

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

Enes Francisco Beraldo de Queiroz

Efeito do Dolutegravir sobre a Disfunção Endotelial Induzida pela LDL Oxidada

Belo Horizonte
2022

Enes Francisco Beraldo de Queiroz

Efeito do Dolutegravir sobre a Disfunção Endotelial Induzida pela LDL Oxidada

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 requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini

**Belo Horizonte
2022**

043 Queiroz, Enes Francisco Beraldo de.
Efeito do Dolutegravir sobre a disfunção endotelial induzida pela LDL Oxidada. – 2022.
79 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. 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. Fisiologia. 2. Antirretrovirais. 3. Inibidores de integrase. 4. Receptores de LDL Oxidado. 5. Células Endoteliais. I. Capettini, Luciano dos Santos Aggum. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



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° 557 DE ENES FRANCISCO BERALDO DE QUEIROZ

"Efeito do Dolutegravir Sobre A Disfunção Endotelial Induzida Pela LDL Oxidada"

ENES FRANCISCO BERALDO DE QUEIROZ

Dissertação de Mestrado **defendida e aprovada**, no dia **20 de maio de 2022**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Carolina Rosa Gioda, ICB/FURG
Prof. Dr. Stéfany Bruno de Assis Cau, ICB/UFMG
Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini, ICB/UFMG - Orientador

Belo Horizonte, 12 de maio de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Stéfany Bruno de Assis Cau**, Professor do Magistério Superior, em 24/05/2022, às 17:01, 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 27/05/2022, às 09:41, 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 **Carolina Rosa Gioda**, Usuária Externa, em 20/06/2022, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1450889** e o código CRC **32501ACE**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO N° 557 DE ENES FRANCISCO BERALDO DE QUEIROZ

Às 14:00 horas do dia **20 de maio de 2022**, transmitida por webconferência pela plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Enes Francisco Beraldo de Queiroz**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Dra. Carolina Rosa Gioda**, ICB/Universidade Federal do Rio Grande, **Prof. Dr. Stêfany Bruno de Assis Cau**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Efeito do Dolutegravir Sobre A Disfunção Endotelial Induzida Pela LDL Oxidada**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 20 de maio de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Stefany Bruno de Assis Cau**, **Professor do Magistério Superior**, em 24/05/2022, às 17:01, 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 27/05/2022, às 09:41, 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 **Carolina Rosa Gioda**, **Usuária Externa**, em 20/06/2022, às 16:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1450876** e o código CRC **81BD279D**.

Dedico esta dissertação de mestrado à **minha mãe Maria de Lourdes** e ao **meu pai João Lopes** (In Memoriam), pais amorosos e dedicados, que nunca mediram esforços para me apoiar na busca pelo conhecimento, sempre valorizaram os estudos e acreditaram no poder transformador da educação. Ambos foram, sem dúvida alguma, verdadeiros guerreiros e são os meus melhores e maiores exemplos de honestidade e humildade. Estendo esta dedicatória à **tia Donália Beraldo** e ao **tio Divino Ramos**, que com suas condutas, me ensinaram na prática o real significado das palavras respeito e carinho, foram presentes na minha vida desde os primeiros passos, me acompanharam ao longo da caminhada e até os dias atuais, me orientam e ajudam em tudo que podem.

“Estudar e não pensar é um desperdício. Pensar e não estudar é perigoso.”

Confúcio

Agradecimentos

À **Deus** por ter me concedido todos os meios necessários para concluir o Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia.

Aos **meus familiares** por sempre compartilharem dos meus objetivos e sobretudo por me apoiar em todos os momentos, em especial a **minha mãe, meu pai** (in memoriam), **tia Donália, tio Divino** e as minhas madrinhas **Carmem, Cláudia e Maria Izabel**.

Aos **meus amigos Fernanda, Rafaela e Wander** por fazerem parte e diferença na minha vida, serem amigos presentes, me oferecerem aconselhamentos sempre sinceros, falar o que preciso ouvir e não o que gostaria de ouvir. Vocês são mais que amigos... vocês são únicos e muito especiais para mim.

Ao **amigo e incentivador Ulrich Carlos Mbiakop**, também conhecido como “Gringooooo” pela amizade leal, pelos ensinamentos transmitidos para a vida através do seu exemplo de estudante disciplinado, pesquisador incansável, pai amoroso, filho respeitoso, irmão solidário, esposo dedicado, ser humano humilde, justo, honesto, de coração bondoso, mente iluminada, conectado com a natureza, preocupado com o próximo, com o mundo e com o Universo.

Aos **amigos do Laboratório de Biologia Vascular (LBV): Afolabi, Edenil, Gianne, Gustavo, Leonardo, Lindsay, Melissa, Olga, Wesley**, pela excelente convivência, incontáveis momentos de aprendizado em conjunto, dicas sempre valiosas e várias colaborações durante toda a jornada do mestrado, em especial: **Thaís Lemos Ferreira**, grande parceira de bancada, disciplinas e incontáveis reuniões de estudo, sem a qual não teria chegado até aqui.

A **todos os outros amigos**, que a universidade, a odontologia e o trabalho me proporcionou, pela torcida e desejo de sucesso.

Ao **meu orientador, professor Dr. Luciano Capettini** por ter me acolhido bem desde o primeiro instante em que o procurei no LBV e principalmente por ter me recebido

como orientando. Agradeço ainda pela sua disponibilidade, paciência e boa vontade para discutir, a qualquer momento, sobre o projeto de pesquisa, experimentos, resultados encontrados, sua presença na bancada para demonstrar técnicas, pela assistência mesmo a distância, sempre que procurado, pela sua postura sensata, firme e ao mesmo tempo tranquila nos momentos do inesperado. Enfim... sei que palavras não são suficientes para expressar o quanto sou grato, mas ainda assim preciso dizer: Muito obrigado professor Luciano por tudo. Você cumpriu com excelência e maestria o seu papel de orientador. Para mim, e acredito que para todos os que o conhecem, é um grande exemplo de professor, pesquisador e ser humano.

À **Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)**, ao **Instituto de Ciências Biológicas (ICB)** e ao **Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia (PGFisFar)** por ter me fornecido as melhores condições possíveis para o meu processo de formação.

Aos **professores dos Departamentos de Fisiologia e Farmacologia** pelas aulas ministradas, acessibilidade e por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos **técnicos de laboratório** por toda assistência prestada e aos **demais funcionários da UFMG**, sem os quais a universidade não funcionaria.

Às agências de fomento: **CAPES, CNPq e FAPEMIG**, que possibilitaram a realização desse trabalho.

A **banca examinadora**, pela disponibilidade de participar dessa etapa do meu processo de busca pela obtenção do título de mestre e atenção dispensada à leitura do trabalho.

Enfim... **a todos já citados e aos demais** que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse concluir o mestrado...

Muito obrigado!

Enes Francisco Beraldo de Queiroz

Resumo

As doenças cardiovasculares (DCV) configuram-se como um grave problema de saúde pública e são apontadas como a principal causa de morte em todo o mundo. Portanto, são motivo de preocupação para a população em geral, comunidade científica e especialmente para os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Muitas DCV estão relacionadas direta ou indiretamente à progressão da doença aterosclerótica que, por sua vez, é precedida pela disfunção endotelial. Ao longo dos anos, o conhecimento acerca da infecção pelo HIV aumentou e, conseqüentemente, surgiram antirretrovirais (ART) mais eficientes, o que contribuiu para o aumento da expectativa de vida dos indivíduos que convivem com o vírus. Estes, por sua vez, passaram a conviver com as doenças relacionadas ao envelhecimento, a presença do HIV no organismo e com os efeitos adversos dos ART, como por exemplo diabetes e dislipidemia, que são fatores de risco para a ocorrência de DCV. Trabalhos recentes demonstram que, independentemente da infecção viral, algumas terapias com ART estão associadas à dislipidemia grave com impacto cardiovascular. Atualmente, os inibidores de integrase de 2ª geração, destaque para o Dolutegravir (DTG - objeto de pesquisa deste trabalho), vem sendo amplamente empregado na terapia ART, por ter a seu favor bons resultados no controle da infecção viral e promessa de poucos efeitos adversos. Porém, seu tempo de uso é relativamente curto e não existem estudos detalhados dos seus efeitos sobre o endotélio e a função vascular. Diante do exposto, este trabalho verifica o efeito do DTG sobre a homeostase endotelial e sobre a disfunção endotelial induzida pela LDL oxidada. Para tanto, anéis de aorta torácica de camundongos e células endoteliais humanas foram expostos e incubados por 24 horas com LDLox, DTG ou com ambos os estímulos simultaneamente. Foram realizados estudos de reatividade vascular, citometria de fluxo, ELISA e imunofluorescência. Os resultados encontrados demonstraram que a LDLox foi efetiva em promover disfunção vascular, pois reduziu a resposta contrátil induzida pela fenilefrina via aumento da biodisponibilidade de NO. Em cultura de células endoteliais, reduziu a expressão de eNOS e nNOS, aumentou a expressão de iNOS, produção de mediadores pró-inflamatórios (CCI-2, TNF e IL-6) e aumentou o estresse oxidativo pelo aumento de radicais superóxido. Quando associado a LDLox, o DTG não alterou o padrão de contração induzido pela LDLox nas preparações de aorta. Em células endoteliais, preveniu o aumento de NO no estado basal ou estimulado com ACh mas não alterou os níveis de radicais superóxido. Além disso, dentre as NOS constitutivas,

somente a concentração de 10 μ M preveniu a redução da expressão da eNOS. Contudo, o DTG foi capaz de reduzir o aumento de iNOS induzido pela LDLox, apesar de não reduzir os níveis de CCL-2, TNF e IL-6. Sozinho, o DTG potencializou a contração vascular induzida pela fenilefrina, associada a uma menor biodisponibilidade de NO. Em células endoteliais, o DTG não alterou a produção basal ou estimulada de NO e radicais superóxido, não alterou a expressão de eNOS e iNOS mas reduziu a expressão da nNOS. Sozinho, o DTG também não alterou a produção de CCL-2, TNF e IL-6. Logo, pode-se concluir que o DTG pode piorar a disfunção vascular induzida pela LDLox apesar de reduzir os níveis de iNOS. Além disso, independente da exposição a LDLox, o DTG foi capaz de induzir disfunção vascular associada a uma down-regulation da via do NO.

Palavras-chave: Dolutegravir, disfunção endotelial, LDL oxidada, óxido nítrico (NO) e aterosclerose.

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) are a serious public health problem and are identified as the main cause of death worldwide. Therefore, they are a matter of concern for the general population, the scientific community and especially for people with the human immunodeficiency virus (HIV). Many CVDs are directly or indirectly related to the progression of atherosclerotic disease, which in turn is preceded by endothelial dysfunction. Over the years, knowledge about HIV infection has increased and, consequently, more efficient antiretrovirals (ART) have emerged, which have contributed to increasing the life expectancy of individuals living with the virus. These, in turn, began to live with diseases related to aging, the presence of HIV in the body and the adverse effects of ART, such as diabetes and dyslipidemia, which are risk factors for the occurrence of CVD. Recent work demonstrates that, regardless of viral infection, some ART therapies are associated with severe dyslipidemia with cardiovascular impact. Currently, 2nd generation integrase inhibitors, especially Dolutegravir (DTG - research object of this work), have been widely used in ART therapy, as they have good results in viral infection control and promise of few effects. However, its use time is relatively short and there are no detailed studies of its effects on the endothelium and vascular function. Given the above, this work verifies the effect of DTG on endothelial homeostasis and on endothelial dysfunction induced by oxidized LDL. Therefore, thoracic aorta rings from mice and human endothelial cells were exposed and incubated for 24 hours with LDLox, DTG or both stimuli simultaneously. Vascular reactivity, flow cytometry, ELISA and immunofluorescence studies were performed. The results found showed that LDLox was effective in promoting vascular dysfunction, as it reduced the contractile response induced by phenylephrine via increased NO bioavailability. In endothelial cell culture, it reduced eNOS and nNOS expression, increased iNOS expression, production of pro-inflammatory mediators (CCl-2, TNF and IL-6) and increased oxidative stress by increasing superoxide radicals. When associated with LDLox, DTG did not change the pattern of contraction induced by LDLox in aortic preparations. In endothelial cells, it prevented the increase of NO in the basal state or stimulated with ACh but did not alter the levels of superoxide radicals. Furthermore, among the constitutive NOS, only the concentration of 10 μ M prevented the reduction of eNOS expression. However, DTG was able to reduce the increase in iNOS induced by LDLox, despite not reducing the

levels of CCL-2, TNF and IL-6. Alone, DTG potentiated the vascular contraction induced by phenylephrine, associated with a lower bioavailability of NO. In endothelial cells, DTG did not alter basal or stimulated production of NO and superoxide radicals, did not alter eNOS and iNOS expression but reduced nNOS expression. Alone, DTG also did not alter the production of CCL-2, TNF and IL-6. Therefore, it can be concluded that DTG can worsen LDLox-induced vascular dysfunction despite reducing iNOS levels. Furthermore, regardless of exposure to LDLox, DTG was able to induce vascular dysfunction associated with a down-regulation of the NO pathway.

Keywords: Dolutegravir, endothelial dysfunction, oxidized LDL, nitric oxide (NO) and atherosclerosis.

Lista de Figuras

Figura - 1: Representação da conversão da L-arginina e oxigênio molecular em L-citrulina e NO pela NOS na presença de cofatores.....	26
Figura - 2: Visão geral dos fatores endoteliais vasculares e seus efeitos na função do músculo liso vascular e sobre as células sanguíneas circulantes.....	28
Figura - 3: Desenvolvimento da aterosclerose.....	30
Figura - 4: Ilustração com destaque para ponto de ação do inibidor de integrase.....	35
Figura - 5: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de camundongo expostos e incubados com LDLox (50 µg/ml), DTG (1 µM), ambos os estímulos e controle com veículo (PBS).....	47
Figura - 6 A: Efeito da inibição das NOS com L-NAME (300 µM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em anéis de aorta controle e em anéis expostos e incubados com LDLox (50 µg/ml).....	48
Figura - 7 A: Efeito da inibição das NOS com L-NAME (300 µM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em anéis de aorta expostos e incubados com LDLox (50 µg/ml) ou LDLox (50 µg/ml) + DTG (1 µM).....	49
Figura - 8 A: Efeito da inibição das NOS com L-NAME (300 µM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em anéis de aorta controle e em anéis expostos e incubados com DTG (1 µM).....	50
Figura - 9: Viabilidade das células endoteliais em resposta à exposição a diferentes estímulos e incubação por 24 horas.....	51
Figura - 10: Produção de NO pelas células endoteliais expostas e incubadas com LDLox, DTG e ambos os estímulos, no estado basal.....	52
Figura - 11: Produção de NO pelas células endoteliais expostas e incubadas com LDLox, DTG e ambos os estímulos, seguida de estimulação com ACh 30 minutos antes do término do período de incubação.....	53

Figura - 12: Produção de superóxido pelas células endoteliais expostas e incubadas com LDLox, DTG e ambos os estímulos no estado basal.....	54
Figura - 13: Produção de superóxido pelas células endoteliais expostas e incubadas com LDLox, DTG e ambos os estímulos, seguida de estimulação com ACh 30 minutos antes do término do período de incubação.....	55
Figura - 14 A: Expressão da eNOS por imunofluorescência, em células endoteliais estimuladas e incubadas com DTG 1µM e 10µM. Figura - 14 B: Painel superior: células incubadas sem estímulos com DTG; painel inferior: células incubadas com DTG nas concentrações 1µM e 10µM.....	57
Figura - 15 A: Expressão da eNOS por imunofluorescência, em células endoteliais expostas e incubadas somente com LDLox e com LDLox + DTG, nas concentrações: 1µM e 10µM. Figura -15 B: Painel superior: células incubadas por 24 horas sem estímulos; painel inferior: células estimuladas e incubadas com LDLox e com LDLox + DTG, nas concentrações: 1µM e 10µM.....	58
Figura - 16 A: Expressão da nNOS por imunofluorescência, em células endoteliais estimuladas e incubadas com DTG 1µM e 10µM. Figura - 16 B: Painel superior: células incubadas sem estímulos com DTG; painel inferior: células incubadas com DTG nas concentrações 1µM e 10µM.....	59
Figura - 17 A: Expressão da nNOS por imunofluorescência, em células endoteliais expostas e incubadas somente com LDLox e com LDLox + DTG, nas concentrações: 1µM e 10µM. Figura - 17B: Painel superior: células incubadas por 24 horas sem estímulos; painel inferior: células estimuladas e incubadas com LDLox e com LDLox + DTG, nas concentrações: 1µM e 10µM.....	60
Figura - 18 A: Expressão da iNOS por imunofluorescência, em células endoteliais estimuladas e incubadas com DTG 1µM e 10µM. Figura - 18 B: Painel superior: células incubadas sem estímulos com DTG; painel inferior: células incubadas com DTG nas concentrações 1µM e 10µM.....	61
Figura - 19 A: Expressão da iNOS por imunofluorescência, em células endoteliais expostas e incubadas somente com LDLox e com LDLox + DTG, nas concentrações: 1µM e 10µM. Figura - 19 B: Painel superior: células incubadas por 24 horas sem	

estímulos; painel inferior: células estimuladas e incubadas com LDLox e com LDLox + DTG, nas concentrações: 1 μ M e 10 μ M.....62

