo sham (atividade gelatinolítica, em intensidade de fluorescência/ μm^2 : sham= 7.562 ± 1.030 x estenose= 13.749 ± 1.745 ; $P < 0,05$, figura 18B; MMP-2, em intensidade de fluorescência/ μm^2 : sham= 7.142 ± 721 x estenose= 12.583 ± 1.361 ; $P < 0,05$, figura 18C). O tratamento com Naproxeno não apresentou diferença significativa na atividade e expressão de MMP-2 (atividade gelatinolítica, em intensidade de fluorescência/ μm^2 : estenose= 13.749 ± 1.745 x Naproxeno = 10.199 ± 1.745 x; $P < 0,05$, figura 18B; MMP-2, em intensidade de fluorescência/ μm^2 : estenose= 12.583 ± 1.361 x Naproxeno= 11.535 ± 1.388 ; $P < 0,05$, figura 18C). Já o tratamento com Otenaproxesul reduziu significativamente a atividade e expressão de MMP-2 nas artérias carótidas em relação ao grupo estenose (atividade gelatinolítica, em intensidade de fluorescência/ μm^2 : estenose= 13.749 ± 1.745 x ATB-346= 5.006 ± 773 ; $P < 0,0001$, figura 17B; MMP-2, em intensidade de fluorescência/ μm^2 : estenose= 12.583 ± 1.361 x Otenaproxesul= 7.669 ± 1.166 ; $P < 0,05$, figura 18C).

A



B



C

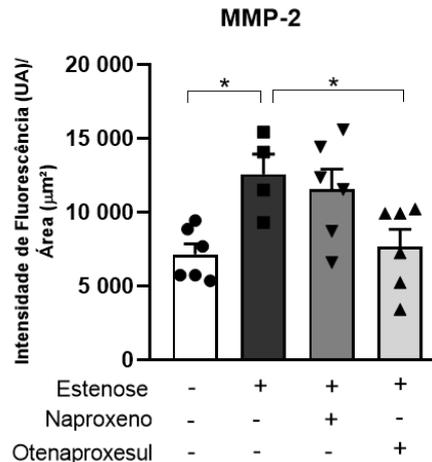


Figura 18: Efeito do tratamento local com Naproxeno ou Otenaproxesul sobre a atividade gelatinolítica *in situ* e marcação para MMP-2 por imunofluorescência nas artérias carótidas. (A) Fotomicrografias ilustrativas em aumento de 400x da fluorescência verde, que reflete a degradação da DQ gelatina por gelatinase (atividade gelatinolítica), e da imunomarcagem de MMP-2, em vermelho, e sua colocalização (sobreposição). (B) Quantificação da atividade gelatinolítica das artérias carótidas, representada pela fluorescência verde. (C) Quantificação da detecção de MMP-2 nas artérias carótidas, representada pela fluorescência vermelha. A estenose promoveu aumento de ambos os parâmetros, que foi restituído apenas pelo tratamento com Otenaproxesul (N= 5-6). * $P < 0,05$; *** $P < 0,0001$, todos *versus* grupo estenose. One Way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

6. Discussão

O Otenaproxesul é um novo fármaco anti-inflamatório que possui dois mecanismos de ação principais: supressão de COX e liberação de H₂S. Este estudo fornece evidências inéditas sobre o tratamento local do Otenaproxesul, comparando seu efeito com sua droga protótipo, o Naproxeno, em um modelo de reestenose induzido por oclusão da artéria carótida. Os efeitos do Naproxeno sobre os parâmetros estruturais foram sutis e não foram revertidos em melhora da perfusão sanguínea local. Por outro lado, o Otenaproxesul reverteu totalmente a hiperplasia neointimal e restaurou a perfusão sanguínea local à um nível significativo. Do ponto de vista molecular, o Naproxeno e o Otenaproxesul apresentaram efeitos comuns na redução dos níveis de COX-1 sobre a redução das EROs. Por outro lado, apenas o Otenaproxesul reduziu os níveis de COX-2, de MMP-2 e sua atividade gelatinolítica, restaurou a biodisponibilidade de NO, e aboliu o estresse oxidativo. Isso sugere o envolvimento do H₂S sobre a modulação desses mediadores da hiperplasia intimal.

Sabe-se que as alterações estruturais que ocorrem na reestenose correspondem à uma limitação de cirurgias vasculares devido ao desenvolvimento da hiperplasia neointimal e redução progressiva do lúmen arterial. Esse quadro gera grande impacto sobre os encargos financeiros dos serviços hospitalares, pois para tratá-lo são necessárias novas intervenções percutâneas ou cirurgias de revascularização. Dessa forma, a sua prevenção é de grande importância, pois ao reduzir as taxas de reestenose, os gastos sobre o sistema de saúde também são reduzidos.

Para realização do nosso estudo, nós utilizamos um modelo animal de lesão arterial induzido por cessação do fluxo sanguíneo local em artérias carótidas. Existem vários modelos que permitem o estudo da hiperplasia neointimal, entretanto, nós optamos por utilizar esse modelo devido sua fácil reprodutibilidade e por mimetizar o processo de reestenose que ocorre em humanos. Foi demonstrado pela literatura que há uma progressão da lesão arterial *in vivo* ao longo do 3^o, 7^o, 14^o, 21^o e 28^o dia após a ligadura da artéria carótida. Porém entre o 21^o e 28^o dia, não foi observada nenhuma diferença na

razão íntima/média, mostrando que o pico de proliferação celular da camada neoíntima ocorre nesse período crítico (Godin *et al.*, 2000).

Baseados em evidências de que as atuais drogas utilizadas em SF são eficazes apenas a curto prazo na prevenção da hiperplasia (Moses *et al.*, 2003; García-García *et al.*, 2006), estudos de novos fármacos para incorporação a SF são necessários. Nós levantamos a hipótese de que o Otenaproxesul poderia desempenhar um efeito local positivo sobre a redução da progressão da lesão vascular na estenose. Como o Naproxeno corresponde à sua droga protótipo, foi implementado um grupo experimental adicional tratado com o Naproxeno a fim de se obter um melhor entendimento sobre os efeitos do Otenaproxesul dependentes ou não da inibição das COX. Logo, os efeitos adicionais promovidos pelo Otenaproxesul em relação ao Naproxeno ocorrem provavelmente pela liberação da molécula H₂S.