Figura - 20: Dosagem, por ELISA, da produção de CCL-2 (A), TNF (B) e IL-6 (C) pelas células endoteliais expostas a LDLox, DTG ou a ambos os estímulos.....64

Lista de Tabelas

Tabela - 1: Apanhado sobre a abordagem terapêutica para controle do HIV, resposta inflamatória, condição imunológica e repercussões cardiovasculares antes do surgimento dos antirretrovirais e após introdução de fármacos antirretrovirais de 1° e 2° geração.....	33
Tabela - 2: Grupos experimentais e respectivas exposições realizadas nos anéis de aorta torácica de camundongos (C57BL6J).....	40
Tabela - 3: Grupos experimentais e respectivas exposições realizadas nas células endoteliais (EA.hy926).....	44
Tabela - 4: Valores de (Emax) obtidos nas curvas de contração induzida por fenilefrina nos estudos de reatividade vascular realizados em anéis de aorta torácica de camundongos (C57BL6J).....	48

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACh - Acetilcolina

AGL - Ácidos graxos livres

AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ARV - Antirretrovirais

AZT - Zidovudina

BH4 - Tetrahydrobiopterina

°C - Grau centígrado

CAPÍ - Centro de Aquisição e Processamento de Imagem

CaMKII - Calmodulina cinase

DAPI - 4,6-diamidina-2-fenilindole, dihydrochloride

DAF - FM - 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluoresceína

DCF - 2',7'dichlorofluoresceína

DCFH - 2,7 - dichlorodihydrofluorescein

DCV - Doença cardiovascular

DHE - Dihydroethidium dihydroetidina

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DTG - Dolutegravir

E_{max} - Concentração capaz de induzir o efeito máximo

ELISA - "Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay"

eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FENIL - Fenilefrina

cGMP - Monofosfato cíclico de guanosina

HDL - High density lipoprotein - lipoproteína de alta densidade

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HUVEC- Células endoteliais umbilicais humanas

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

h - Hora

ICAM - Molécula-1 de adesão intercelular

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

ITRNs - Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa

ITRNNs - Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa

IPs - Inibidores de protease

INIs - Inibidores de integrase

HAART - Terapia antirretroviral altamente ativa

HDL - Lipoproteína de alta densidade

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LDLox - LDL oxidada

LPC - Lisofosfatidilcolina

LPL - Lipoproteína lipase

MCP1 - Moléculas quimiotáticas para monócitos

MS - Ministério da Saúde

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NF- κ B - Fator de transcrição nuclear- kappa B

NOS - Óxido nítrico sintase

NO - Óxido nítrico

nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal

NaOH - Hidróxido de sódio

O⁻² - Ânion superóxido

OH - Radical hidroxila

OMS - Organização Mundial de Saúde

ONOO - Peroxinitrito

PBS - Salina tamponada com fosfato

PCAM - Molécula de adesão celular

PKA - Proteína cinase A

QM – Quilomícrons

RENAME – Relação Nacional de Medicamentos Especiais

ROS - Espécies reativas ao oxigênio

SUS - Sistema Único de Saúde

TARV - Terapia antirretroviral

TG - Triglicerídeos

TRLs - Lipoproteínas ricas em triglicerídeos

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

VCAM-1 - Molécula-1 de adesão vascular

VLDL - Lipoproteína de densidade muito baixa

Sumário

1. Introdução	23
2. Revisão de Literatura	25
2.1 Endotélio.....	25
2.2 Disfunção Endotelial.....	27
2.3 Aterosclerose.....	29
2.4 Relação entre Aterosclerose e HIV.....	31
2.5 Fármacos Antirretrovirais X Doenças Cardiovasculares.....	31
2.6 Dolutegravir no controle do HIV.....	33
2.7 Hipótese.....	35
3. Justificativa	36
4. Objetivos	37
4.1 Objetivos Geral	37
4.2 Objetivos Específicos	37
4.2.1 Tópico A.....	37
4.2.2 Tópico B.....	37
5. Materiais e Métodos	38
5.1 Preparação do Dolutegravir Sódico.....	38
5.2 Isolamento e Oxidação da LDL Humana.....	38
5.3 Estudos com Anéis de Aorta Torácica de Camundongos	39
5.3.1 Origem dos Anéis de Aorta.....	39
5.3.2 Obtenção dos anéis de aorta.....	39
5.3.3 Exposição das Preparações aos Estímulos e Incubação.....	40
5.3.4 Montagem das Preparações.....	41
5.3.5 Estabilização e Teste de Viabilidade das Preparações.....	41

5.3.6 Resposta Contrátil à Fenilefrina.....	41
5.3.7 Efeito da Inibição das NOS na Resposta Contrátil à Fenilefrina.....	42
5.4 Estudos com Células Endoteliais Humanas.....	42
5.4.1 Modelo celular - Linhagem: EAhy926.....	42
5.4.2 Teste de Viabilidade Celular após Exposição a Estímulos e Incubação.....	42
5.4.3 Protocolo de Exposição aos Estímulos e Incubação.....	43
5.4.4 Dosagem de NO e Superóxido por Citometria de Fluxo.....	44
5.4.5 Análise da Expressão Proteica das isoformas da NOS (eNOS, nNOS e iNOS) por imunofluorescência.....	45
5.4.6 Análise de Mediadores Pró-inflamatórios por Elisa.....	45
5.5 Análises Estatísticas e Expressão dos Resultados.....	46
6. Resultados.....	47
6.1 Resultados dos Estudos com os Anéis de Aorta.....	47
6.1.1 Efeito da Exposição e Incubação com LDLox, DTG e a Ambos os Estímulos sobre a Resposta Contrátil Induzida pela Fenilefrina.....	47
6.1.2 Participação do NO na Resposta Contrátil após Exposição e Incubação com LDLox, DTG e a Ambos os Estímulos.....	48
6.1.3 Conclusão Parcial 1.....	50
6.2 Resultados dos Estudos com as Células Endoteliais.....	51
6.2.1 Viabilidade Celular.....	51
6.2.2 Avaliação dos Níveis de NO e Radicais Superóxido nas Células Endoteliais por Citometria de Fluxo.....	52
6.2.2.1 Determinação dos Níveis Basais de NO pelas Células Endoteliais.....	52
6.2.2.2 Determinação dos Níveis de NO pelas Células Endoteliais Estimuladas com ACh.....	53
6.2.2.3 Determinação dos Níveis Basais de Radicais Superóxido pelas Células Endoteliais.....	53

6.2.2.4 Determinação dos Níveis de Radicais Superóxido pelas Células Endoteliais Estimuladas com ACh.....	54
6.2.2.5 Conclusões Parciais 2.....	55
6.2.3 Avaliação da Expressão de eNOS, nNOS e iNOS por Imunofluorescência.....	56
6.2.4 Produção de Mediadores Pró-inflamatórios por Elisa.....	63
7. Discussão.....	65
7.1 Outras Considerações sobre os Estudos Realizados, ARV e HIV.....	71
8. Conclusão.....	73
Referências Bibliográficas.....	74

1. Introdução

As doenças cardiovasculares (DCV) ainda são responsáveis por altas taxas de mortalidade em diversos países. O estudo “Estimativas Globais de Saúde”, publicado em 2020 pela Organização Mundial de Saúde (OMS), confirma esta realidade, pois aponta que as DCV foram a principal causa de morte na população ao longo de 20 anos. Alterações metabólicas ocasionadas pela disfunção endotelial possuem estreita relação com a origem e progressão das DCV decorrentes da aterosclerose (HIGASHI et al., 2014).

Além do risco elevado de morte, as DCV podem causar sérias complicações para a qualidade de vida dos indivíduos que com elas precisam conviver. Configuram-se como um grave problema de saúde pública e são especialmente preocupantes para os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), uma vez que o vírus pode infectar células miocárdicas e endoteliais; desencadeando, respectivamente, insuficiência cardíaca e disfunção endotelial (MARINCOWITZ et al., 2019).

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS do inglês - *Acquired Immunodeficiency Syndrome*), responsável por diversas alterações imunológicas e sistêmicas, está diretamente relacionada ao aumento dos níveis de triglicerídeos e alterações do perfil lipídico (FARLEY et al., 2005; SVIRIDOV et al., 2020). Os fármacos antirretrovirais utilizados para tratar os portadores do HIV, também podem contribuir para o surgimento de dislipidemia e diabetes, o que conseqüentemente favorece o desenvolvimento da síndrome metabólica e pode potencializar a ocorrência de DCV nesses indivíduos (DUBÉ et al., 2005).

Estudos anteriores com modelos celulares, animais e humanos sugeriram que os inibidores de integrase (INIs) atuais apresentam menor impacto cardiometabólico, quando comparados aos inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (ITRNs) e / ou inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (ITRNNs) (MESSIAEN et al., 2013a; QUERCIA et al., 2015). No entanto, não existem resultados consistentes na literatura sobre os impactos cardiovasculares e metabólicos dos inibidores de integrase. O Dolutegravir (DTG), pertencente desta classe e destaque como um dos mais novos fármacos utilizados para combater o HIV, é a droga escolhida para o desenvolvimento do presente trabalho. Este fármaco, que é classificado como um inibidor de integrase de segunda geração, foi apresentado para o mercado como uma

alternativa promissora e já é indicado por alguns profissionais como primeira opção terapêutica para os pacientes infectados com o HIV, por apresentar bons resultados no controle do vírus. O Sistema Único de Saúde (SUS) incluiu o DTG na Relação Nacional de Medicamentos Especiais (RENAME) no fim de 2017 ((WWW.AIDS.GOV.BR, 2017) e passou a distribuí-lo efetivamente como primeira linha de tratamento para os pacientes infectados pelo HIV a partir de 2018-2019. Desta forma, o número de pacientes que passaram a utilizá-lo é crescente. Embora a sua utilização possa ser considerada relativamente recente, já existem trabalhos publicados que sugerem alterações sanguíneas como trombocitopenia e até mesmo eventos cardiovasculares relacionados ao seu uso (NAKAHARAI et al., 2017). Além disso, não existem dados consistentes na literatura científica a respeito das ações cardiometabólicas provocadas pelo DTG e, sobretudo, não são conhecidos efeitos deste fármaco sobre o endotélio, bem como, sobre a homeostase e função vascular.

2. Revisão de Literatura

2.1 Endotélio

O endotélio é o tecido que recobre a parte interna dos vasos sanguíneos, seu principal constituinte são as células endoteliais, que se encontram justapostas e formam uma camada única de células, que é fundamental para a homeostase vascular e manutenção do fluxo sanguíneo. A sua localização é estratégica, pois o torna capaz de atuar de modo eficaz na regulação do tônus vascular e no controle de fenômenos inflamatórios, oxidativos e fibro-proliferativos. No entanto, a sua localização também o torna mais sujeito a danos físicos e bioquímicos decorrentes de alterações do fluxo sanguíneo e variações nas concentrações de íons, citocinas, quimiocinas, glicose, triglicérides, frações do colesterol, entre outros componentes presentes no sangue (SIMA; STANCU; SIMIONESCU, 2009; SIMIONESCU; ANTOHE, 2006).

O tecido endotelial além de atuar de forma direta sobre os vasos sanguíneos e sua musculatura, atua de forma indireta para inibir processos pró-aterogênicos, como: proliferação e migração da musculatura lisa vascular, agregação plaquetária, oxidação de moléculas de lipoproteína de baixa densidade (LDL), adesão de monócitos e síntese de mediadores inflamatórios (BURCHARDT et al., 2013; LIU et al., 2022). O endotélio exerce essas funções através da produção e / ou liberação de mediadores vasodilatadores como: óxido nítrico (NO) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; IGNARRO et al., 1988), prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (BRANDES et al., [s.d.]), e de mediadores contráteis como: tromboxano A₂ (MONCADA; VANE, 1978), endotelinas (YANAGISAWA et al., 1988), angiotensina II (BAKER, 2009) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (WEBER; COSENTINO; LUSCHER, 1999).

Os efeitos vasculo-protetores promovidos pelo endotélio são atribuídos à síntese e liberação de NO. Esta substância é produto das Óxido Nítrico Sintases (NOS), dentre as suas várias atuações, é considerado um potente vasodilatador, exerce ações anti-inflamatórias e antioxidantes. Em condições fisiológicas é fundamental para a prevenção dos estágios iniciais da aterosclerose. Sua redução é apontada como a principal causa da disfunção endotelial (BITAR et al., 2005).

O NO pode ser produzido por três diferentes isoformas da enzima NOS, assim denominadas: NOS neuronal (nNOS ou NOS1), NOS endotelial (eNOS ou NOS3) e a

NOS induzível (iNOS ou NOS2). A nNOS e a eNOS são enzimas constitutivas, já a iNOS é uma isoforma induzível, uma vez que passa a produzir NO a partir de estímulos inflamatórios. Esta nomenclatura se dá de acordo com o local e condição em que cada isoforma foi identificada (FÖRSTERMANN, 2010). Todas elas produzem NO através da conversão da L-arginina e oxigênio molecular em L-citrulina e NO, através da utilização de nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato (NADPH) como co-substrato e dinucleotideo de flavina e adenina (FAD), mononucleotideo de flavina (FMN) e tetrahidrobiopterina (BH₄) como cofatores. As três enzimas são funcionais, se apresentam na forma de dímeros, transferem elétrons do NADPH, via FAD e FMN no domínio redutase carboxi-terminal, para o domínio heme oxigenase amino-terminal. O domínio oxigenase também se liga ao cofator essencial BH₄, oxigênio molecular e ao substrato L-arginina (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

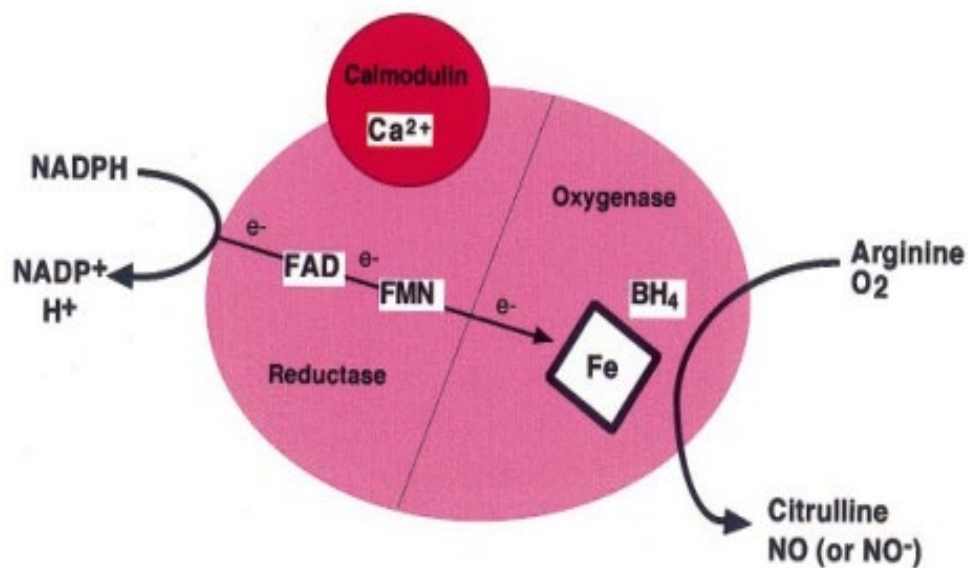


Figura 01: Representação da conversão da L-arginina e oxigênio molecular em L-citrulina e NO pela NOS na presença de cofatores. (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001)

Além de produzir moléculas de NO, o endotélio ainda parece estar relacionado, através da enzima nNOS, com a produção de moléculas de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que podem ser importantes na manutenção da homeostase vascular (CAPETTINI; CORTES; LEMOS, 2010).