Nós mostramos um espessamento da camada arterial no grupo de animais submetidos à ligadura da artéria carótida, acompanhado da formação da camada neoíntima, característica da reestenose. O remodelamento vascular encontrado com redução do lúmen arterial é causado pelo aumento do número de CMLVs como uma resposta adaptativa ao aumento do estresse hemodinâmico por grave redução do fluxo sanguíneo. Esses resultados confirmam os achados anteriores que mostram alterações semelhantes com pico de proliferação celular após 21 dias de cirurgia de oclusão da artéria carótida (Godin *et al.*, 2000). O espessamento da camada arterial levou à uma redução da perfusão sanguínea local. Tal resposta não é inesperada, pois o modelo experimental utilizado causa um fluxo sanguíneo turbulento que contribui para o remodelamento vascular. O tratamento com o Otenaproxesul melhorou a perfusão sanguínea local devido ao aumento do lúmen arterial, entretanto, nenhuma alteração foi observada pelo tratamento local com Naproxeno. Além disso, não foi observada nenhuma alteração na PAS nos grupos experimentais, logo, não há alteração hemodinâmica sistêmica que contribua para a progressão da estenose.

Vários estudos comprovam extensivamente a inibição de COXs pelo Naproxeno e Otenaproxesul (Flannigan *et al.*, 2013; Blackler *et al.*, 2014;

Blackler, De Palma, *et al.*, 2015; Blackler, Motta, *et al.*, 2015; Motta *et al.*, 2015). Em experimentos *in vivo*, foi observada uma inibição mais pronunciada de COX-2 pelo Otenaproxesul em comparação com o Naproxeno em doses equimolares (Wallace, 2010). Esse resultado também foi observado em estudos clínicos de Fase I, mostrando que o Otenaproxesul se mostrou mais potente na inibição de COX do que o Naproxeno, assim como na supressão da atividade de COX por um tempo mais prolongado (Wallace, Motta, *et al.*, 2018). Por outro lado, em um estudo clínico de Fase IIB, foi mostrado que tanto o Naproxeno quanto o Otenaproxesul produziram uma supressão marcante e comparável da atividade de COX (Wallace e Nagy, 2020).

Tanto a COX-1 quanto a COX-2 são expressas constitutivamente no endotélio e possuem papel importante na homeostasia vascular. Entretanto, em condições de lesão vascular, a expressão de ambas as isoformas pode ser desregulada, como por exemplo na reestenose (Yang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2012). Nossos achados estão de acordo com dados anteriores, onde observamos uma regulação positiva de ambas as enzimas após a oclusão da artéria carótida. O aumento da expressão de COX-1 e COX-2 na camada neointima de lesões vasculares não é surpreendente. A COX-2 é induzida por diversos componentes envolvidos na proliferação celular na reestenose, como fatores de crescimento, radicais livres e citocinas inflamatórias (Yang *et al.*, 2004; King *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2012).

Embora não tenhamos analisado efetivamente a atividade enzimática das COXs, observamos que a expressão das enzimas foi modulada negativamente pelas drogas. Os resultados mostram que a expressão de COX-1 foi atenuada pelo Naproxeno e pelo Otenaproxesul. Entretanto, os níveis de COX-2 foram reduzidos apenas pelo Otenaproxesul. Isso nos faz sugerir que as drogas também modulam fatores transcricionais envolvidos na expressão das COXs, como o NF- κ B que é um regulador da transcrição gênica de COX-2 (Lim *et al.*, 2001; Ramsay *et al.*, 2003), ou atuaram sobre genes envolvidos na transcrição de COX-1, como o *Ptgs1* (Kang *et al.*, 2007; Agundez *et al.*, 2014). O efeito exclusivo do Otenaproxesul sobre a COX-2, sugere que há envolvimento do H₂S. Embora os níveis de COXs tenham sido modificados pelas drogas, sugerimos

que parte dos efeitos sejam devidos à inibição da atividade destas enzimas. Esta sugestão é amparada pela literatura, uma vez que o tratamento por via sistêmica com Naproxeno e Otenaproxesul reduziu a atividade enzimática das COXs, visto pela redução de TXB₂ e PGE₂ (Wallace *et al.*, 2010), que são produtos estáveis do metabolismo de prostaglandinas.

Além do aumento da expressão de ambas as isoformas, conseqüentemente ocorre um aumento acentuado na síntese de prostanóides. Em especial, a PGE₂ e o TxA₂ são relevantes, pois são os principais produtos gerados em células do músculo liso vascular e em células inflamatórias. Foi relatado que a deleção de COX-2 ou do receptor para PGE₂, o EP3, reduz o desenvolvimento de neointima após lesão arterial em camundongos, vistos pela redução da migração de CMLVs por mecanismos ligados à via de sinalização da PI3K/Akt/GSK3β (Zhang *et al.*, 2013). Foi mostrado que o receptor EP3 também estimula a migração de outros tipos celulares, como as CMLs de vias aéreas. A supressão desse receptor reduz a formação de neointima, enquanto sua superexpressão em artérias levam ao aumento da neointima, sugerindo que a migração de CMLVs pode ser regulada por EP3 e que colabora para o remodelamento vascular em resposta à lesão vascular (Zhang *et al.*, 2013).

Foi sugerido que a COX-1 endotelial possui atividades paradoxais em artérias. Para investigar isso, um estudo utilizou camundongos *knockout* onde a COX-1 foi especificamente removida do endotélio, deixando os produtos da COX-1 de plaquetas e outras células intactos (Mitchell *et al.*, 2021). Como resultado, houve supressão dos prostanóides PGI₂, PGE₂ e TxA₂ em artérias aortas desses animais. A deleção endotelial da COX-1 impactou diretamente na função vascular de anéis aórticos, que ao serem estimulados com fenilefrina, um agente vasoconstritor, apresentaram vasoconstrição reduzida comparados às artérias de camundongos *knockout* global para COX-1. Isso sugere que os prostanóides produzidos endogenamente pelo endotélio das artérias contribuem para o tônus vascular e reduzem o limiar de vasoconstrição (Mitchell *et al.*, 2021). Além disso, foi avaliado se a COX-1 endotelial teria algum efeito sobre as alterações vasculares em modelo de aterosclerose. Para isso, foram utilizados animais duplo transgênicos, que são *knockout* para apolipoproteína E (ApoE) e

com deleção seletiva da COX-1 endotelial. Foi observado que a PGI₂ foi o prostanóide mais abundante gerado pela COX-1 endotelial e que a deleção de COX-1 endotelial limitou a formação de placas ateroscleróticas. Dessa forma, foi sugerido que os prostanóides derivados da COX-1 endotelial favorecem o desenvolvimento de doença aterosclerótica e que, apesar da ativação do receptor para prostaciclina, IP, ser protetora, na aterosclerose ocorre ativação de receptores TP e EP3 pela própria prostaciclina ou por outros prostanóides derivados do endotélio, como PGE₂ e tromboxano, que contribuem para o crescimento das placas ateroscleróticas (Mitchell *et al.*, 2021). Com esses achados, pode-se sugerir que, embora a COX-1 endotelial tenha efeitos importantes para homeostasia vascular, em condição de doença, como na hiperplasia intimal, esta enzima pode assumir um papel deletério, o que a torna um alvo farmacológico em potencial.

O aumento da síntese de TxA₂ também possui papel crítico no início e na aceleração da formação da hiperplasia neointimal (Yamagami *et al.*, 1999; Alberti *et al.*, 2020). Em um estudo utilizando um modelo de lesão na artéria femoral e experimentos *in vitro*, foi demonstrado um aumento sistêmico da síntese de TxA₂ contribuindo para a indução de eventos celulares associados a estenose e o tratamento com um antagonista de receptores para o TxA₂ (TP) mitigou a hiperplasia da neointima. Tal efeito foi associado à uma diminuição de marcadores inflamatórios e de proliferação celular (Alberti *et al.*, 2020). Um outro estudo também associou a ativação dos receptores TP para TxA₂ à migração e proliferação de CMLVs e contribuindo para reestenose após lesão vascular. Além disso, a proliferação celular e a ativação plaquetária são abolidas em camundongos *knockout* para TP, evidenciando a participação do TxA₂ e seu receptor como produto da COX que medeia a estenose (Feng *et al.*, 2016).

Muito se tem discutido sobre o papel crítico das EROs na hiperplasia neointimal. As EROs estão presentes na fase inicial de respostas inflamatórias agudas decorrentes de lesões vasculares e inclusive no desenvolvimento da reestenose (Panchenko *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Touyz e Briones, 2011; Kim *et al.*, 2012). Foi demonstrado que o aumento do estresse oxidativo contribui para formação da neointima por meio da indução da proliferação e migração de

CMLVs. Alguns autores demonstraram níveis elevados de EROs em experimentos *in vitro* e em artérias humanas com lesões hiperplásicas após angioplastia ou implante de *stent* vascular (Panchenko *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Touyz e Briones, 2011; Kim *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2012). Em consonância, nosso estudo mostrou que o tratamento local tanto com o Naproxeno quanto com o Otenaproxesul suprimiu de forma notável a geração de EROs induzidas pela hiperplasia neointimal. Esses estão de acordo com dados da literatura que mostraram que as enzimas COXs podem levar ao aumento da síntese de EROs (Armagan *et al.*, 2012; Martínez-Revelles *et al.*, 2013) e que os inibidores de COX, incluindo o Naproxeno, possuem efeitos antioxidantes (Paino *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2006). Contudo, não descartamos que outras enzimas além das COXs sejam importantes fontes de ERO na hiperplasia intimal.

Em complemento a isso, alguns estudos demonstraram que as EROs podem regular positivamente MMPs (Prado *et al.*, 2021). Foi mostrado que a MMP-2 pode ser ativada por EROs (Luchtefeld *et al.*, 2005; Kandasamy *et al.*, 2010) e nossos achados corroboram com isso. Foram observados níveis aumentados de EROs associados ao aumento da expressão e atividade de MMP-2, que foram reduzidos com o Otenaproxesul. Esses resultados sugerem que parte dos efeitos benéficos proporcionados pelo Otenaproxesul sobre estenose podem ocorrer devido ao seu efeito sobre o estresse oxidativo, que reduz a expressão e atividade de MMPs.

As MMPs possuem papel essencial na patogênese da hiperplasia neointimal. As MMPs atuam na degradação de MEC e contribuem para o remodelamento da camada íntima após lesão vascular (Bendeck *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2006). A migração das CMLVs pela MEC ocorre devido a degradação de diversos compostos, como a membrana basal e lâmina elástica, sendo uma etapa limitante ao desenvolvimento da hiperplasia neointimal. Por consequência, a expressão aumentada de enzimas proteolíticas, como as MMPs, é significativa na migração celular tanto em modelos animais quanto em humanos (Johnson e Galis, 2004; Franco *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2008).

Dentre as metaloproteinases de matriz, a MMP-2 é uma das mais investigadas em doenças vasculares devido seu envolvimento na migração de CMLVs na reestenose em modelos animais (Johnson e Galis, 2004; Whatling *et*

al., 2004). Para um melhor entendimento sobre a relação existente entre as MMPs e a hiperplasia neointimal, o presente estudo realizou a análise da expressão e atividade gelatinolítica MMP-2. Nossos resultados mostraram expressão e atividade de MMP-2 reguladas positivamente na hiperplasia neointimal e uma redução de ambos os parâmetros pelo Otenaproxesul. Já o Naproxeno não apresentou nenhuma diferença significativa em tais análises. Esse resultado sugere que, parte do efeito mediado pelo Otenaproxesul na redução do remodelamento da MEC ocorre por mecanismos independentes à inibição das COXs.

Vacek *et al.*, 2010 avaliaram os efeitos do H₂S sobre a expressão de MMP-2 e MMP-9 no remodelamento vascular em modelo de lesão da artéria carótida. Os resultados mostraram que o tratamento com doador de H₂S foi capaz de mitigar o remodelamento da artéria e normalizar os níveis das MMPs assim como de seus inibidores teciduais, os TIMPs (Vacek *et al.*, 2010).

Um outro mediador que poderia estar relacionado ao efeito adicional promovido pelo Otenaproxesul em comparação com o Naproxeno é o NO. Os efeitos protetores vasculares do NO são muito bem esclarecidos e incluem inibição da agregação plaquetária e adesão de leucócitos, regulação da pressão arterial e tônus vascular, e prevenção da proliferação de CMLVs (Rudic *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006; Bahnson *et al.*, 2015). A redução da biodisponibilidade do NO corresponde a um fator importante em doenças vasculares, embora haja contradições se é causa ou consequência da disfunção endotelial (Barbato e Tzeng, 2004; Napoli *et al.*, 2006).

No presente estudo, nós avaliamos os níveis de NO, onde foi demonstrada uma redução no grupo estenose em comparação com o grupo sham. Na disfunção endotelial, a biodisponibilidade do NO é reduzida e como consequência disso perde-se seu efeito parácrino protetor sobre a agregação plaquetária e processos proliferativos. Dessa forma, os animais com níveis de NO diminuídos podem ser mais susceptíveis a eventos adversos, inclusive na hiperplasia neointimal. Alterações na biodisponibilidade de NO prejudicam suas ações protetoras vasculares e podem até facilitar a progressão da doença reestenótica (Sojitra *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2019).