2.2 Disfunção Endotelial

A disfunção endotelial é uma alteração sistêmica e condição determinante na patogênese da doença aterosclerótica. É inicialmente caracterizada por uma redução na produção de NO (NOELS; WEBER, 2011). Desde a sua identificação nos anos 80, este passou a ser considerado como um dos principais agentes vasodilatadores derivado do endotélio (IGNARRO et al., 1988). O NO se tornou uma das mais importantes moléculas sinalizadoras do sistema cardiovascular e sua biodisponibilidade modificada essencial para a ocorrência da disfunção endotelial e consequente estabelecimento das condições ideais para o surgimento, manutenção e evolução da aterosclerose (MUDAU et al., 2012).

O NO tem capacidade para inibir a adesão leucocitária (KUBES; SUZUKI; GRANGER, 1991). Se ocorre redução de NO, ocorre conseqüentemente indução da expressão da proteína quimiotática de macrófagos (MCP-1), que em resposta a esta redução recruta fagócitos mononucleares (ZEIHER et al., 1995). Danos ao endotélio são desencadeados e se estabelece um desequilíbrio entre a produção de fatores relaxantes e fatores contráteis, conseqüente aumento da permeabilidade endotelial, aumento da agregação plaquetária, adesão de leucócitos e produção de citocinas (ANDERSON, 1999)

Além do desequilíbrio nos níveis de NO, a hiperlipidemia, que é o aumento dos níveis de lipídeos (colesterol, suas frações e triglicerídeos) circulantes na corrente sanguínea, pode predispor o desenvolvimento da disfunção endotelial, através de mudança na regulação de NADPH oxidase e conseqüente aumento do estresse oxidativo (RAJAGOPALAN et al., 1996). A presença de EROs, proteína C-reativa, CD40 ligante e lectina (receptores de LDL oxidado) estimulam a expressão endotelial de moléculas de adesão, como por exemplo: molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) que se liga a monócitos e linfócitos T. Este evento é considerado o gatilho para a invasão da parede vascular por células inflamatórias (LIBBY, 2012).

A disfunção endotelial, no entanto, não está associada apenas à vasodilatação reduzida, ela encontra-se associada a um estado pró-inflamatório e pró-trombótico (ENDEMANN; SCHIFFRIN, 2004). A integridade e homeostase endotelial dependem ainda do equilíbrio entre os fatores de risco cardiovascular, das substâncias

vasodilatadoras presentes em um determinado indivíduo, de variáveis até o momento desconhecidas e da predisposição genética (BONETTI; LERMAN; LERMAN, 2003)

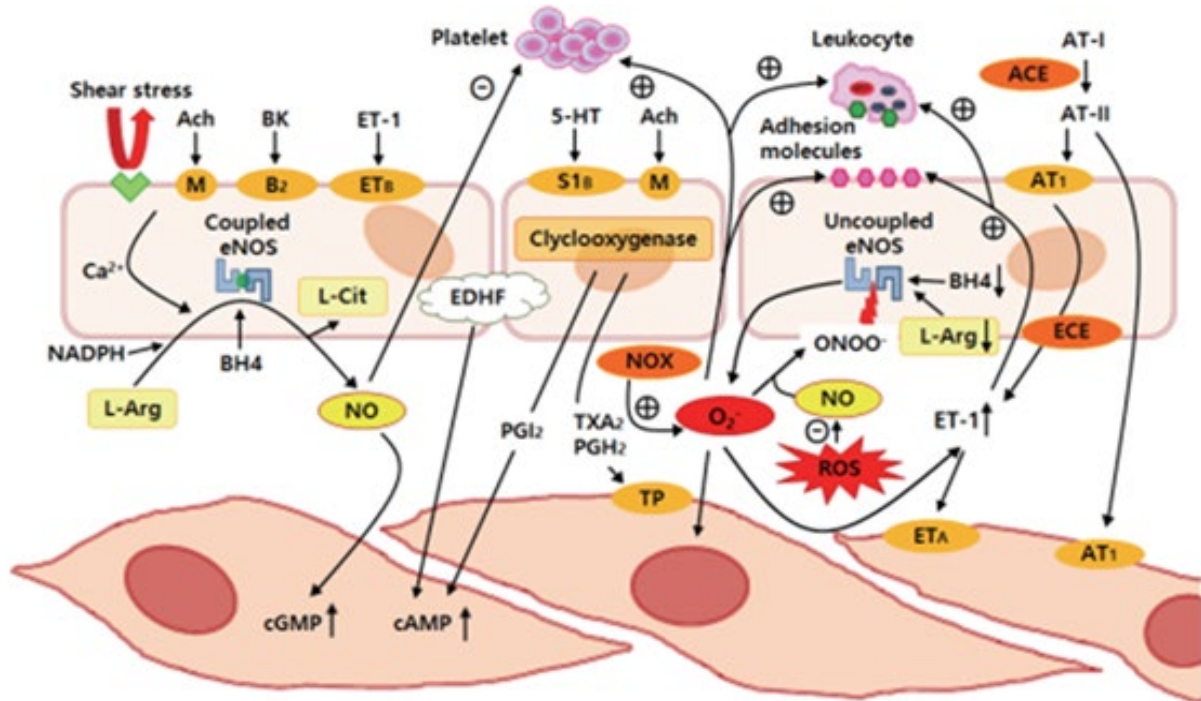


Figura 02: Visão geral dos fatores endoteliais vasculares e seus efeitos na função do músculo liso vascular e sobre as células sanguíneas circulantes. No endotélio saudável, a eNOS encontra-se acoplada e é responsável pela maior parte da produção vascular de NO. No entanto, quando está desacoplada, torna-se um potencial gerador de EROs, o que favorece o estresse oxidativo (PARK; PARK, 2015).

Legenda: ACE, enzima de conversão da angiotensina; Ach, acetilcolina; AT-I, angiotensina I; AT-II, angiotensina II; AT1, receptor da angiotensina 1; BH4, tetrahydrobiopterina; BK, bradicinina; cAMP, monofosfato de adenosina cíclico; cGMP, monofosfato de guanosina cíclico; ECE, enzima de conversão da endotelina; eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; EDHF, fator de hiperpolarização derivado do endotélio; ETA e ETB, receptores de endotelina A e B; ET-1, endotelina-1; L-Arg, L-arginina; L-Cit, L-citrulina; M, receptor muscarínico; O2-, ânion superóxido; ONOO-, peroxinitrito; NADPH, fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina; NO, óxido nítrico; NOX, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase; PGH2, prostaglandina H2; PGI2, prostaglandina I2; ROS, espécies reativas de oxigênio; S1B, receptor de serotonina; TP, receptor prostanóide de tromboxano; TXA2, tromboxano; 5-HT, serotonina; -, inibição, +, estimulação.

2.3 Aterosclerose

As doenças relacionadas ao sistema cardiovascular são a principal causa de morte em inúmeros países (PEZZUTO, 1997). Dentre elas, apenas a aterosclerose é responsável por 234 mortes a cada 100.000 habitantes em todo o mundo, de acordo com a OMS (BARQUERA et al., 2015). Os principais fatores de risco para ocorrência de doenças cardiovasculares (DCV) são: hipercolesterolemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes mellitus (DM), obesidade, sedentarismo, tabagismo, reações imunológicas e suscetibilidade genética, que atuam de forma isolada ou em conjunto, para a manifestação do quadro patológico vascular (BALLANTYNE, 2007; LUDEWIG; ZINKERNAGEL; HENGARTNER, 2002).

Na atualidade, a aterosclerose é entendida como uma doença inflamatória crônica progressiva decorrente de uma descompensação do sistema imune e da deposição lipídica na camada subendotelial. Inúmeros estudos apontam que a fração LDL do colesterol tem papel fundamental na patogênese (KETELHUTH; HANSSON, 2011). Níveis elevados de LDL na corrente sanguínea favorece a migração de monócitos por entre as células endoteliais e aumenta a interação do LDL com os proteoglicanos presentes no espaço subendotelial e com EROs produzidas por macrófagos residentes, células musculares lisas e células endoteliais. Tais interações causam o aprisionamento das partículas de LDL nesse espaço (STEFFENS; MACH, 2004) e geram mudanças oxidativas e enzimáticas capazes de promover a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais adjacentes, como por exemplo: P-selectinas, que atraem os monócitos circulantes. Os monócitos atraídos migram via endotélio para a camada íntima do vaso (MAIOLINO et al., 2013), onde se diferenciam em macrófagos, passam a fagocitar as moléculas de LDL oxidadas e se transformam em células espumosas (WEBB; MOORE, 2007). Estas se unem e originam a estria gordurosa, que constitui a primeira fase do processo de formação da placa aterosclerótica (HEGYI et al., 1997)

A progressão da placa se dá pela continuidade do processo de migração dos monócitos através das células endoteliais (RAJESH et al., 2007). Em resposta a inflamação local, que induz a liberação de mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas, hormônios, proteína C reativa, entre outros), que promovem a ativação do sistema imune e estimula as células musculares lisas. O processo de migração dos monócitos para a camada íntima do vaso sanguíneo é irreversível e promove a

estenose vascular com posterior deposição de cálcio e colágeno (MACH; MONTECUCCO; STEFFENS, 2008; MONTECUCCO et al., 2012).

A LDL oxidada é captada pelo receptor de lectina. Este fato desencadeia uma série de ações que começa pela redução da expressão da eNOS (KATTOOR; GOEL; MEHTA, 2019), e aumento da expressão de moléculas de adesão. O aumento da placa aterosclerótica, faz com que mais fatores de crescimento sejam secretados pelos macrófagos presentes na mesma, e se encerra com o crescimento de células do músculo liso vascular e síntese de colágeno intersticial (LIBBY; RIDKER, 2006).

A diminuição do NO e o excesso oxidativo pode ativar enzimas metaloproteinases de matriz (UEMURA et al., 2001) denominadas MMP-2 e MMP-9, que acarretam o enfraquecimento da cobertura fibrosa. O NO tem potencial para inibir a agregação de plaquetas (RADOMSKI; PALMER; MONCADA, 1987), a sua redução portanto, favorece a trombogenicidade. A associação destas ocorrências promove a ruptura da capa fibrosa da placa aterosclerótica, formação de trombos e desencadeamento de eventos cardiovasculares, que resultam na maioria dos infartos do miocárdio (ENDEMANN, 2004).

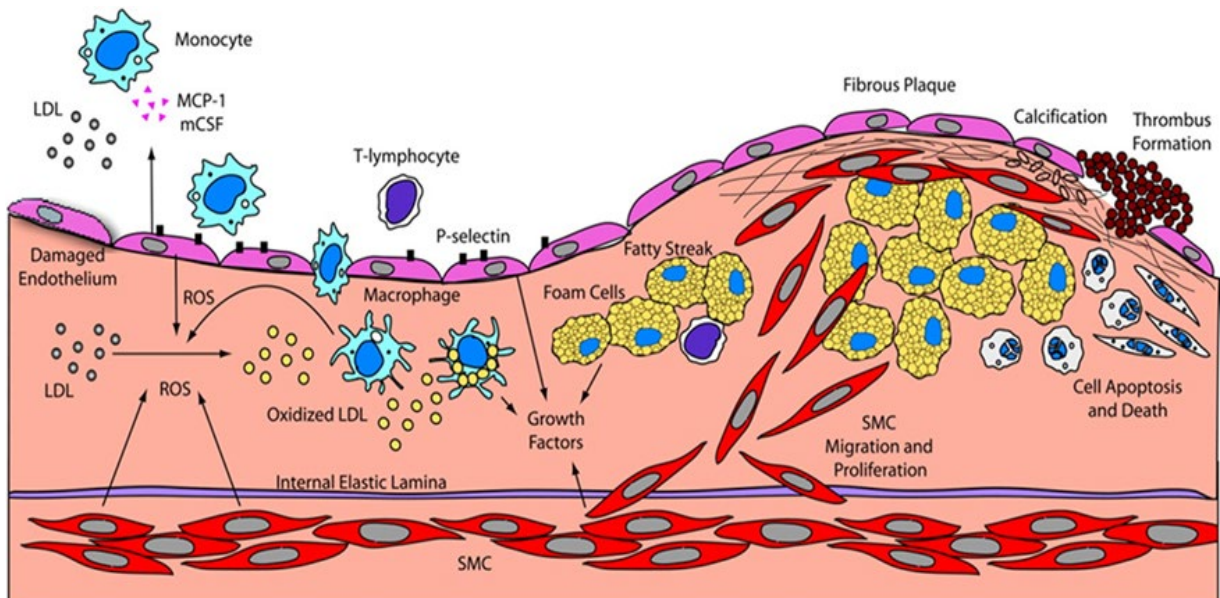


Figura 03: Desenvolvimento da aterosclerose. Espécies reativas ao oxigênio (ROS) produzidas por células endoteliais estimulam os macrófagos, que passam a oxidar LDL no espaço subendotelial, iniciando eventos que culminam na formação de uma placa fibrosa. A ruptura da placa fibrosa leva à formação de trombo e à oclusão do vaso sanguíneo (MADAMANCHI; VENDROV; RUNGE, 2005).

2.4 Relação entre Aterosclerose e HIV

A aterosclerose, na atualidade, é entendida como uma alteração sistêmica complexa envolvida com diversos eventos inflamatórios e imunológicos, configura-se como um dos principais problemas de saúde em todo o mundo. É uma doença ainda mais preocupante para indivíduos idosos e sobretudo para indivíduos idosos e portadores do HIV (SEBBEN KRAMER et al.,).

Estudo realizado nos Estados Unidos com 2.800 indivíduos, publicado no “Journal of the American College of Cardiology” em 2012, indicou que os portadores do HIV são 4,5 vezes mais propensos a morrer por infarto do miocárdio do que as pessoas que não têm este vírus (TSENG et al., 2012).

Existem indícios de que partículas proteicas do próprio vírus e / ou proteínas liberadas por receptores de células infectadas exercem efeito direto sobre o endotélio vascular, pois estas foram relacionadas com a presença de agentes pró-coagulantes, ativação plaquetária, diminuição da produção de NO em função das reações com ROS, advindas da destruição de linfócitos T CD4 (células CD4+), e aumento da produção de citocinas inflamatórias (ZAMAN et al., 2000). O HIV pode também contribuir para redução do número de células endoteliais e dessa maneira favorecer a disfunção endotelial e por consequência o desenvolvimento da aterosclerose (DA SILVA et al., 2011).

2.5 Fármacos Antirretrovirais X Doenças Cardiovasculares

A evolução dos fármacos antirretrovirais (ARV) acompanha a evolução dos conhecimentos científicos acerca da infecção e do vírus. Atualmente, os ARV são cada vez melhores, tanto em relação a sua efetividade no controle do vírus, quanto ao fato de apresentarem menores efeitos adversos para quem deles depende para viver. O uso dos antirretrovirais tem por objetivos a supressão da carga viral e aumento do número de células de defesa, mais especificamente: linfócitos T CD4+. Os ARV por sua vez, ao atingirem os seus objetivos, melhoram a qualidade de vida do paciente que convive com o HIV (MGHAMBA; MASSAWE; SASI, 2013)

Antes do advento da terapia antirretroviral (TARV) os indivíduos portadores do HIV apresentavam miocardites e cardiomiopatias graves, possivelmente em

decorrência da ação direta do vírus sobre o músculo cardíaco ou associadas a processos autoimunes desencadeados pelo HIV (BARBARO, 2002). A terapia antirretroviral combinada (TAC) aumentou expressivamente a sobrevivência dos portadores do HIV (HILEMAN; FUNDERBURG, 2017; MAGO CLERICI et al., 2019). Contudo, assim como o vírus, os fármacos que compõem o coquetel antirretroviral contribuem para o aparecimento de doenças cardiovasculares, uma vez que podem provocar alterações no perfil lipídico dos portadores, o que aumenta as chances de formação da placa aterosclerótica (MAGGI et al., 2007).

O melhor entendimento das ações do vírus sobre o organismo, a consequente evolução dos fármacos ARV e a TAC colaborou para uma redução nas ocorrências de alterações graves sobre o músculo cardíaco e fez com que estas se tornassem raras. No entanto, ocorreu aumento da incidência de outras DCV, como por exemplo: infarto agudo do miocárdio, fibrose miocárdica, insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico (WING, 2016)

	Antes dos ART	1° Geração dos ART	2° Geração dos ART
Abordagem Terapêutica do HIV	Não havia uma terapia específica para o HIV. Os pacientes recebiam tratamentos para as alterações e sintomas decorrentes do vírus no organismo.	- Inibidores de protease (PI) - Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeo (nRTI) - Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (INNTRs)	- Inibidores de protease (PI) - Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeo (nRTI) - Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (INNTRs) - Inibidores de entrada (EI) - Inibidores de Integrase
Resposta Inflamatória	Inflamação Aguda	Inflamação Crônica	Inflamação Crônica
Condição Imunológica	Evolução para AIDS	Imunocompetentes	Imunocompetentes
Repercussões Cardiovasculares	- Derrame Pericárdico - Cardiomiopatia Dilatada	- Aterosclerose - Infarto do Miocárdio - Cardiomiopatia Dilatada - Doença Arterial Periférica	- Insuficiência Cardíaca - Fibrilação Atrial - Doença Arterial Coronariana

Tabela 1: Apanhado sobre a abordagem terapêutica para controle do HIV, resposta inflamatória, condição imunológica e repercussões cardiovasculares antes do surgimento dos antirretrovirais e após introdução de fármacos antirretrovirais de 1° e 2° geração (HSUE; WATERS, 2019).