Recentemente, estudos crescentes têm sugerido um “cross talk” entre a via de sinalização do NO e H₂S na regulação de processos fisiopatológicos, incluindo a hiperplasia neointimal, trombose, além de facilitarem a angiogênese (Coletta *et al.*, 2012; Altaany *et al.*, 2013; Kida *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2019). Por ser um gás que se difunde livremente através dos compartimentos extra e intracelulares, o H₂S pode atuar em diversas vias de sinalização. Nosso estudo fornece as evidências *in vivo* de que H₂S proveniente do Otenaproxesul restaurou os níveis de NO, aumentando a sua biodisponibilidade. Cai *et al.*, 2007 e Li *et al.*, 2017 demonstraram que o H₂S aumenta a síntese de NO em CE por meio da ativação da eNOS (Cai *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2017). Da mesma maneira, um outro estudo mostrou que o NO estimula a síntese de H₂S no tecido arterial (Coletta *et al.*, 2012). Tais evidências reforçam a ideia de que o H₂S e o NO são mutuamente indispensáveis para regulação de funções vasculares (Zhao *et al.*, 2001; King *et al.*, 2006; Coletta *et al.*, 2012).

Uma outra interação existente entre esses mediadores envolvidos na reestenose é a que ocorre entre o NO e as EROs. Na disfunção endotelial e em lesões vasculares ocorre um desequilíbrio entre a geração de EROs e os sistemas de defesa antioxidante, causando uma diminuição da biodisponibilidade NO e comprometimento do tônus vascular (Förstermann *et al.*, 2017; Kohlgrüber *et al.*, 2017). Dentre as EROs, o radical livre ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) é o primeiro a ser gerado, e é responsável pela formação de outras EROs de relevância fisiopatológica para o endotélio vascular, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o radical hidroxila (OH \bullet) e o peroxinitrito (ONOO $^-$) (Incalza *et al.*, 2018). Dessa forma, o aumento do estresse oxidativo pode ocorrer devido à disponibilidade limitada de substratos ou cofatores, que leva ao desacoplamento da eNOS e geração de ânion superóxido em vez de NO. Além disso, o NO pode interagir com o superóxido levando à formação de peroxinitrito contribuindo para o agravamento do estresse oxidativo e da doença vascular (Xu e Touyz, 2006; Diers *et al.*, 2013; Cyr *et al.*, 2020).

Nossos resultados sugerem que grande parte dos efeitos benéficos gerados pelo Otenaproxesul ocorrem devido à sua fração doadora de H₂S, que atua simultaneamente sobre diversas vias de sinalização, resultando na

prevenção do desenvolvimento da hiperplasia neointimal. Isso está de acordo com os dados da literatura, onde é evidenciado que drogas liberadoras de H₂S inibem a proliferação de CMLVs para a íntima vascular e acelera a cicatrização da lesão por facilitar o processo de reendotelização (Hu *et al.*, 2019). Além disso, supressão das enzimas precursoras do H₂S, a CSE e CBS, reduzem a formação do H₂S e facilitam a proliferação de CMLVs (Yang *et al.*, 2008; Beard e Bearden, 2011; Mani *et al.*, 2013; Polhemus e Lefer, 2014; Citi *et al.*, 2021).

Assim sendo, este trabalho confirma que a inibição de COX pode ser benéfica para prevenir a hiperplasia neointimal. Outros inibidores de COX foram testados com sucesso em modelos de proliferação de CMLV *in vitro* (Waddell e Loughry, 1983; Aas *et al.*, 1995; Reis *et al.*, 2000; Marra e Liao, 2001; Brooks *et al.*, 2003). Porém, mostramos de forma inédita que o Naproxeno também seria uma alternativa dentro da classe dos AINEs. Para além disso, mostramos que o Otenaproxesul, que soma os efeitos do Naproxeno à liberação de H₂S, tem efeitos superiores aos de seu protótipo, por seu duplo mecanismo de ação.

7. Conclusão

O presente estudo demonstrou que a oclusão da artéria carótida induziu ao remodelamento vascular caracterizado por hiperplasia neointimal. Tal processo envolve a regulação positiva das COXs, que é atenuada pelo Otenaproxesul. Os efeitos do Otenaproxesul foram superiores aos do Naproxeno sobre a hiperplasia neointimal, sugerindo que parte de sua ação ocorra de forma independente da inibição das COX. Dentre esses mecanismos, a melhora completa dos parâmetros morfométricos e de perfusão promovidos pelo Otenaproxesul foram associados à redução da expressão e atividade de MMP-2, maior ação antioxidante e aumento da biodisponibilidade NO.

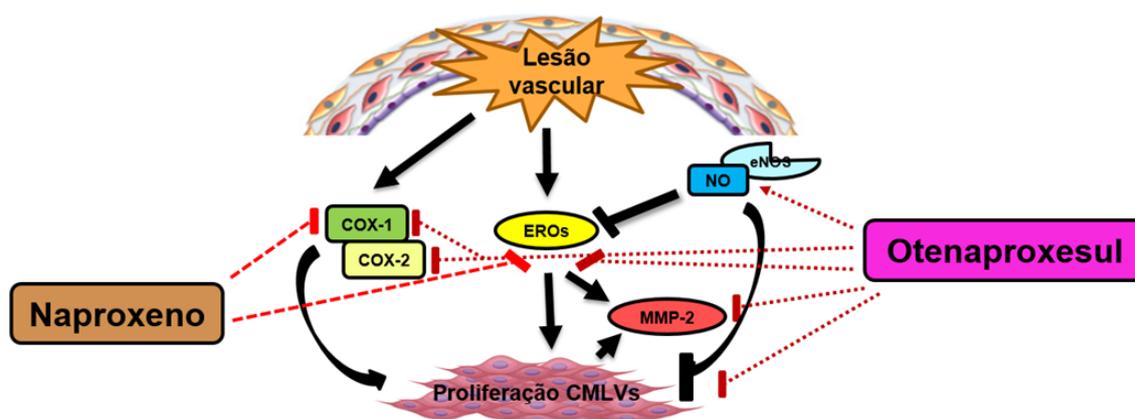


Figura 19: Efeitos do Naproxeno e Otenaproxesul sobre a proliferação de CMLVs na hiperplasia neointimal.

Diante disso, acredita-se que o H₂S potencialize os efeitos benéficos da inibição de COXs pelo Otenaproxesul na prevenção da proliferação de CMLVs na hiperplasia neointimal vascular. Sugerimos assim, que se trata de uma droga com grande potencial para inclusão em SF e até mesmo uma alternativa para tratamentos sistêmicos, podendo ser empregada como uma nova ferramenta terapêutica.

7. Referências

Boucher M. A Bayesian meta-analysis of longitudinal data in placebo controlled studies with naproxen. (2008) http://www.page-meeting.org/pdf_assets/8269-Bayesian%20Meta%20Analysis%20Final.pdf.

AAS, A. T. et al. Growth inhibition of rat glioma cells in vitro and in vivo by aspirin. **J Neurooncol**, v. 24, n. 2, p. 171-80 1995.