2.6 Dolutegravir no Controle do HIV

Dentre as diversas classes de fármacos antirretrovirais disponíveis para uso, está a classe dos inibidores da integrase (INI). Os INI de primeira geração foram testados em humanos há mais de 30 anos, porém, sofreram inúmeros empecilhos para utilização clínica na ocasião, por apresentarem custo elevado de produção, limitações farmacodinâmicas (pouca seletividade pela integrase) e farmacocinéticas

(injetável e tempo de meia-vida extremamente curto) (POMMIER; JOHNSON; MARCHAND, 2005).

Na busca por drogas mais eficientes ao longo dos anos para combater o HIV, surgiram os INI de segunda geração, dentre os quais encontra-se o dolutegravir. Ele é considerado um dos fármacos disponíveis mais promissores para o tratamento da infecção pelo HIV, pois desde os estudos pré-clínicos, demonstrou ser potente contra o vírus e apresentou perfil farmacológico bastante atraente. Introduzido no mercado a poucos anos e ministrado associado a outros ARV, apresenta histórico baixo de eventos adversos (MESSIAEN et al., 2013b).

A administração do DTG é por via oral, o que significa dizer, que este fármaco passa por metabolismo de primeira passagem. Ao atingir os níveis séricos esperados de concentração plasmática, ele se liga ao sítio ativo da integrase, e impede que esta enzima se ligue ao ácido ribonucleico (RNA) viral, ou seja, bloqueia a transferência da fita do retrovírus, etapa fundamental no processo de replicação do HIV. O DTG além de ser bem tolerado, destaca-se quando comparado aos demais fármacos antirretrovirais por apresentar baixo potencial para interações medicamentosas, ter tempo de meia-vida longo, atividade antiviral eficaz com apenas uma dose diária e menor risco de descontinuação de uso em decorrência de eventos adversos (VAN LUNZEN et al., 2012).

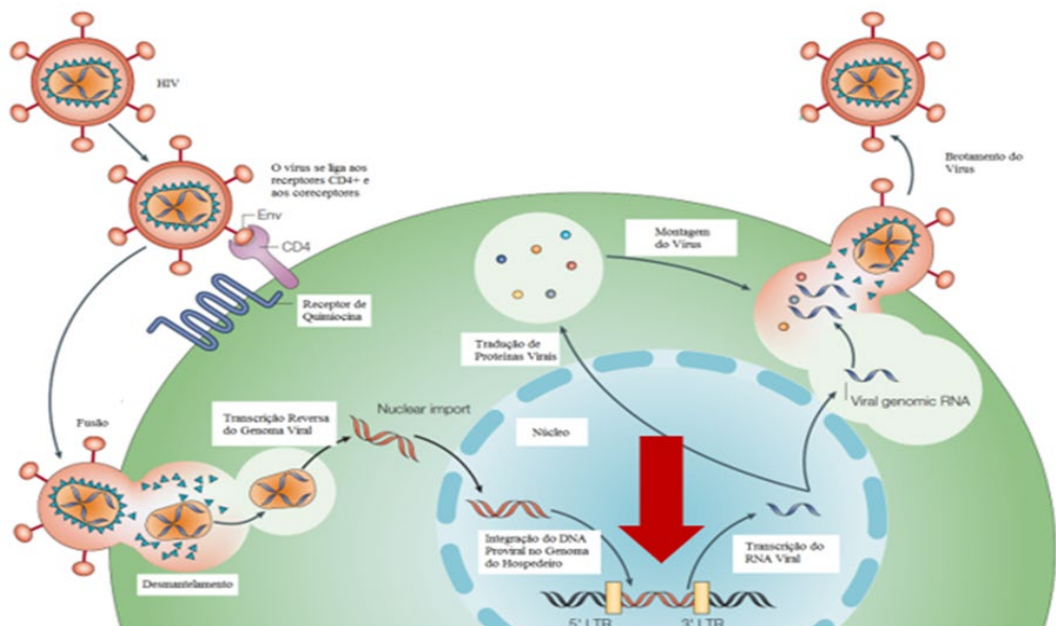


Figura 04: Ilustração com destaque para ponto de ação do inibidor de integrase (RAMBAUT et al., 2004)

2. 7 Hipótese

Uma vez que boa parte da atual terapia ARV para o controle do HIV aumenta a incidência de doenças cardiovasculares, a hipótese do presente trabalho é que o DTG, ainda que seja uma droga eficiente e promissora no controle do HIV, pode contribuir para ocorrência ou piora da disfunção endotelial na presença de LDL oxidada e, conseqüentemente, desencadear eventos vasculares negativos.

3. Justificativa

Tendo em vista o papel de destaque da LDL oxidada na disfunção endotelial e a importância desta alteração na ocorrência da aterosclerose, bem como os efeitos cardiometabólicos e vasculares indesejados dos ARV , torna-se necessário verificar o efeito do DTG sobre a disfunção endotelial induzida pela LDL oxidada. Nesse sentido, o presente trabalho demonstra ser importante e justificável, pois testa as ações do DTG sobre parâmetros ainda não testados, ao investigar a existência de alterações vasculares desencadeadas por este fármaco, em anéis de aorta torácica de camundongos. Realiza também, diversos estudos com células endoteliais humanas, com o propósito de identificar alterações em mecanismos moleculares relacionados ao estabelecimento da aterosclerose a nível celular modulados pelo DTG.

Além das razões anteriormente enumeradas para execução deste trabalho, espera-se que ele ainda possa apontar um novo caminho na busca por alternativas para minimizar os danos cardiometabólicos e vasculares do DTG. Espera-se ainda que os dados obtidos possam ser utilizados para implementação de novas estratégias terapêuticas na disfunção endotelial para controlar ou até mesmo impedir a evolução da aterosclerose e, sobretudo, que os achados possam ser utilizados pela indústria farmacêutica como instrumentos para aprimorar o fármaco e conseqüentemente propiciar melhor condição de vida aos portadores do HIV, que necessitam utilizá-lo e aos que porventura venham precisar utilizá-lo, uma vez que ainda não existe outra opção para controle do HIV, além da terapia farmacológica.

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho é avaliar o efeito do Dolutegravir sobre a disfunção vascular induzida pela LDL oxidada.

4.2 Objetivos Específicos

A - Avaliar, em anéis de aorta torácica de camundongo previamente expostos ao DTG, LDLox ou a ambos os estímulos simultaneamente:

- A contração vascular induzida por fenilefrina;
- Participação do NO no controle da resposta contrátil vascular.

B - Avaliar, em células endoteliais humanas previamente expostas ao DTG, LDLox ou a ambos os estímulos simultaneamente:

- Produção de NO e radicais superóxido;
- Expressão das isoformas: eNOS, nNOS e iNOS;
- Produção de mediadores pró-inflamatórios (CCL-2, TNF e IL-6).

5. Material e Métodos

5.1 Preparação do Dolutegravir Sódico

O Dolutegravir Sódico (PM= 441.36 g/mol) foi diluído em DMSO a uma concentração de estoque de 1 mM, aliquoteado e armazenado a -20°C até o momento dos experimentos. A concentração final utilizada de DTG foi de 1 µM ou 10 µM, com base em dados coletados na literatura (AFONSO et al., 2017). Para os experimentos de cultura por 24h, a solução de DTG foi esterilizada, através de filtração em filtro de 0.22µm. Em nenhum experimento a concentração de DMSO ultrapassou 0.1%.

5.2 Isolamento e oxidação da LDL humana

Para se avaliar o efeito de concentrações supra fisiológicas (compatíveis com a aterosclerose humana em diferentes estágios) LDL nativa humana foi isolada e oxidada de acordo com os protocolos a seguir:

a. Isolamento da LDL

Após a coleta de 10mL do sangue de indivíduo saudável (voluntário) não fumante, em tubo *Vacutainer*[®] tratado com 10% de EDTA, procedeu-se a centrifugação a 3.000 rpm por dez minutos, em centrífuga de mesa (Fanem Excelsa Baby, mod. 205N). O plasma foi coletado e adicionado os conservantes: aprotinina, benzamidina 2mM, solução de azida sódica 5% com EDTA 5% e clorafenicol 0,1% e, por fim, o PMSF 0,5mM em DMSO. O plasma teve sua densidade elevada para 1,21 (densidade da lipoproteína HDL) com solução de Brometo de potássio (KBr). 3 mL deste plasma foram colocados em tubos de polipropileno, com volume total de 10mL, próprios para ultracentrífuga Sorvall Ultra pro-80/Du Pont, utilizando o rotor 875T. Na sequência, foi adicionada solução de KBr de densidade 1,006 ao plasma até completar o volume total do tubo, formando assim o gradiente descontínuo de densidade de duas camadas. Os tubos devidamente equilibrados foram colocados para centrifugação por duas horas e meia a 50.000 rpm a 4°C para separação das lipoproteínas de alta densidade. Terminada a centrifugação, foi retirada a fase superior composta pela LDL e a amostra foi submetida à diálise em solução de tampão fosfato (PBS, pH=7,4), por um período de vinte e quatro horas a 4°C, com três trocas do

tampão. Em seguida, o material foi filtrado e guardado estéril em atmosfera de nitrogênio a 4°C, em recipiente protegido da luz. A concentração de LDL na amostra foi determinada através da dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford (CHUNG et al., 1986).

b. Oxidação da LDL

Para a oxidação da LDL, foi acrescentado CuCl_2 a 1mM, para uma concentração final de 5 μM . Após 4 h de oxidação a 37°C, sob agitação constante, a reação foi finalizada com EDTA 0,5M (proporção de 2 EDTA: 1 CuCl_2).

5.3 Estudos com anéis de aorta torácica de camundongos

5.3.1 Origem dos anéis de aorta

Os anéis de aorta utilizados nos estudos de reatividade vascular originaram-se de camundongos machos da linhagem C57BL6J, com idade a partir de 10 semanas até no máximo 16 semanas. Os animais foram obtidos no Biotério Ênio Cardillo Vieira do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), de onde foram transferidos para o biotério do Departamento de Farmacologia da UFMG, onde permaneceram até o dia de cada experimento. Neste local, os animais tiveram livre acesso à água e ração, foram mantidos em gaiolas coletivas com no máximo 5 camundongos por gaiola, em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas e temperatura controlada (20 - 26°C).

O projeto com todos os procedimentos a serem executados nos camundongos para o desenvolvimento deste trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o protocolo nº 394/2018.

5.3.2 Obtenção dos anéis de aorta

Para obtenção dos anéis de aorta, os camundongos foram submetidos à eutanásia por decapitação. Foi realizada laparotomia para isolamento e coleta da artéria aorta torácica. Após isolamento, a aorta torácica foi colocada em placa de Petri contendo solução nutriente de Krebs-Henseleit (composição em mmol/L: NaCl, 118,3;

KCl, 4,7; MgSO₄, 1,2; KH₂PO₄, 1,2; CaCl₂, 2,5; NaHCO₃, 25; C₆H₁₂O₆, 11,1) e pH 7.4. O tecido adiposo perivascular da aorta foi cuidadosamente removido e em seguida o fragmento foi seccionado em anéis de aproximadamente 3mm de comprimento. Cada anel foi transpassado por duas hastes metálicas triangulares através do lúmen e mantido na placa de Petri com solução nutritiva. No interior da capela de fluxo laminar as preparações foram lavadas com solução de Krebs estéril e acondicionadas em placas de cultura contendo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) enriquecido com 1% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) para posterior exposição aos estímulos.

5.3.3 Exposição das preparações aos estímulos e incubação

Após a coleta dos anéis de aorta, conforme descrito acima, as preparações foram expostas a LDLox (50 µg/ml) (NAVIA-PELAEZ et al., 2017), DTG (1 µM) ou simultaneamente expostas a ambos os estímulos, conforme descrito na tabela 2. Todas as preparações foram então mantidas em incubadora úmida com atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂) por 24 horas. As preparações controle foram incubadas por 24h apenas com o veículo (PBS, pH 7.4).

É importante ressaltar que somente a concentração de 1 µM do DTG foi utilizada para os experimentos de cultura dos anéis de aorta visto que, em um estudo piloto, foi verificado que as preparações que receberam a concentração 10 µM do DTG ficavam inviáveis após a incubação.

Grupos N=5	Controle	DTG	LDLox	LDLox + DTG
Exposição aos Estímulos (24 h antes)	veículo	1µM	50 µg/ml	50 µg/ml + 1µM

Tabela 2: Grupos experimentais e respectivos estímulos realizados nos anéis de aorta torácica de camundongos (C57BL6J).

5.3.4 Montagem das preparações

As preparações foram montadas em cubas para órgão isolado contendo solução de Krebs-Henseleit aerada continuamente com mistura carbogênica (95% de O₂ + 5% de CO₂), mantida à temperatura de 37°C e pH 7.4.

Para obtenção do registro de tensão, um dos triângulos foi fixado na base, e o outro conectado verticalmente a um transdutor. Os registros detectados foram obtidos com o uso de transdutores de tensão isométrica (World Precision Instruments, Inc., USA), conectados a um amplificador TBM4M, WPI, que se encontra acoplado a um computador equipado com uma placa conversora analógico-digital, que utiliza o programa Windaq Data Acquisition (Dataq Instruments, USA) para aquisição e análise dos dados experimentais.

5.3.5 Estabilização e teste de viabilidade das preparações

Após serem montadas no equipamento, as preparações foram submetidas a uma tensão de repouso de 1 g, durante 60 minutos. A tensão de 1g foi escolhida após realização de curvas de tensão, onde foi observado que nesta tensão foi detectada a contração máxima ao agente despolarizante cloreto de potássio (KCl). A tensão foi monitorada e, quando necessário, regulada ao longo deste período de estabilização da preparação. Além disso, a solução nutritora foi trocada a cada 15 minutos para evitar o acúmulo de metabólitos e restaurar os níveis de glicose imprescindíveis ao metabolismo vascular.

O teste de viabilidade das preparações, realizado pelo uso de 80 mM (KCl), é imprescindível e determinante para selecionar as preparações viáveis para serem utilizadas nos estudos de reatividade vascular. Ao final deste teste, os anéis de aorta responsivos foram lavados a cada 15 minutos com a solução nutritora, quantas vezes foram necessárias para abolir o efeito do KCl.

5.3.6 Resposta contrátil à Fenilefrina

Para avaliar o efeito direto dos estímulos realizados sobre a resposta contrátil vascular, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta ao agonista α 1-

adrenérgico fenilefrina (10^{-9} a 10^{-4} mol/L). Os resultados da contração vascular foram expressos como percentual de contração em relação à contração máxima obtida com 80 mM de KCl.

5.3.7 Efeito da inibição das NOS na resposta contrátil à fenilefrina

Para se avaliar a participação da via do NO sobre o controle da contração vascular, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta induzidas por fenilefrina (10^{-9} a 10^{-4} mol/L) na presença de L-NAME, inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Após a estabilização da preparação, esta foi incubada com 300 μ M de L-NAME por 30 minutos, antes da realização da curva de fenilefrina.

O protocolo foi realizado em uma nova preparação, sem a realização de uma curva concentração-resposta prévia à fenilefrina, devido ao longo tempo de incubação das preparações, que poderia ocasionar possível perda de viabilidade após sucessivas curvas de contração. Desta forma as curvas com o inibidor foram realizadas de forma não pareada. Os resultados foram expressos como percentual de contração em relação a contração máxima obtida com agente despolarizante KCl.

5.4 Estudos Células Endoteliais Humanas

5.4.1 Modelo Celular - Linhagem: EA.hy926

Foram utilizadas células endoteliais humanas da linhagem EA.hy926 para realização dos estudos *in vitro*. As células desta linhagem são hibridomas derivadas das células HUVEC, apresentam fenótipo endotelial preservado e possuem alta taxa de multiplicação celular.