AGUNDEZ, J. A. et al. Gene variants and haplotypes modifying transcription factor binding sites in the human cyclooxygenase 1 and 2 (PTGS1 and PTGS2) genes. **Curr Drug Metab**, v. 15, n. 2, p. 182-95 2014.

ALBERTI, S. et al. The antiplatelet agent revacept prevents the increase of systemic thromboxane A2 biosynthesis and neointima hyperplasia. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 21420 2020.

ALTAANY, Z.; YANG, G.; WANG, R. Crosstalk between hydrogen sulfide and nitric oxide in endothelial cells. **J Cell Mol Med**, v. 17, n. 7, p. 879-88 2013.

ANGIOLILLO, D. J.; WEISMAN, S. M. Clinical Pharmacology and Cardiovascular Safety of Naproxen. **Am J Cardiovasc Drugs**, v. 17, n. 2, p. 97-107 2017.

ARAUJO, L. F. et al. Eventos cardiovasculares: um efeito de classe dos inibidores de COX-2. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, p. 222-229 2005.

ARMAGAN, G.; KANIT, L.; YALCIN, A. Effects of non-steroidal antiinflammatory drugs on D-serine-induced oxidative stress in vitro. **Drug Chem Toxicol**, v. 35, n. 4, p. 393-8 2012.

BÄCK, M.; KETELHUTH, D. F.; AGEWALL, S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 52, n. 5, p. 410-28 2010.

BAHNSON, E. S. et al. Targeted Nitric Oxide Delivery by Supramolecular Nanofibers for the Prevention of Restenosis After Arterial Injury. **Antioxid Redox Signal**, v. 24, n. 8, p. 401-18 2016.

BAHNSON, E. S. et al. Nitric oxide inhibits neointimal hyperplasia following vascular injury via differential, cell-specific modulation of SOD-1 in the arterial wall. **Nitric Oxide**, v. 44, p. 8-17 2015.

BARBATO, J. E.; TZENG, E. Nitric oxide and arterial disease. **J Vasc Surg**, v. 40, n. 1, p. 187-93 2004.

BASKAR, R. et al. Effect of S-diclofenac, a novel hydrogen sulfide releasing derivative inhibit rat vascular smooth muscle cell proliferation. **Eur J Pharmacol**, v. 594, n. 1-3, p. 1-8 2008.

BEARD, R. S., JR.; BEARDEN, S. E. Vascular complications of cystathionine β -synthase deficiency: future directions for homocysteine-to-hydrogen sulfide research. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 300, n. 1, p. H13-26 2011.

BENDECK, M. P.; IRVIN, C.; REIDY, M. A. Inhibition of matrix metalloproteinase activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury. **Circ Res**, v. 78, n. 1, p. 38-43 1996.

BLACKLER, R. W. et al. Deciphering the pathogenesis of NSAID enteropathy using proton pump inhibitors and a hydrogen sulfide-releasing NSAID. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 308, n. 12, p. G994-1003 2015.

BLACKLER, R. W. et al. NSAID-gastroenteropathy: new aspects of pathogenesis and prevention. **Curr Opin Pharmacol**, v. 19, p. 11-6 2014.

BLACKLER, R. W. et al. Hydrogen sulphide protects against NSAID-enteropathy through modulation of bile and the microbiota. **Br J Pharmacol**, v. 172, n. 4, p. 992-1004 2015.

BROOKS, G. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit vascular smooth muscle cell proliferation via differential effects on the cell cycle. **J Pharm Pharmacol**, v. 55, n. 4, p. 519-26 2003.

BROWN, J. F. et al. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. **Am J Physiol**, v. 265, n. 3 Pt 1, p. G418-22 1993.

BRUNO, A. S. et al. Vascular Inflammation in Hypertension: Targeting Lipid Mediators Unbalance and Nitrosative Stress. **Curr Hypertens Rev**, 2019.

CAI, W. J. et al. The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation. **Cardiovasc Res**, v. 76, n. 1, p. 29-40 2007.

CAMPBELL, J. H.; CAMPBELL, G. R. Smooth muscle phenotypic modulation--a personal experience. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 8, p. 1784-9 2012.

CHAN, M.; WALLACE, J. Hydrogen sulfide-based therapeutics and gastrointestinal diseases: Translating physiology to treatments. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 305, 2013.

CHANG, W. et al. Cordycepin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation. **Eur J Pharmacol**, v. 597, n. 1-3, p. 64-9 2008.

CHELLADURAI, P.; SEEGER, W.; PULLAMSETTI, S. S. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**, v. 40, n. 3, p. 766 2012.

CHUNG, J. et al. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. **Cell**, v. 69, n. 7, p. 1227-36 1992.

CITI, V. et al. Role of hydrogen sulfide in endothelial dysfunction: Pathophysiology and therapeutic approaches. **J Adv Res**, v. 27, p. 99-113 2021.

COLETTA, C. et al. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 23, p. 9161-6 2012.

CONNOLLY, E. et al. Cyclooxygenase isozyme expression and intimal hyperplasia in a rat model of balloon angioplasty. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 300, n. 2, p. 393-8 2002.

COSTA, D. et al. Antioxidant Activity and Inhibition of Human Neutrophil Oxidative Burst Mediated by Arylpropionic Acid Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 8, p. 1659-1670 2006.

CYR, A. R. et al. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. **Crit Care Clin**, v. 36, n. 2, p. 307-321 2020.

DE CICCIO, P. et al. ATB-346, a novel hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug, induces apoptosis of human melanoma cells and inhibits melanoma development in vivo. **Pharmacol Res**, v. 114, p. 67-73 2016.

DIERS, A. R.; BRONIEWSKA, K. A.; HOGG, N. Nitrosative stress and redox-cycling agents synergize to cause mitochondrial dysfunction and cell death in endothelial cells. **Redox Biol**, v. 1, n. 1, p. 1-7 2013.

DISTRUTTI, E. et al. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 316, n. 1, p. 325-35 2006.

DONADONI, F. et al. An in silico study of the influence of vessel wall deformation on neointimal hyperplasia progression in peripheral bypass grafts. **Med Eng Phys**, v. 74, p. 137-145 2019.

DONNARUMMA, E.; TRIVEDI, R. K.; LEFER, D. J. Protective Actions of H₂S in Acute Myocardial Infarction and Heart Failure. **Compr Physiol**, v. 7, n. 2, p. 583-602 2017.

ELLIOTT, S. N. et al. A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats. **Gastroenterology**, v. 109, n. 2, p. 524-30 1995.

FANJUL-FERNÁNDEZ, M. et al. Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 1, p. 3-19 2010.

FENG, X. et al. Thromboxane A₂ Activates YAP/TAZ Protein to Induce Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration. **J Biol Chem**, v. 291, n. 36, p. 18947-58 2016.

FIORUCCI, S. et al. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. **Gastroenterology**, v. 129, n. 4, p. 1210-24 2005.

FIORUCCI, S. et al. Cyclooxygenase-2-derived lipoxin A₄ increases gastric resistance to aspirin-induced damage. **Gastroenterology**, v. 123, n. 5, p. 1598-606 2002.

FIORUCCI, S. et al. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. **Gastroenterology**, v. 131, n. 1, p. 259-71 2006.

FISCHER, J. W.; HAWKINS, S.; CLOWES, A. W. Pharmacologic inhibition of nitric oxide synthases and cyclooxygenases enhances intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arteries. **J Vasc Surg**, v. 40, n. 1, p. 115-22 2004.

FLANNIGAN, K. L. et al. Enhanced synthesis and diminished degradation of hydrogen sulfide in experimental colitis: a site-specific, pro-resolution mechanism. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71962 2013.

FOMENKO, I. et al. Effects of conventional and hydrogen sulfide-releasing non-steroidal anti-inflammatory drugs in rats with stress-induced and epinephrine-induced gastric damage. **Stress**, v. 17, n. 6, p. 528-37 2014.

FÖRSTERMANN, U.; XIA, N.; LI, H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Circ Res**, v. 120, n. 4, p. 713-735 2017.

FRANCO, C. et al. Doxycycline alters vascular smooth muscle cell adhesion, migration, and reorganization of fibrillar collagen matrices. **Am J Pathol**, v. 168, n. 5, p. 1697-709 2006.

GALIS, Z. S.; KHATRI, J. J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. **Circ Res**, v. 90, n. 3, p. 251-62 2002.

GARCÍA-GARCÍA, H. M. et al. Drug-eluting stents. **Arch Cardiol Mex**, v. 76, n. 3, p. 297-319 2006.

GARCÍA-RAYADO, G.; NAVARRO, M.; LANAS, A. NSAID induced gastrointestinal damage and designing GI-sparing NSAIDs. **Expert Rev Clin Pharmacol**, v. 11, n. 10, p. 1031-1043 2018.

GEMICI, B. et al. H₂S-releasing drugs: anti-inflammatory, cytoprotective and chemopreventative potential. **Nitric Oxide**, v. 46, p. 25-31 2015.

GODIN, D. et al. Remodeling of carotid artery is associated with increased expression of matrix metalloproteinases in mouse blood flow cessation model. **Circulation**, v. 102, n. 23, p. 2861-6 2000.

GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G. A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **J Clin Invest**, v. 116, n. 1, p. 4-15 2006.

GROSSER, T.; RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. The Cardiovascular Pharmacology of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Trends Pharmacol Sci**, v. 38, n. 8, p. 733-748 2017.

GUO, L. et al. Mechanism of matrix metalloproteinase axis-induced neointimal growth. **J Mol Cell Cardiol**, v. 66, p. 116-25 2014.

HARIRFOROOSH, S.; ASGHAR, W.; JAMALI, F. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. **J Pharm Pharm Sci**, v. 16, n. 5, p. 821-47 2013.

HARRIS, R. C.; ZHANG, M. Z.; CHENG, H. F. Cyclooxygenase-2 and the renal renin-angiotensin system. **Acta Physiol Scand**, v. 181, n. 4, p. 543-7 2004.

HAVELKA, G. E. et al. Nitric oxide delivery via a permeable balloon catheter inhibits neointimal growth after arterial injury. **J Surg Res**, v. 180, n. 1, p. 35-42 2013.

HERRING, B. P. et al. Previously differentiated medial vascular smooth muscle cells contribute to neointima formation following vascular injury. **Vasc Cell**, v. 6, p. 21 2014.

HERRING, B. P. et al. Inflammation and vascular smooth muscle cell dedifferentiation following carotid artery ligation. **Physiol Genomics**, v. 49, n. 3, p. 115-126 2017.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. S206-S212 2006.

HU, Q. et al. Hydrogen sulfide improves vascular repair by promoting endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of endothelial progenitor cells. **J Hypertens**, v. 37, n. 5, p. 972-984 2019.

HUANG, S.; HOUGHTON, P. J. Mechanisms of resistance to rapamycins. **Drug Resist Updat**, v. 4, n. 6, p. 378-91 2001.

INCALZA, M. A. et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascul Pharmacol**, v. 100, p. 1-19 2018.

INOUE, T. et al. Vascular inflammation and repair: implications for re-endothelialization, restenosis, and stent thrombosis. **JACC Cardiovasc Interv**, v. 4, n. 10, p. 1057-66 2011.

JOHNSON, C.; GALIS, Z. S. Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 1, p. 54-60 2004.

KANDASAMY, A. D. et al. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. **Cardiovasc Res**, v. 85, n. 3, p. 413-23 2010.

KANG, Y. J. et al. Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. **Prog Lipid Res**, v. 46, n. 2, p. 108-25 2007.

KHAN, K. N. et al. Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity. **Toxicol Pathol**, v. 26, n. 5, p. 612-20 1998.

KIDA, M. et al. Hydrogen sulfide increases nitric oxide production with calcium-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. **Eur J Pharm Sci**, v. 48, n. 1-2, p. 211-5 2013.

KIM, J. Y. et al. Sulforaphane suppresses vascular adhesion molecule-1 expression in TNF- α -stimulated mouse vascular smooth muscle cells: involvement of the MAPK, NF- κ B and AP-1 signaling pathways. **Vascul Pharmacol**, v. 56, n. 3-4, p. 131-41 2012.

KING, V. L. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib decreases angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 5, p. 1137-43 2006.

KOHLGRÜBER, S. et al. Regulation of Transcription Factors by Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Vascular Physiology and Pathology. **Antioxid Redox Signal**, v. 26, n. 13, p. 679-699 2017.

KROTZ, F. et al. Selective COX-2 inhibitors and risk of myocardial infarction. **J Vasc Res**, v. 42, n. 4, p. 312-24 2005.

KUO, C. J. et al. Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. **Nature**, v. 358, n. 6381, p. 70-3 1992.

KUZUYA, M. et al. Deficiency of gelatinase a suppresses smooth muscle cell invasion and development of experimental intimal hyperplasia. **Circulation**, v. 108, n. 11, p. 1375-81 2003.

LANAS, A.; SCHEIMAN, J. Low-dose aspirin and upper gastrointestinal damage: epidemiology, prevention and treatment. **Curr Med Res Opin**, v. 23, n. 1, p. 163-73 2007.

LI, J.; KIM, S. G.; BLENIS, J. Rapamycin: one drug, many effects. **Cell Metab**, v. 19, n. 3, p. 373-9 2014.

LI, L. et al. Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative. **Free Radic Biol Med**, v. 42, n. 5, p. 706-19 2007.