5.4.2 Teste de Viabilidade Celular após Exposição a Estímulos e Incubação

Para se avaliar o efeito da exposição a diferentes estímulos sobre a viabilidade celular, foi escolhido o método de citometria de fluxo e utilizada a sonda fluorescente iodeto de propídio (PI; Propidium iodide-10 μ g/ml; Sigma, USA). O PI é capaz de detectar morte celular pois só consegue permear a membrana celular de células em

processo de morte (FRIED; PEREZ; CLARKSON, 1976). Em resumo, as células foram plaqueadas a uma densidade de 1×10^6 células por poço, em placa de 6 poços, e foram estimuladas por 24 h com diferentes concentrações de LDLox (25, 50 ou 80 $\mu\text{g/ml}$) e/ou DTG (1 ou 10 μM). Ao término do período de incubação, as células foram coletadas com o auxílio de tripsina 0,5%, lavadas e ressuspensas em solução salina balanceada de Hanks (HBSS, 1x). Foi realizada a marcação com a referida sonda pelo tempo de 1 minuto, para posterior análise no equipamento FACS Calibur system (BD, USA). Os resultados foram analisados por meio do software FlowJo e expressos pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI) positiva para o canal FL3 (PI) e o seu deslocamento comparado ao controle positivo de morte (PBS + DMSO 1%).

5.4.3 Protocolo de Exposição aos Estímulos e Incubação

As células endoteliais foram mantidas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) completo, enriquecido com 10% de SFB e 100 U/ml de penicilina e 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina. Para a realização dos experimentos foram utilizadas placas estéreis para cultivo celular de 6 poços. Quando preciso, lamínulas estéreis foram inseridas no interior dos poços.

As células foram plaqueadas na densidade de 1×10^6 células/poço com meio de cultura DMEM completo. O SFB do meio de cultura foi reduzido a 1%, por no mínimo 24 horas antes da realização de cada experimento, para evitar que as células entrassem em processo de divisão celular no decorrer dos estudos e compromettesse os resultados. A exposição aos estímulos foi realizada conforme a tabela 3. Ao final dessa etapa, as placas foram imediatamente transferidas para a estufa biológica, onde as células permaneceram incubadas por 24 horas, na temperatura de 37°C na presença de dióxido de carbono (CO_2).

Encerrado o período de incubação as células e o sobrenadante de cada poço foram devidamente coletados e armazenados em recipientes identificados, para serem submetidos aos experimentos definidos neste trabalho: citometria de fluxo, teste Elisa e experimentos de imunofluorescência.

Grupos N=5	Controle	DTG	LDLox	LDLox + DTG
Exposição aos Estímulos (24 h antes)	veículo	1µM E 10µM	50 µg/ml	50 µg/ml + 1µM E 50 µg/ml + 10µM

Tabela 3: Grupos experimentais e respectivos estímulos realizados nas células endoteliais (EA.hy926).

5.4.4 Dosagem de NO e superóxido por citometria de fluxo

A dosagem de NO e de radicais superóxido foram realizadas por citometria de fluxo através da utilização das sondas DAF-FM (4-Amino-5methylamino-2',7'-difluorofluorescein, 2,5µM; Invitrogen, USA) e DHE (diidroetidio, 2,5 µM; Invitrogen, USA), respectivamente. Antes da finalização do período de incubação de 24h, as células foram tratadas com Acetilcolina (ACh) 10 µM ou veículo por mais 30 minutos. Após este procedimento, as células foram carregadas com as sondas fluorescentes intracelulares citadas, diluídas em meio DMEM sem vermelho de fenol. O período de incubação com estas sondas foi de 30 minutos em ambiente escuro, em incubadora biológica com 5% de CO₂ na temperatura de 37°C. As células foram então desaderidas com tripsina-EDTA por 2 minutos nas placas. Ao término deste intervalo de tempo, a tripsina foi inativada, com o acréscimo de meio para cultivo celular contendo 10% de SFB sem vermelho de fenol. Em seguida as células foram transferidas para placas de 96 poços com fundo em "u" e submetidas a processo de centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm. Finalizada a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com 100 µL de paraformaldeído a 2% e 100 µL de PBS (pH=7,4).

A leitura foi realizada no citômetro FACScalibur (BD Biosciences) e os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do software FlowJO. A média de fluorescência foi multiplicada pela porcentagem de células marcadas da população total e o resultado foi expresso como fluorescência média ± EPM.

5.4.5 Análise da Expressão Proteica das isoformas da NOS (eNOS, nNOS e iNOS) por imunofluorescência

A detecção da expressão proteica da nNOS, eNOS e iNOS foi realizada por imunofluorescência, através da utilização de anticorpos anti-nNOS (1:100; monoclonal feito em coelho; Santa Cruz), anti-eNOS (1:100; monoclonal feito em coelho; Santa Cruz), e anti-iNOS (1:100; monoclonal feito em camundongo; Santa Cruz). As células foram plaqueadas em lâminas de vidro pré-tratadas com gelatina a 0,1%. Após a exposição das células endoteliais aos estímulos e incubação por 24 horas, estas foram fixadas com paraformaldeído a 4% e, em seguida foram lavadas com PBS + 0,3% de TritonX-100, submetidas a bloqueio com 5% de BSA, em PBS + 0,3% de TritonX-100 durante 30 minutos. Ao final deste processo de incubação com os anticorpos primários específicos (anti-eNOS, anti-nNOS e anti-iNOS; Santa Cruz Biotecnologia, USA), as células foram incubadas com anticorpos secundários conjugados aos fluoróforos Alexa Fluor 488, 564 ou 647 (Invitrogen, USA; 1:500). O núcleo foi evidenciado pela montagem da preparação com o DAPI mounting média (Invitrogen, USA). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Eclipse Ti Nikon do Centro de Aquisição e Processamento da Imagem (CAPI) do ICB da UFMG. Por último as imagens capturadas foram analisadas pelo software ImageJ e expressos como intensidade de fluorescência média por campo (média \pm EPM).

5.4.6 Análise de mediadores pró-inflamatórios por ELISA

Os sobrenadantes celulares coletados ao término do período de incubação foram submetidos ao teste Elisa, para quantificação da produção de mediadores pró-inflamatórios. Foram quantificadas a produção das citocinas TNF e IL-6, bem como da quimiocina CCL2, através de kits comercialmente disponíveis (BD Biosciences - BD OPTeia, USA). Todos os experimentos foram executados de acordo com as recomendações do fabricante e os cálculos para aferição das concentrações dos mediadores foram feitos a partir de curvas padrão, realizadas a cada experimento.

5.5 Análises estatísticas e expressão dos resultados

Para realização das análises estatísticas e expressão dos resultados foi utilizado o programa GraphPad Prisma (Versão 7.00). Os resultados obtidos nas curvas concentração-resposta à fenilefrina, foram representados como percentual da contração máxima obtida com 80 mM de KCl. As curvas concentração-resposta cumulativas foram analisadas ponto-a-ponto através do método two-way ANOVA para medidas repetidas. Na sequência foram executados pós-testes de comparação do tipo BONFERRONI. Os valores de E_{max} encontrados foram determinados através de regressão não linear a partir das curvas obtidas nos experimentos e o E_{max} considerado para cada tratamento, é o ponto onde foi obtido o efeito máximo, ou seja, onde foi detectada a maior contração.

Todos os resultados obtidos das medidas de dosagem de NO e superóxido, realizados por meio de citometria de fluxo, bem como os resultados das medidas de dosagem dos mediadores pró-inflamatórios, encontrados após realização do teste Elisa e os resultados das medidas indiretas da expressão proteica das isoformas da NOS, por imunofluorescência, foram expressos como média \pm EPM. Teste de Grubbs foi realizado para identificação de outliers e todos os resultados foram comparados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias. Demais resultados encontrados foram submetidos ao teste t de student não pareado. Todos os resultados encontrados através dos experimentos realizados com as células endoteliais encontram-se expressos por meio de gráficos de barras. Todos os experimentos realizados foram considerados significativos para valores de $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1 Resultados dos Estudos com os Anéis de Aorta

6.1.1 Efeito da Exposição e Incubação com LDLox, DTG e a Ambos os Estímulos sobre a Resposta Contrátil Induzida pela Fenilefrina

A exposição dos vasos a LDLox (50 $\mu\text{g/ml}$) promoveu significativa redução da resposta contrátil induzida pela fenilefrina, em comparação ao controle (Figura 5; $p < 0.05$). A co-incubação do DTG (1 μM) com LDLox não alterou o padrão de resposta contrátil em relação a resposta com LDLox sozinha (Figura 5). Contudo, o tratamento com o DTG sozinho aumentou significativamente a contração induzida pela fenilefrina, em relação ao controle (Figura 5; $p < 0.001$) e a co-incubação com LDLox + DTG (Figura 5; $p < 0.001$). Os valores de E_{max} (resposta máxima) obtidos nas curvas de contração-resposta a fenilefrina estão disponíveis na tabela 4 que se segue, com a finalidade de se confirmar os dados obtidos a partir das análises de comparação entre as curvas.

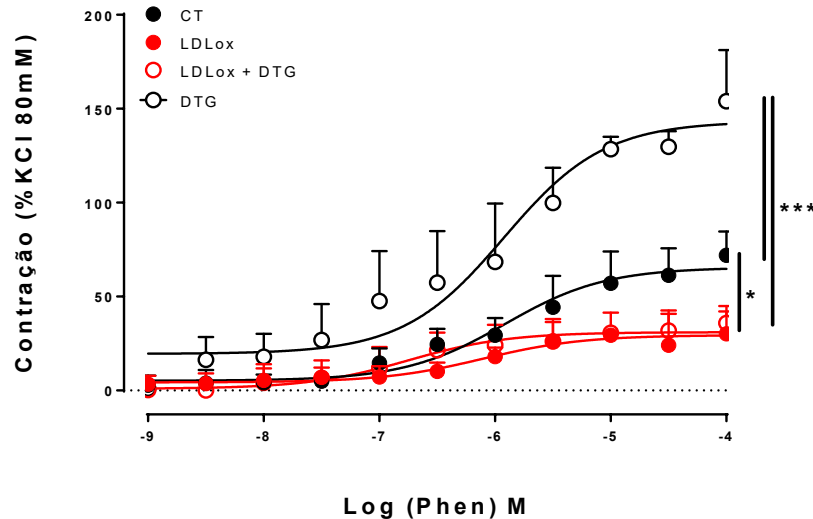


Figura 05. Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de camundongo expostos e incubados com LDLox (50 $\mu\text{g/ml}$), DTG (1 μM), ambos os estímulos e controle com veículo (PBS). (n= 5) * $p < 0,05$; *** $p < 0,01$.

Controle	DTG	LDLox	LDLox + DTG
65,5±2,9	143,3±6,6	29,4±2,8	31,0±2,1

Tabela 4: Valores de (Emax) obtidos a partir nas curvas de contração induzida por fenilefrina.

6.1.2 Participação do NO na Resposta Contrátil após Exposição e Incubação com LDLox, DTG e a Ambos os Estímulos

A participação do NO na resposta contrátil induzida por fenilefrina após exposição dos vasos a LDLox (50 µg/ml) foi avaliada através da incubação das preparações com L-NAME. Conforme esperado, o L-NAME aumentou a contração induzida pela fenilefrina no controle (Figura 6A, $p < 0.001$). O L-NAME também aumentou a contração dos vasos tratados com LDLox, a níveis similares ao controle (Figura 6A, $p < 0.001$). Contudo, o aumento da contração induzido pelo tratamento com L-NAME foi significativamente maior nos vasos incubados com LDLox (Figura 6A, $p < 0.001$). Este resultado pode ser mais bem visualizado no gráfico de análise do delta da área sob a curva em presença do L-NAME (Figura 6B, $p < 0.001$). O maior delta nas preparações incubadas com LDLox reforçam a ideia de que a redução na contração foi devida a uma maior biodisponibilidade de NO.

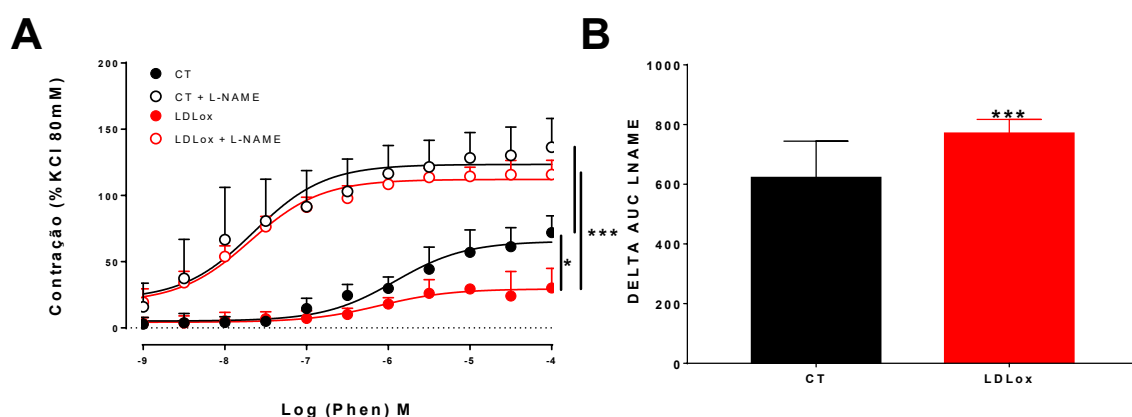


Figura 06. A: Efeito da inibição das NOS com L-NAME (300 µM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em anéis de aorta controle e em anéis expostos e incubados com LDLox (50 µg/ml). **B:** Delta da área sob a curva das preparações com e sem L-NAME. (n=5). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Assim como nos resultados da incubação somente com a LDLox, a inibição das NOS com o L-NAME nas preparações onde houve co-incubação do DTG com a LDLox também aumentou a contração em níveis semelhantes ao controle (Figura 7A, $p < 0.001$). O delta da área sob a curva em presença do L-NAME também é maior na co-incubação LDLox + DTG (Figura 7B, $p < 0.001$) sugerindo que o tratamento com o DTG não inibe a redução da contração induzida pela LDLox via aumento de NO.

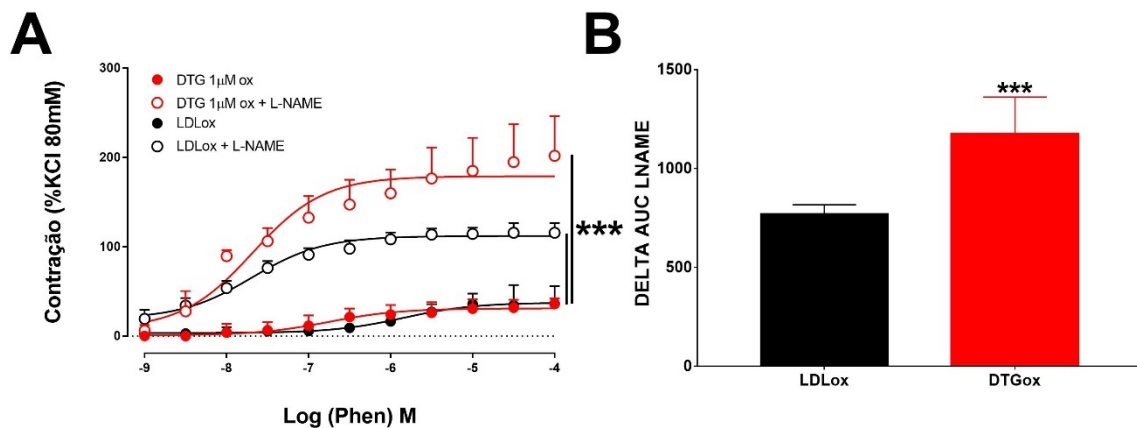


Figura 07. A: Efeito da inibição das NOS com L-NAME (300 μ M) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em anéis de aorta expostos e incubados com LDLox (50 μ g/ml) ou LDLox (50 μ g/ml) + DTG (1 μ M). **B:** Delta da área sob a curva das preparações com e sem L-NAME. (n=5) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Diferentemente do que aconteceu com as preparações incubadas com LDLox, a incubação com DTG sozinho aumentou a contração induzida pela fenilefrina (Figura 8A, $p < 0.001$). Além disso, a inibição das NOS com L-NAME aumentou a contração de maneira mais discreta na presença do DTG que no controle (Figura 8A, $p < 0.05$). Este dado, somado ao dado da redução do delta da área sob a curva em presença do L-NAME (Figura 8B, $p < 0.001$), sugere que, sozinho, o DTG reduz a biodisponibilidade do NO.

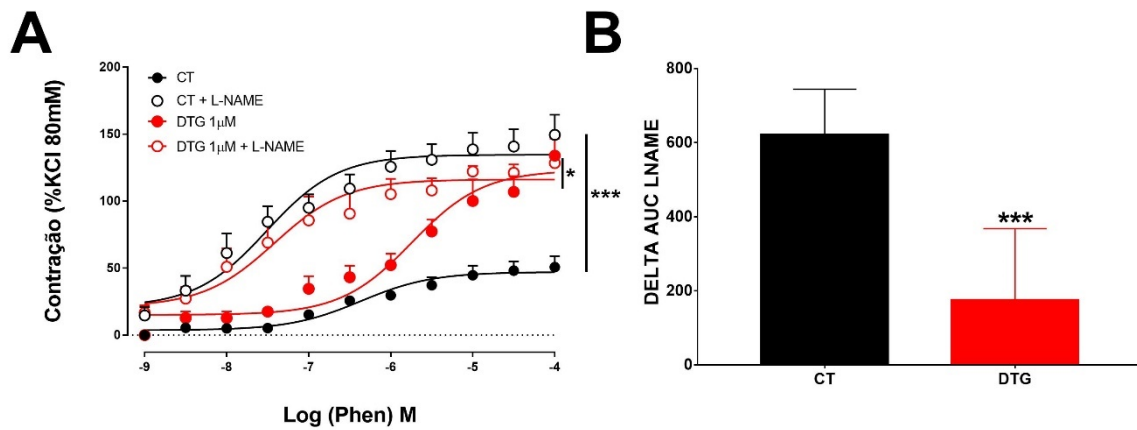


Figura 08. A: Efeito da inibição das NOS com L-NAME (300 μ M) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em anéis de aorta controle e em anéis expostos e incubados com DTG (1 μ M). **B:** Delta da área sob a curva das preparações com e sem L-NAME. (n=5) * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001.

Contudo, ao comparar a resposta da LDLox com a co-incubação LDLox + DTG, pode-se observar duas situações: 1) a co-incubação com o DTG não modifica o padrão de resposta da LDLox; 2) o L-NAME potencializou a resposta contrátil dos vasos co-incubados, em comparação a incubação com a LDLox sozinha (Figura 8A, p <0.001). Os dados do delta da área sob a curva (Figura 8B, p <0.001) demonstram de forma mais clara que o DTG potencializa a produção basal de NO nos vasos tratados com LDLox.

6.1.3 Conclusão Parcial 1

A LDLox foi capaz de induzir disfunção vascular caracterizada pela redução da resposta contrátil a fenilefrina pelo aumento da biodisponibilidade de NO. O DTG não reverteu os efeitos da LDLox sobre a contração, mas aumentou a biodisponibilidade de NO. Sozinho, o DTG levou a um aumento da contração associado a uma redução da biodisponibilidade de NO.

6.2 Resultados dos Estudos com as Células Endoteliais

6.2.1 Viabilidade Celular

O possível efeito citotóxico dos tratamentos utilizados no estudo foi verificado através de experimentos de citometria de fluxo utilizando-se como marcador a sonda iodeto de propídio (PI). A exposição das células endoteliais por 24h a LDLox nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/ml}$ não foi capaz de induzir morte celular (Figura 9). Contudo, a concentração de 80 $\mu\text{g/ml}$ reduziu a viabilidade das células (Figura 9, $p < 0.0001$). Por esta razão e a outras referências encontradas na literatura científica, foi utilizada a concentração 50 $\mu\text{g/ml}$ de LDLox neste trabalho para induzir a disfunção endotelial. Além disso esta é a maior concentração testada, que não alterou a viabilidade. A incubação com o DTG nas concentrações de 1 ou 10 μM , sozinho ou concomitante a 50 $\mu\text{g/ml}$ de LDLox, não alterou a viabilidade celular (Figura 9), sugerindo que os resultados obtidos não sofreram interferência do processo de morte celular pelos tratamentos. O DMSO (5%) foi utilizado como controle positivo para indução de morte celular.

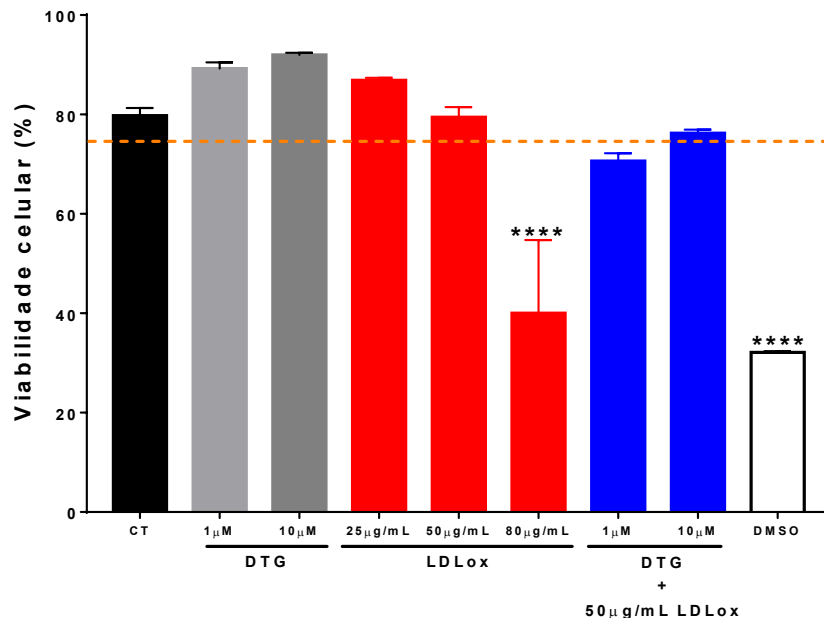


Figura 9. Viabilidade das células endoteliais em resposta à exposição a diferentes estímulos e incubação por 24 horas. Experimento de citometria de fluxo realizado através de marcação com a sonda iodeto de propídio. Os resultados são representativos de uma média de 5

experimentos isolados, nos quais foram analisados 10.000 eventos em cada experimento. Os dados são expressos como média \pm EPM. **** $p < 0,0001$.

6.2.2 Avaliação dos Níveis de NO e Radicais Superóxido nas Células Endoteliais por Citometria de Fluxo

O efeito da incubação das células endoteliais com LDLox e DTG, bem como a co-incubação com ambos os estímulos, sobre os níveis de NO e radicais superóxido, foi avaliado com o auxílio das sondas fluorescentes DAF e DHE, respectivamente, através de estudos de citometria de fluxo. Foram analisadas células no estado basal e estimuladas com acetilcolina.

6.2.2.1 Determinação dos Níveis Basais de NO pelas Células Endoteliais

A dosagem da produção basal de NO revelou que a LDLox foi capaz de aumentar a biodisponibilidade de NO (Figura 10). A co-incubação com o DTG reduziu parcialmente o aumento dos níveis de NO detectado, comparados a incubação com a LDLox sozinha (Figura 10). O DTG sozinho, em ambas as concentrações testadas, não alterou os níveis basais de NO comparados ao controle (Figura 10).

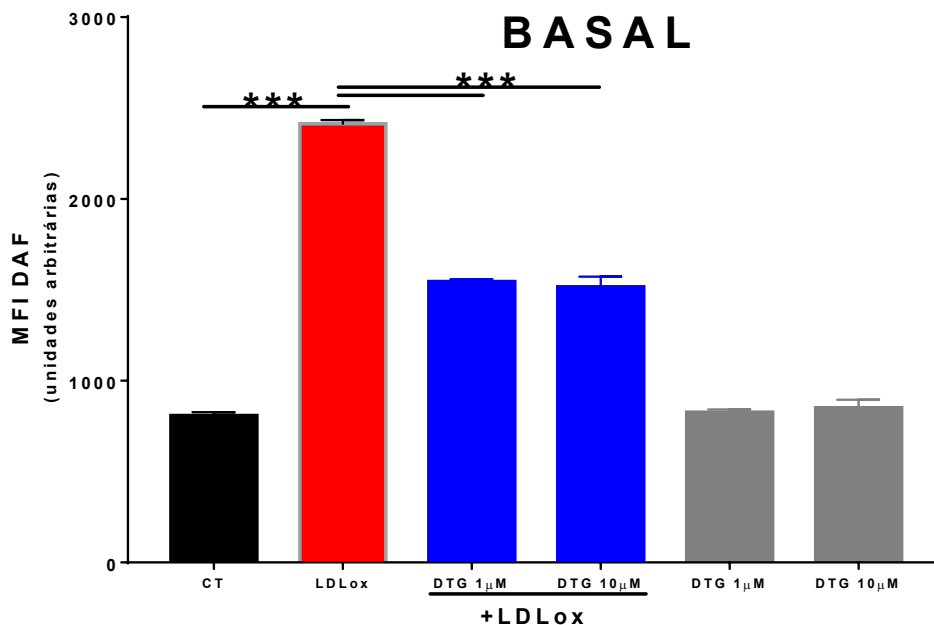


Figura 10. Detecção basal de NO pelas células endoteliais incubadas com LDLox, DTG ou com ambos os estímulos. Os resultados são representativos de uma média de 5 experimentos

isolados. Foram analisados 10.000 eventos de fluorescência a cada experimento. Os dados são expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$.

6.2.2.2 Determinação dos Níveis de NO pelas Células Endoteliais Estimuladas com ACh

Os níveis de NO pelas células endoteliais estimuladas com ACh ao término do período de incubação, revela que LDLox aumentou os níveis de NO (Figura 11). A co-incubação com o DTG reduziu o aumento dos níveis de NO quanto comparados a LDLox (Figura 11), em ambas as concentrações de DTG testadas. Além disso, o DTG sozinho, em ambas as concentrações, reduziu discretamente os níveis de NO (Figura 11).

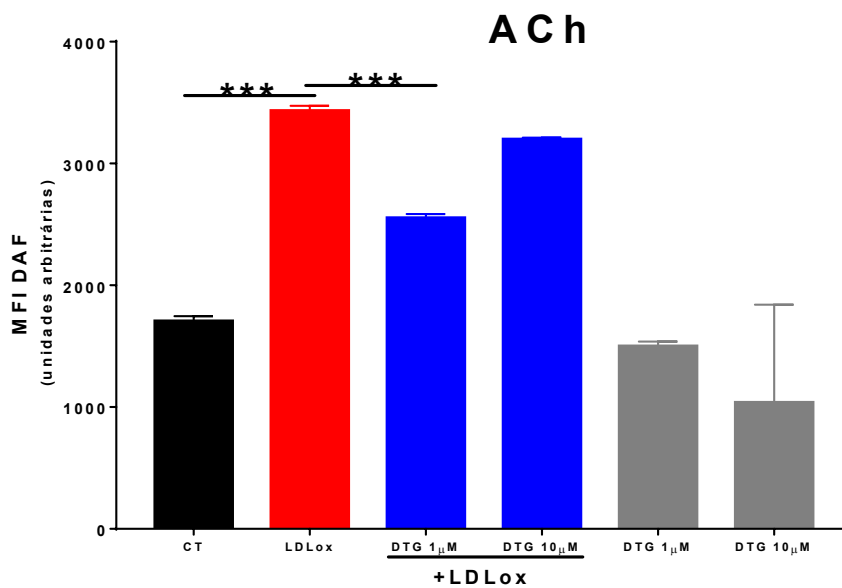


Figura 11. Produção de NO pelas células endoteliais expostas e incubadas com LDLox, DTG e ambos os estímulos, seguida de estimulação com ACh 30 minutos antes do término do período de incubação. Os resultados são representativos de uma média de 5 experimentos isolados. Foram analisados 10.000 eventos de fluorescência a cada experimento. Os dados são expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$.

6.2.2.3 Determinação dos Níveis Basais de Radicais Superóxido pelas Células Endoteliais

A dosagem basal de radicais superóxido pelas células endoteliais, de forma surpreendente, mostrou que a LDLox reduziu os níveis do mesmo (Figura 12). A co-incubação mostrou que o DTG não alterou os níveis de radicais superóxido quando comparados ao tratamento somente com a LDLox (Figura 12). Sozinho, o DTG reduziu discretamente os níveis de radicais superóxido, quando comparado ao controle (Figura 12).

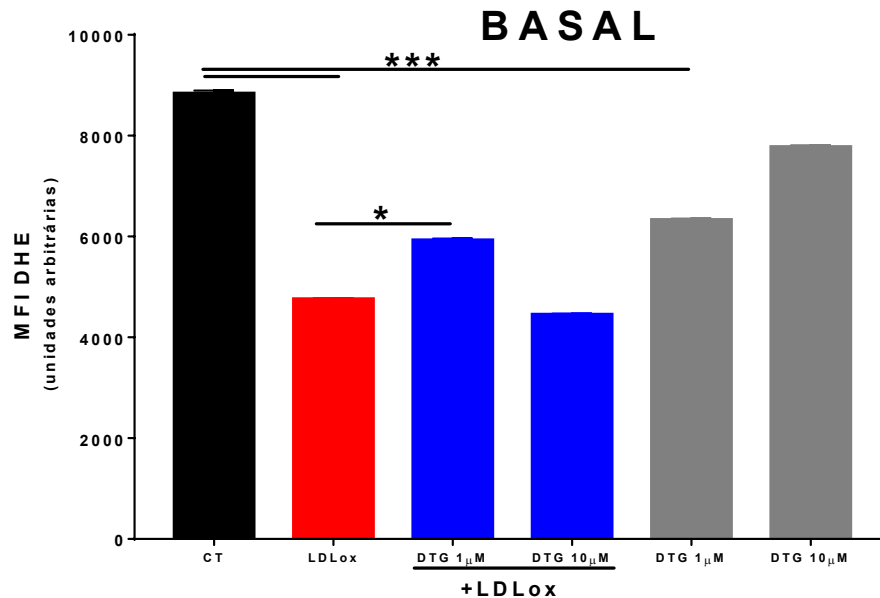


Figura 12. Produção de radicais superóxido pelas células endoteliais expostas e incubadas com LDLox, DTG e ambos os estímulos no estado basal. Os resultados são representativos de uma média de 5 experimentos isolados. Foram analisados 10.000 eventos de fluorescência a cada experimento. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

6.2.2.4 Determinação dos Níveis de Radicais Superóxido pelas Células Endoteliais Estimuladas com ACh

Diferentemente dos níveis basais, a LDLox aumentou significativamente os níveis de radicais superóxido após o estímulo com ACh, comparado ao controle (Figura 13). A co-incubação com DTG não alterou os níveis estimulados de radicais

superóxido, comparados a LDLox (Figura 13). Sozinho, o DTG aumentou discretamente os níveis de radicais superóxido, comparados ao controle (Figura 13).

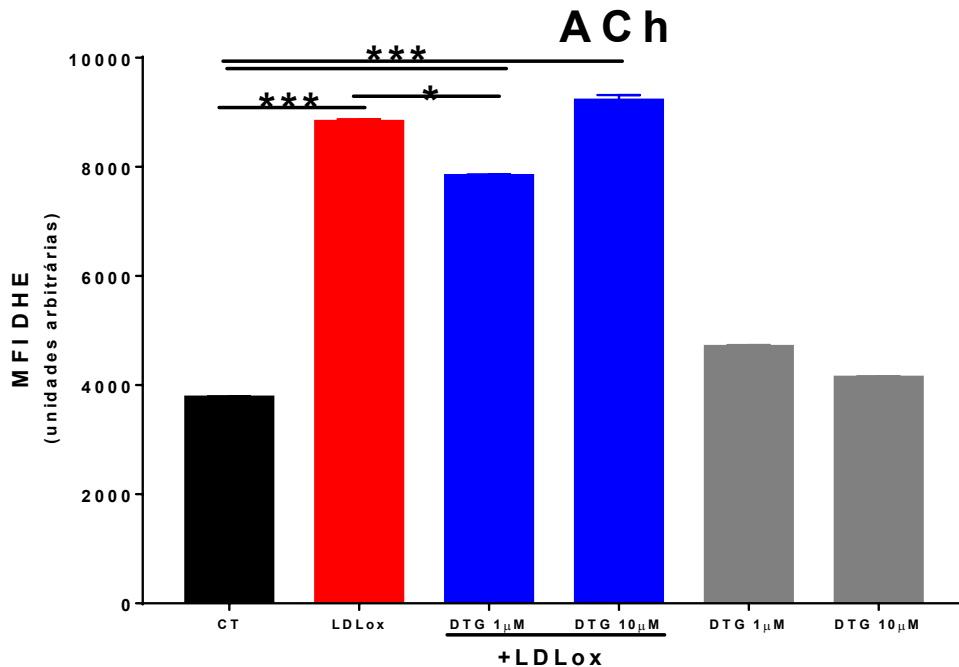


Figura 13. Produção de superóxido pelas células endoteliais expostas e incubadas com LDLox, DTG e ambos os estímulos, seguida de estimulação com ACh 30 minutos antes do término do período de incubação. Os resultados são representativos de uma média de 5 experimentos isolados. Foram analisados 10.000 eventos de fluorescência a cada experimento. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$; *** $p < 0,001$.