LI, X. H. et al. H(2)S regulates endothelial nitric oxide synthase protein stability by promoting microRNA-455-3p expression. **Sci Rep**, v. 7, p. 44807 2017.

LIBBY, P. et al. Atherosclerosis. **Nat Rev Dis Primers**, v. 5, n. 1, p. 56 2019.

LIM, J. W.; KIM, H.; KIM, K. H. Nuclear factor-kappaB regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. **Lab Invest**, v. 81, n. 3, p. 349-60 2001.

LINDEN, D. R. et al. Production of the gaseous signal molecule hydrogen sulfide in mouse tissues. **J Neurochem**, v. 106, n. 4, p. 1577-85 2008.

LIU, F. et al. Hydrogen sulfide improves wound healing via restoration of endothelial progenitor cell functions and activation of angiopoietin-1 in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 63, n. 5, p. 1763-78 2014.

LIU, P.; SUN, M.; SADER, S. Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease. **Can J Cardiol**, v. 22 Suppl B, n. Suppl B, p. 25b-30b 2006.

LIU, Y. et al. [Role of cytokine-matrix metalloproteinase axis on promoting vascular neointima hyperplasia in mice]. **Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi**, v. 44, n. 11, p. 961-967 2016.

LONGCHAMP, A. et al. Hydrogen sulfide-releasing peptide hydrogel limits the development of intimal hyperplasia in human vein segments. **Acta Biomater**, v. 97, p. 374-384 2019.

LU, S. et al. GYY4137, a hydrogen sulfide (H₂S) donor, shows potent anti-hepatocellular carcinoma activity through blocking the STAT3 pathway. **Int J Oncol**, v. 44, n. 4, p. 1259-67 2014.

LUCHTEFELD, M. et al. Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 328, n. 1, p. 183-8 2005.

MA, B. et al. Effect of hydrogen sulfide on restenosis of peripheral arteries after angioplasty. **Mol Med Rep**, v. 5, n. 6, p. 1497-502 2012.

MANI, S. et al. Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis. **Circulation**, v. 127, n. 25, p. 2523-34 2013.

MARQUÉS, J. et al. Induction of Cyclooxygenase-2 by Overexpression of the Human NADPH Oxidase 5 (NOX5) Gene in Aortic Endothelial Cells. v. 9, n. 3, 2020.

MARRA, D. E.; LIAO, J. K. Salicylates and vascular smooth muscle cell proliferation: molecular mechanisms for cell cycle arrest. **Trends Cardiovasc Med**, v. 11, n. 8, p. 339-44 2001.

MARTIN, F. et al. Constitutive cyclooxygenase-2 is involved in central nociceptive processes in humans. **Anesthesiology**, v. 106, n. 5, p. 1013-8 2007.

MARTÍNEZ-REVELLES, S. et al. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 1, p. 51-65 2013.

MCADAM, B. F. et al. Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation. **J Clin Invest**, v. 105, n. 10, p. 1473-82 2000.

MITCHELL, J. A.; SHALA, F.; PIRES, M. E. L. Endothelial cyclooxygenase-1 paradoxically drives local vasoconstriction and atherogenesis despite underpinning prostacyclin generation. v. 7, n. 12, 2021.

MITRA, A. K.; AGRAWAL, D. K. In stent restenosis: bane of the stent era. **J Clin Pathol**, v. 59, n. 3, p. 232-9 2006.

MOSES, J. W. et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. **N Engl J Med**, v. 349, n. 14, p. 1315-23 2003.

MOSTAFA, D. K.; EL AZHARY, N. M.; NASRA, R. A. The hydrogen sulfide releasing compounds ATB-346 and diallyl trisulfide attenuate streptozotocin-induced cognitive impairment, neuroinflammation, and oxidative stress in rats: involvement of asymmetric dimethylarginine. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 94, n. 7, p. 699-708 2016.

MOTTA, J. P. et al. Hydrogen sulfide protects from colitis and restores intestinal microbiota biofilm and mucus production. **Inflamm Bowel Dis**, v. 21, n. 5, p. 1006-17 2015.

NAKAZAKI, M. et al. Prevention of neointimal hyperplasia induced by an endovascular stent via intravenous infusion of mesenchymal stem cells. **J Neurosurg**, p. 1-13 2019.

NAPOLI, C. et al. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. **Nitric Oxide**, v. 15, n. 4, p. 265-79 2006.

NEWBY, A. C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. **Cardiovasc Res**, v. 69, n. 3, p. 614-24 2006.

OGAWA, M. et al. A critical role of COX-2 in the progression of neointimal formation after wire injury in mice. **Expert Opin Ther Targets**, v. 13, n. 5, p. 505-11 2009.

OSMOND, J. M.; KANAGY, N. L. Modulation of hydrogen sulfide by vascular hypoxia. **Hypoxia (Auckl)**, v. 2, p. 117-126 2014.

OTSUKA, F. et al. The importance of the endothelium in atherothrombosis and coronary stenting. **Nat Rev Cardiol**, v. 9, n. 8, p. 439-53 2012.

PAINO, I. M. M. et al. Effect of therapeutic plasma concentrations of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the production of reactive oxygen species by

activated rat neutrophils. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 543-551 2005.

PANCHENKO, M. P.; SILVA, N.; STONE, J. R. Up-regulation of a hydrogen peroxide-responsive pre-mRNA binding protein in atherosclerosis and intimal hyperplasia. **Cardiovasc Pathol**, v. 18, n. 3, p. 167-72 2009.

PAPAPETROPOULOS, A. et al. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 51, p. 21972-7 2009.

PARENTE, L.; PERRETTI, M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. **Biochem Pharmacol**, v. 65, n. 2, p. 153-9 2003.

POLHEMUS, D. J.; LEFER, D. J. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. **Circ Res**, v. 114, n. 4, p. 730-7 2014.

PRADO, A. F. et al. Matrix Metalloproteinases and Arterial Hypertension: Role of Oxidative Stress and Nitric Oxide in Vascular Functional and Structural Alterations. **Biomolecules**, v. 11, n. 4, p. 585 2021.

PRICE, D. J. et al. Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. **Science**, v. 257, n. 5072, p. 973-7 1992.

QIN, Z. X. et al. Hydrogen-rich saline prevents neointima formation after carotid balloon injury by suppressing ROS and the TNF- α /NF- κ B pathway. **Atherosclerosis**, v. 220, n. 2, p. 343-50 2012.

RAINES, E. W.; FERRI, N. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. **J Lipid Res**, v. 46, n. 6, p. 1081-92 2005.

RAMSAY, R. G. et al. Transcriptional regulation of cyclo-oxygenase expression: three pillars of control. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 16, n. 2 Suppl, p. 59-67 2003.

REIS, E. D. et al. Sulindac inhibits neointimal formation after arterial injury in wild-type and apolipoprotein E-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 23, p. 12764-9 2000.

RICHARDSON, A.; KAYE, S. B. Drug resistance in ovarian cancer: the emerging importance of gene transcription and spatio-temporal regulation of resistance. **Drug Resist Updat**, v. 8, n. 5, p. 311-21 2005.

RIOS, A. et al. Cyclooxygenase-2 and kidney failure. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 98, n. 3-4, p. 86-90 2012.

RUDIC, R. D. et al. COX-2-derived prostacyclin modulates vascular remodeling. **Circ Res**, v. 96, n. 12, p. 1240-7 2005.

RUDIC, R. D. et al. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. **J Clin Invest**, v. 101, n. 4, p. 731-6 1998.

SOJITRA, B. et al. Nitric oxide synthase inhibition abrogates hydrogen sulfide-induced cardioprotection in mice. **Mol Cell Biochem**, v. 360, n. 1-2, p. 61-9 2012.

STONE, G. W. et al. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. **N Engl J Med**, v. 350, n. 3, p. 221-31 2004.

TANG, S. Y. et al. Cyclooxygenase-2 in endothelial and vascular smooth muscle cells restrains atherogenesis in hyperlipidemic mice. **Circulation**, v. 129, n. 17, p. 1761-9 2014.

TOUYZ, R. M.; BRIONES, A. M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertens Res**, v. 34, n. 1, p. 5-14 2011.

VACEK, T. P. et al. Hydrogen sulfide protects against vascular remodeling from endothelial damage. **Amino Acids**, v. 39, n. 5, p. 1161-9 2010.

VAN VARIK, B. et al. Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. **Frontiers in Genetics**, v. 3, n. 290, 2012.

WADDELL, W. R.; LOUGHRY, R. W. Sulindac for polyposis of the colon. **J Surg Oncol**, v. 24, n. 1, p. 83-7 1983.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiol Rev**, v. 88, n. 4, p. 1547-65 2008.

_____. Physiological and pathophysiological roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract. **Antioxid Redox Signal**, v. 12, n. 9, p. 1125-33 2010.

WALLACE, J. L. et al. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346). **Br J Pharmacol**, v. 159, n. 6, p. 1236-46 2010.

WALLACE, J. L. et al. Gastrointestinal safety and anti-inflammatory effects of a hydrogen sulfide-releasing diclofenac derivative in the rat. **Gastroenterology**, v. 132, n. 1, p. 261-71 2007.

WALLACE, J. L.; DEL SOLDATO, P. The therapeutic potential of NO-NSAIDs. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 17, n. 1, p. 11-20 2003.

WALLACE, J. L.; MOTTA, J. P.; BURET, A. G. Hydrogen sulfide: an agent of stability at the microbiome-mucosa interface. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 314, n. 2, p. G143-g149 2018.

WALLACE, J. L.; NAGY, P. A proof-of-concept, Phase 2 clinical trial of the gastrointestinal safety of a hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug. v. 177, n. 4, p. 769-777 2020.

WALLACE, J. L. et al. Hydrogen Sulfide-Releasing Therapeutics: Translation to the Clinic. **Antioxid Redox Signal**, v. 28, n. 16, p. 1533-1540 2018.

WANG, K. et al. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, decreases monocyte chemoattractant protein-1 expression and neointimal hyperplasia in the rabbit atherosclerotic balloon injury model. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 45, n. 1, p. 61-7 2005.

WANG, R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? **Faseb j**, v. 16, n. 13, p. 1792-8 2002.

WHATLING, C.; MCPHEAT, W.; HURT-CAMEJO, E. Matrix management: assigning different roles for MMP-2 and MMP-9 in vascular remodeling. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 1, p. 10-1 2004.

WIGHT, T. N.; POTTER-PERIGO, S. The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 301, n. 6, p. G950-5 2011.

WILLECKE, F. et al. Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 5 Promotes Arterial Neointima Formation through Smooth Muscle Cell Proliferation. **J Vasc Res**, v. 56, n. 6, p. 308-319 2019.

WITTENBERG, R. H. et al. First-dose analgesic effect of the cyclo-oxygenase-2 selective inhibitor lumiracoxib in osteoarthritis of the knee: a randomized, double-blind, placebo-controlled comparison with celecoxib [NCT00267215]. **Arthritis Res Ther**, v. 8, n. 2, p. R35 2006.

WU, D. et al. Hydrogen sulfide in cancer: Friend or foe? **Nitric Oxide**, v. 50, p. 38-45 2015.

WU, L. et al. Proliferative inhibition of danxiongfang and its active ingredients on rat vascular smooth muscle cell and protective effect on the VSMC damage induced by hydrogen peroxide. **J Ethnopharmacol**, v. 126, n. 2, p. 197-206 2009.

XU, S.; TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species and vascular remodelling in hypertension: still alive. **Can J Cardiol**, v. 22, n. 11, p. 947-51 2006.

XU, X. et al. Regulated expression of PTPRJ by COX-2/PGE2 axis in endothelial cells. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114996 2014.

YAGAMI, T.; KOMA, H.; YAMAMOTO, Y. Pathophysiological Roles of Cyclooxygenases and Prostaglandins in the Central Nervous System. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 7, p. 4754-71 2016.

YAMAGAMI, S. et al. Effects of the thromboxane A2 receptor antagonist on platelet deposition and intimal hyperplasia after balloon injury. **Jpn Heart J**, v. 40, n. 6, p. 791-802 1999.

YANG, G. et al. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. **Science**, v. 322, n. 5901, p. 587-90 2008.

YANG, H. M. et al. Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, reduces neointimal hyperplasia through inhibition of Akt signaling. **Circulation**, v. 110, n. 3, p. 301-8 2004.

YU, Y. et al. Vascular COX-2 modulates blood pressure and thrombosis in mice. **Sci Transl Med**, v. 4, n. 132, p. 132ra54 2012.

ZAIN, M. A.; JAMIL, R. T.; SIDDIQUI, W. J. Neointimal Hyperplasia. In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC., 2020.

ZANARDO, R. C. et al. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. **Faseb j**, v. 20, n. 12, p. 2118-20 2006.

ZHANG, J. et al. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E₂ promotes injury-induced vascular neointimal hyperplasia through the E-prostanoid 3 receptor. **Circ Res**, v. 113, n. 2, p. 104-14 2013.

ZHANG, L. N. et al. Endothelial NO synthase deficiency promotes smooth muscle progenitor cells in association with upregulation of stromal cell-derived factor-1alpha in a mouse model of carotid artery ligation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 4, p. 765-72 2006.

ZHAO, W. et al. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. **Embo j**, v. 20, n. 21, p. 6008-16 2001.

ZHENG, L.; DU, X. Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs and Hypertension. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 69, n. 2, p. 209-211 2014.