6.2.2.5 Conclusões Parciais 2

O tratamento com a LDLox aumenta os níveis de NO tanto no estado basal quanto após o estímulo com ACh. O DTG, concomitante a LDLox, foi capaz de reduzir de maneira mais importante o aumento da produção basal de NO do que o estimulado pela ACh.

Quanto aos níveis de radicais superóxido, a LDLox reduz os níveis basais, mas aumenta os níveis após o estímulo com ACh. O DTG não altera os efeitos da LDLox no estado basal ou estimulado.

6.2.3 Avaliação da Expressão de eNOS, nNOS e iNOS por Imunofluorescência

A expressão das isoformas constitutivas (eNOS e nNOS) e induzida (iNOS) da enzima NOS, foi avaliada por meio de estudos de imunofluorescência. O tratamento com LDLox reduziu a expressão da eNOS (Figura 14) e da nNOS (Figura 15) mas aumentou a expressão da iNOS (Figura 16). A co-incubação com o DTG na concentração de 1 μ M não preveniu a redução da expressão da eNOS (Figura 14) e nNOS (Figura 15). Por outro lado, a co-incubação com o DTG na concentração maior de 10 μ M preveniu somente a redução da expressão da eNOS (Figura 14) mas não da nNOS (Figura 15). Ambas as concentrações de DTG preveniram o aumento da expressão da iNOS induzido pela LDLox (Figura 16). Sozinho, o DTG reduz a expressão da eNOS (Figura 17) e da nNOS (Figura 18) mas não altera a expressão da iNOS (Figura 19).

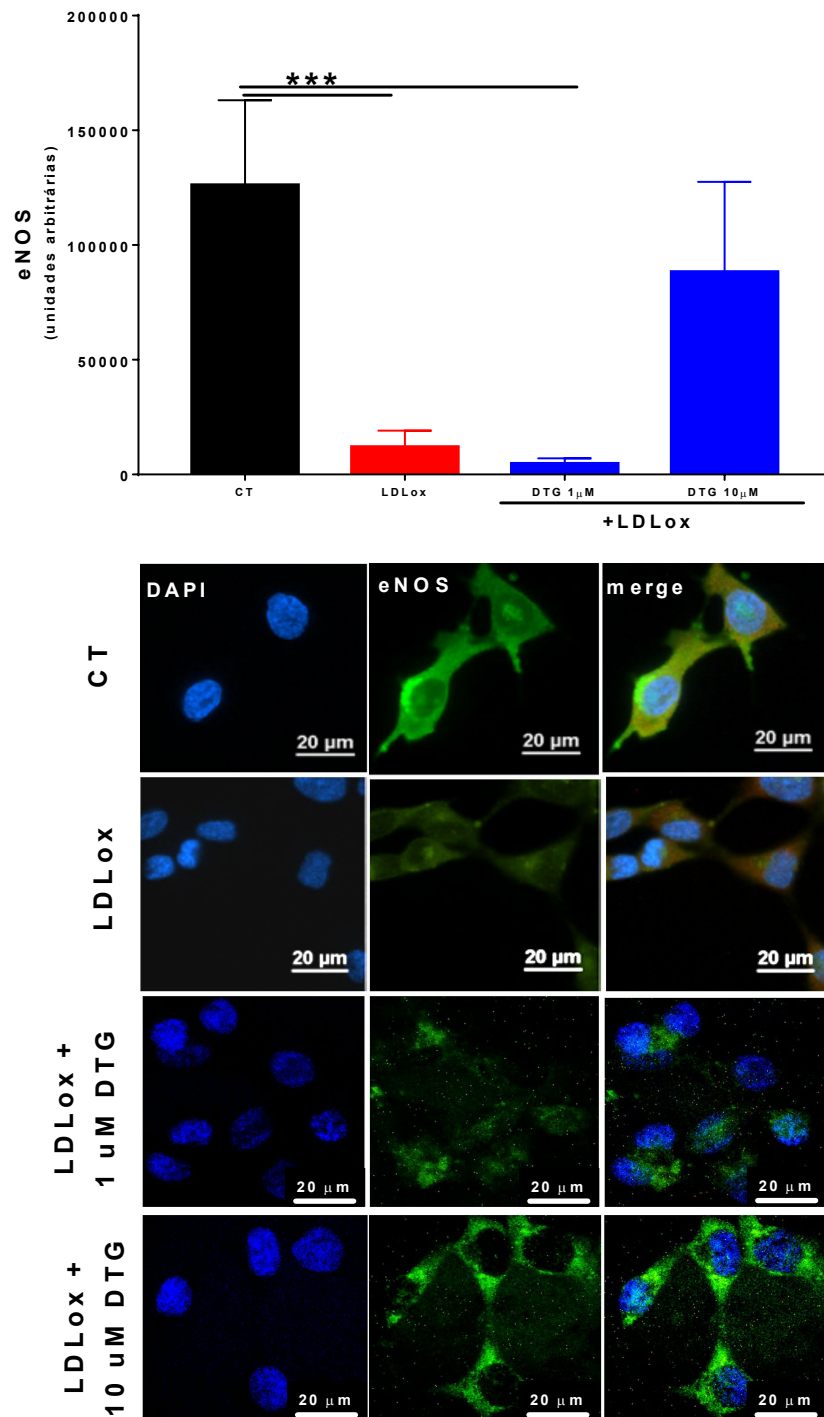


Figura 14. Expressão da eNOS por imunofluorescência, em células endoteliais incubadas somente com LDLox ou co-incubadas com LDLox + DTG, nas concentrações de 1μM e 10μM. **(A)** Análise da intensidade de fluorescência da eNOS em unidades arbitrárias de fluorescência. **(B)** Painel superior: células incubadas por 24 horas sem estímulos; painel inferior: células estimuladas e incubadas com LDLox e com LDLox + DTG, nas concentrações: 1μM e 10μM. Azul: marcação do núcleo com DAPI; Verde: marcação da eNOS. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão. *p<0,05; ***p<0.001.

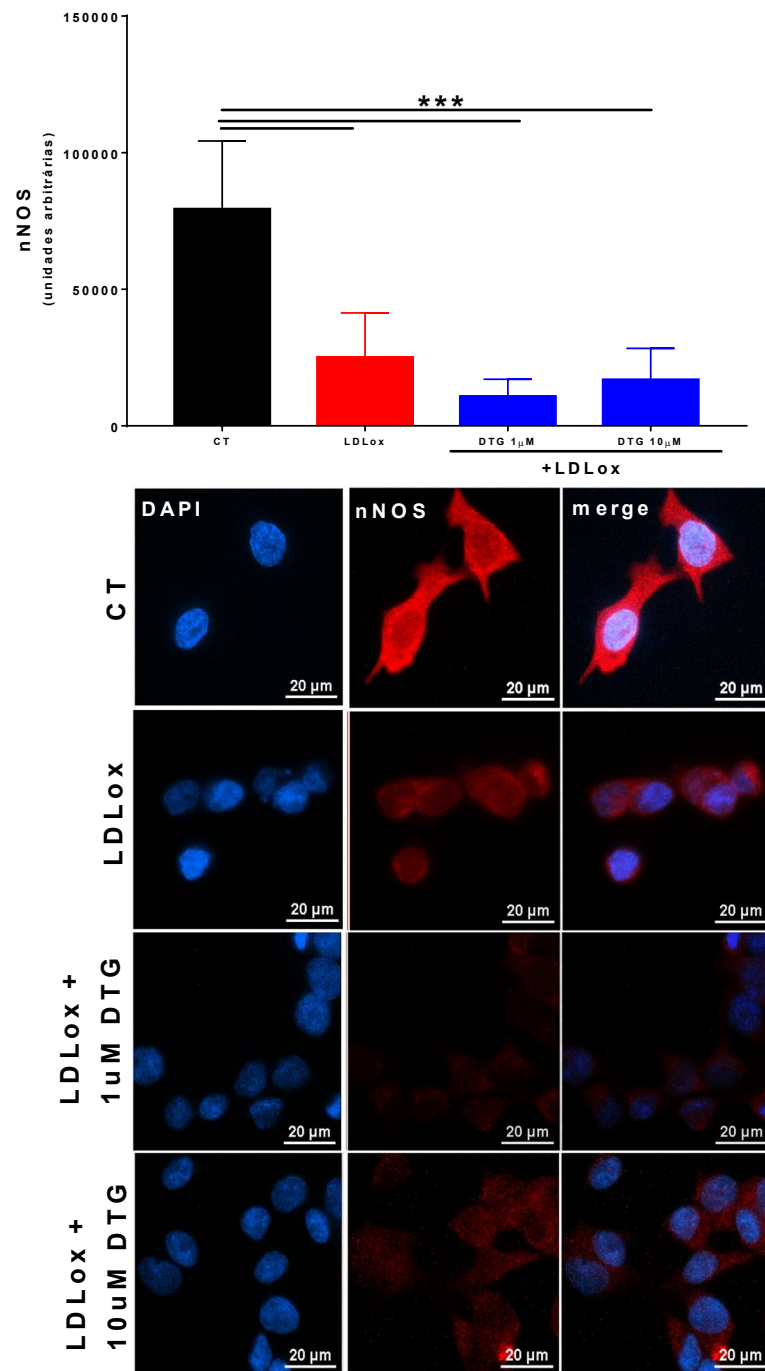


Figura 15. Expressão da nNOS por imunofluorescência, em células endoteliais incubadas somente com LDLox ou co-incubadas com LDLox + DTG, nas concentrações de 1µM e 10µM. **(A)** Análise da intensidade de fluorescência da nNOS em unidades arbitrárias de fluorescência. **(B)** Painel superior: células incubadas por 24 horas sem estímulos; painel inferior: células estimuladas e incubadas com LDLox e com LDLox + DTG, nas concentrações: 1µM e 10µM. Azul: marcação do núcleo com DAPI; Vermelho: marcação da nNOS. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão. * $p < 0,05$; *** $p < 0.001$.

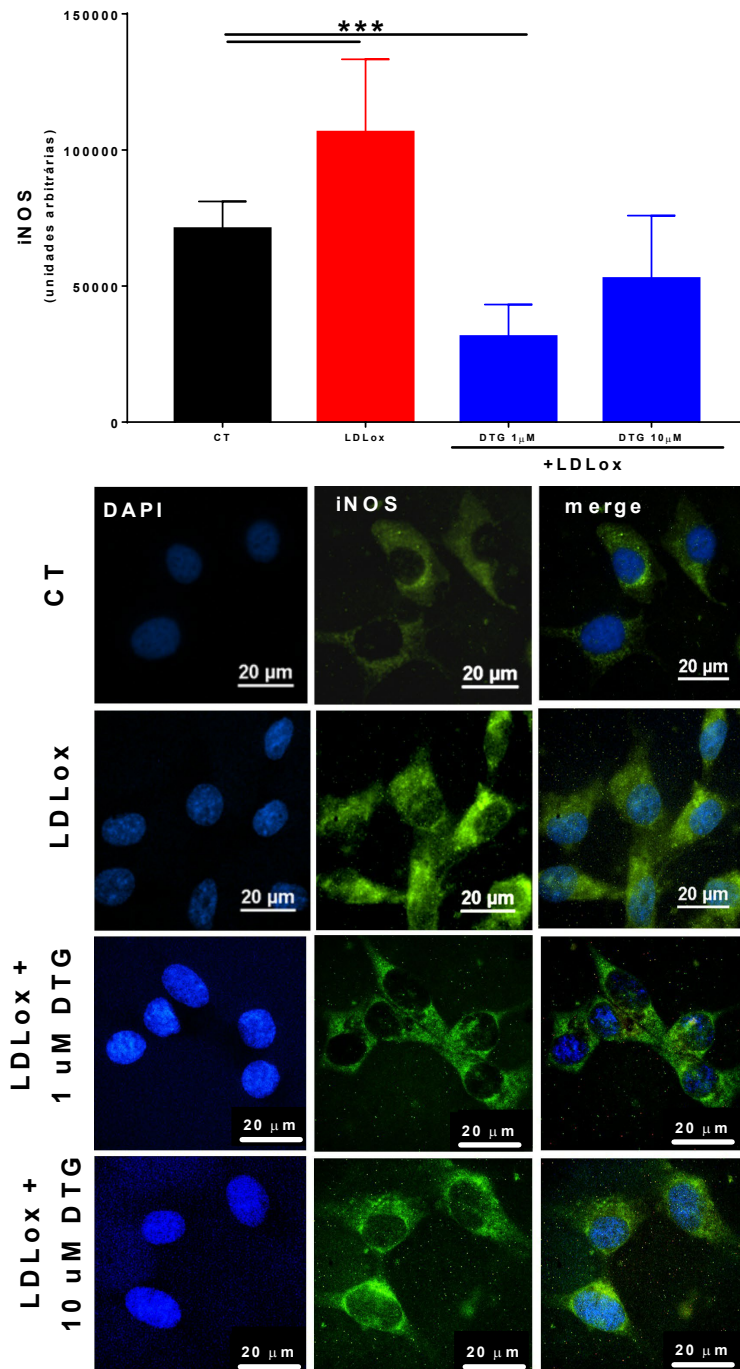


Figura 16. Expressão da iNOS por imunofluorescência, em células endoteliais incubadas somente com LDLox ou co-incubadas com LDLox + DTG, nas concentrações de 1μM e 10μM. **(A)** Análise da intensidade de fluorescência da iNOS em unidades arbitrárias de fluorescência. **(B)** Painel superior: células incubadas por 24 horas sem estímulos; painel inferior: células incubadas com LDLox e com LDLox + DTG, nas concentrações: 1μM e 10μM. Azul: marcação do núcleo com DAPI; Verde: marcação da iNOS. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão. *p<0,05; ***p<0.001.

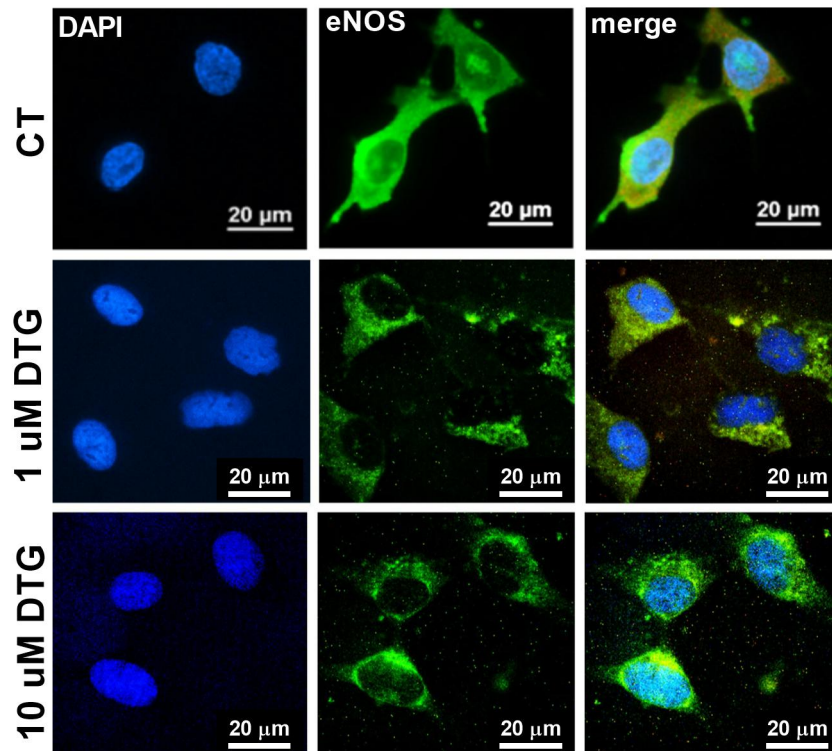
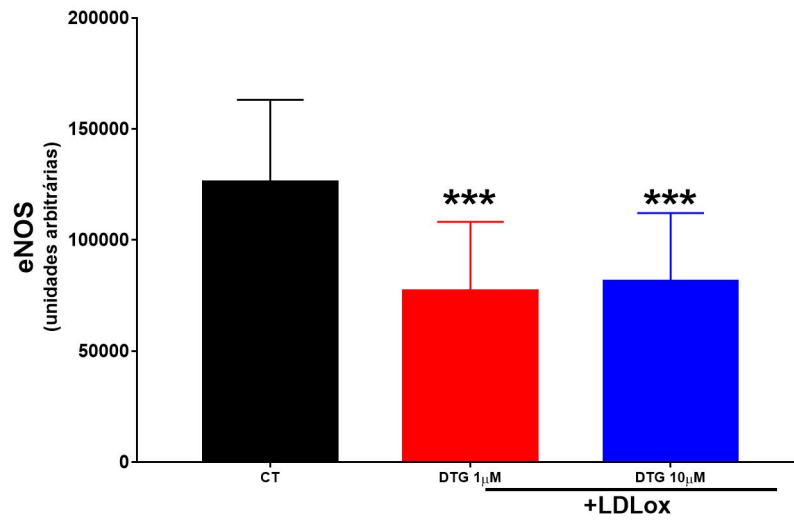


Figura 17. Expressão da eNOS por imunofluorescência, em células endoteliais incubadas somente com DTG nas concentrações de 1 μ M e 10 μ M. **(A)** Análise da intensidade de fluorescência da eNOS em unidades arbitrárias de fluorescência. **(B)** Painel superior: células incubadas por 24 horas sem estímulos; painel inferior: células estimuladas com DTG, nas concentrações: 1 μ M e 10 μ M. Azul: marcação do núcleo com DAPI; Verde: marcação da eNOS. Os valores são apresentados como média \pm Erro padrão. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

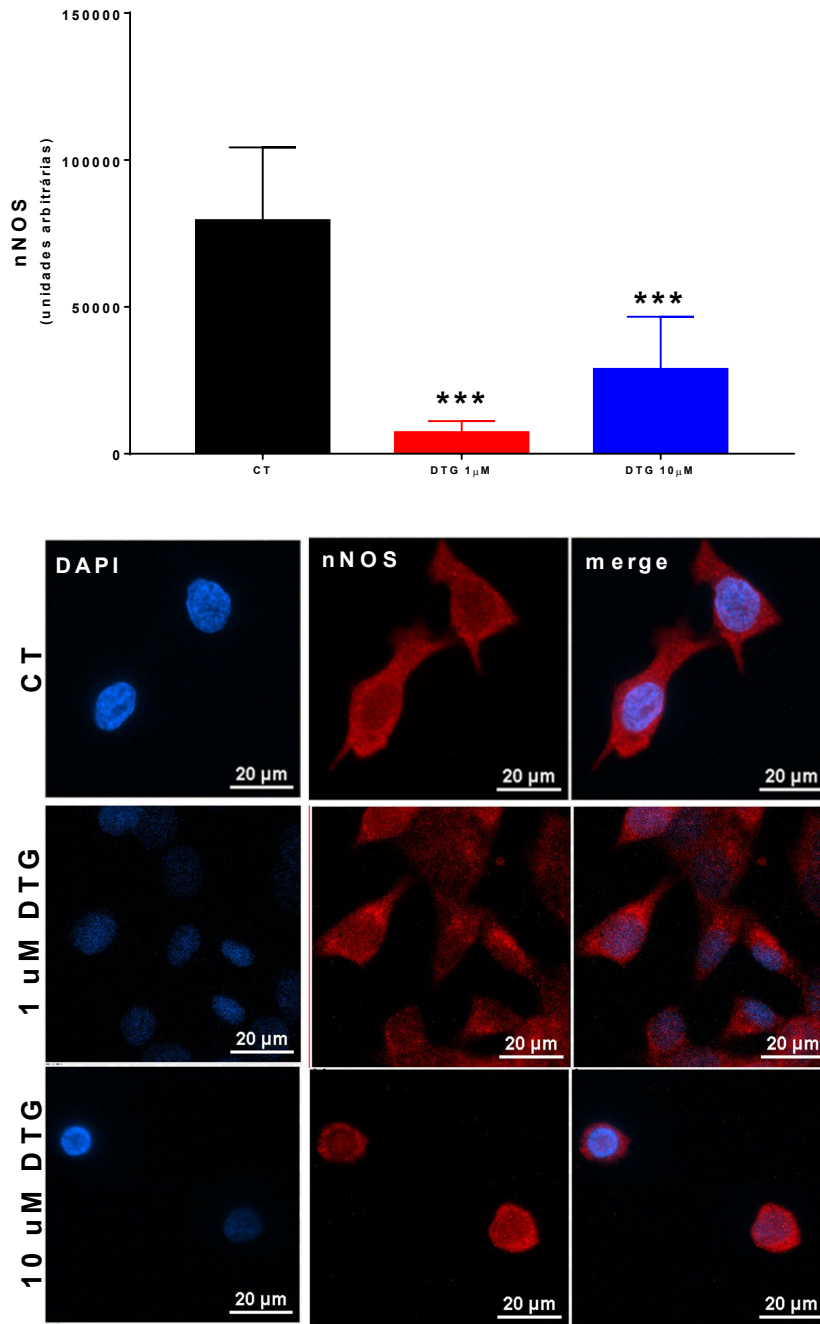


Figura 18. Expressão da nNOS por imunofluorescência, em células endoteliais incubadas somente com DTG nas concentrações de 1 μ M e 10 μ M. **(A)** Análise da intensidade de fluorescência da nNOS em unidades arbitrárias de fluorescência. **(B)** Painel superior: células incubadas por 24 horas sem estímulos; painel inferior: células estimuladas com DTG, nas concentrações: 1 μ M e 10 μ M. Azul: marcação do núcleo com DAPI; Vermelho: marcação da nNOS. Os valores são apresentados como média \pm Erro padrão. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

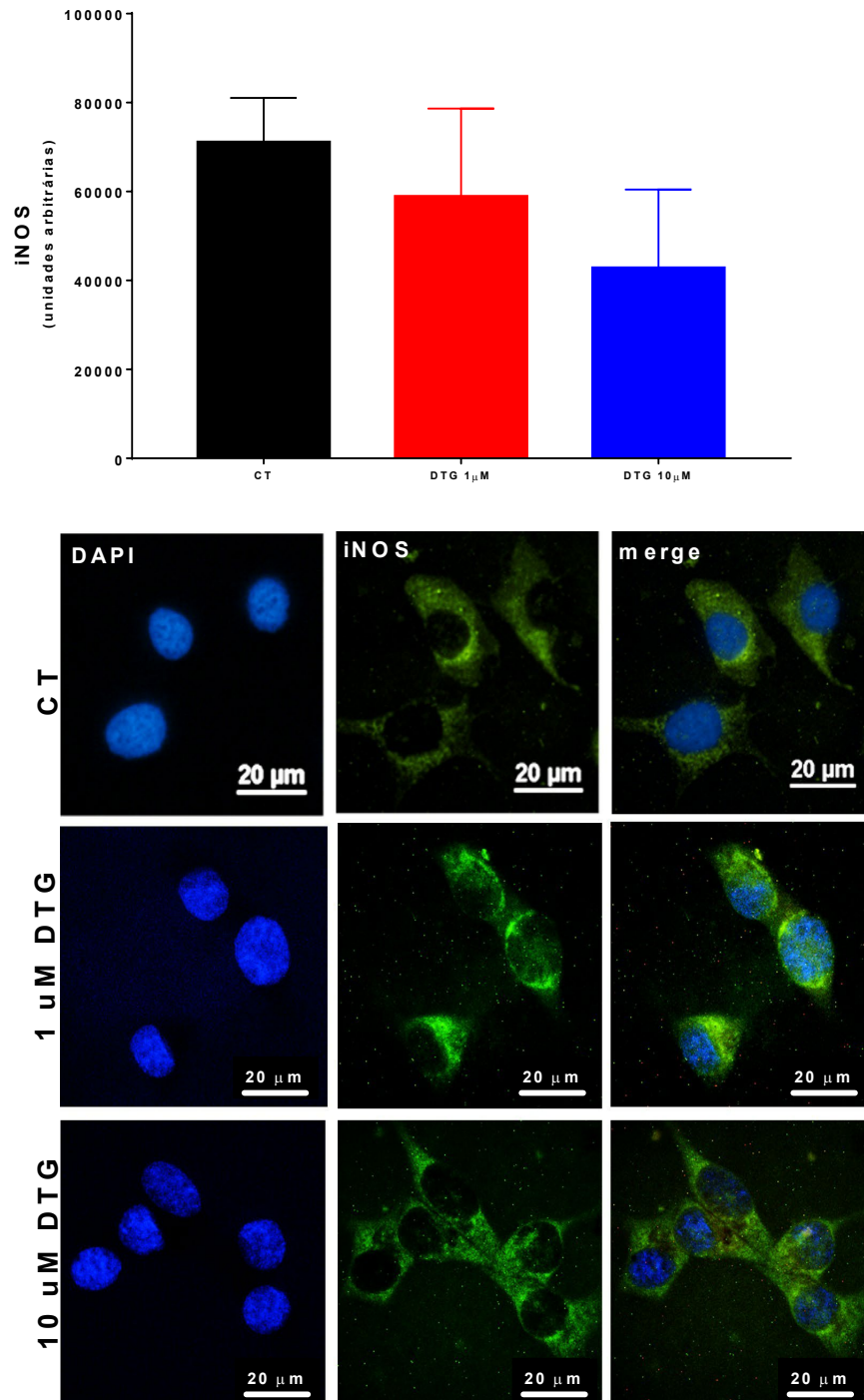


Figura 19. Expressão da iNOS por imunofluorescência, em células endoteliais incubadas somente com DTG nas concentrações de 1 μ M e 10 μ M. **(A)** Análise da intensidade de fluorescência da iNOS em unidades arbitrárias de fluorescência. **(B)** Painel superior: células incubadas por 24 horas sem estímulos; painel inferior: células estimuladas com DTG, nas concentrações: 1 μ M e 10 μ M. Azul: marcação do núcleo com DAPI; Verde: marcação da iNOS. Os valores são apresentados como média \pm Erro padrão. * $p < 0,05$; *** $p < 0.001$.

6.2.4 Produção de Mediadores Pró-inflamatórios por Elisa

O efeito da exposição das células endoteliais a LDLox, DTG e a ambos os estímulos, sobre a produção de mediadores pró-inflamatórios, foi detectado através do método Elisa nos sobrenadantes celulares. Os resultados mostraram que o tratamento com LDLox por 24h foi capaz de induzir aumento da secreção da quimiocina CCL2 (Figura 20A) e das citocinas TNF (Figura 20B) e IL-6 (Figura 20C). A co-incubação com o DTG não reverteu os aumentos nos níveis de CCL-2 (Figura 20A), TNF (Figura 20B) e IL-6 (Figura 20C) induzidos pela LDLox. Sozinho, o DTG não foi capaz de induzir qualquer alteração nos níveis de CCL-2 (Figura 20A), TNF (Figura 20B) e IL-6 (Figura 20C), comparado ao controle.

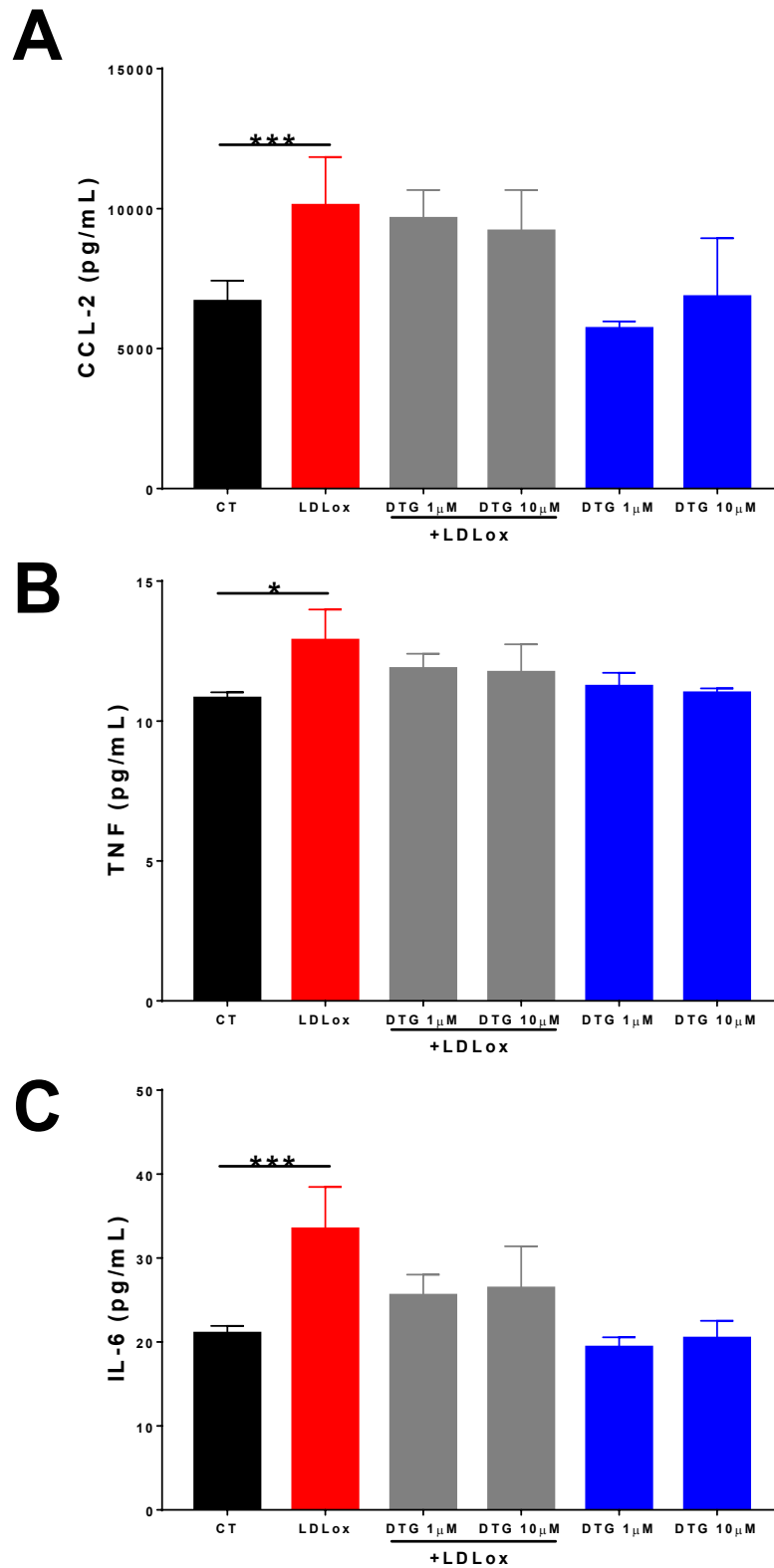


Figura 20. Dosagem, por ELISA, da produção de CCL-2 (A), TNF (B) e IL-6 (C) pelas células endoteliais expostas a LDLox, DTG ou a ambos os estímulos. Valores apresentados como média \pm erro padrão da média de pelo menos 5 experimentos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

7. Discussão

O aumento da incidência de doenças cardiovasculares observado nos portadores do HIV pode estar relacionado a vários fatores, dentre os quais, destacam-se: os riscos tradicionais relacionados à doença renal, o efeito patogênico do próprio vírus e a toxicidade específica do medicamento antirretroviral utilizado (GRINSPOON et al., 2008). Entre os diversos ART empregados para o controle do HIV na atualidade, sobressai o DTG, por apresentar alta potência, menor toxicidade e alta barreira genética, qualidades que lhe credenciaram como parte de vários regimes de TARV. Contudo não são conhecidos efeitos específicos do DTG em relação ao endotélio e a e vasculatura. Frente a esta lacuna, o presente trabalho, através de estudos com anéis de aorta torácica de camundongos, verifica os efeitos da LDLox, do DTG e de ambos os estímulos, sobre a contração vascular induzida por fenilefrina e a participação do NO nas preparações, bem como, investiga estresse oxidativo, mudanças na expressão das isoformas das enzimas NOS e alterações no perfil inflamatório nas células endoteliais frente a estes estímulos. Trata-se de um trabalho inovador e relevante, pois constata que este fármaco não é tão diferente dos demais ART em relação a parte cardiovascular, uma vez que demonstra que o Dolutegravir Sódico tem potencial para desencadear e/ou acentuar a disfunção endotelial, já que promove diminuição na biodisponibilidade de NO, decorrente da redução na expressão das isoformas eNOS e nNOS, nas preparações onde estava associado ao LDLox, potencializa a produção basal de NO, sem no entanto, alterar o estado oxidativo e o perfil inflamatório das células endoteliais estimuladas.

A literatura científica afirma que a disfunção endotelial pode ser induzida por agentes diversos. A LDLox é um destes agentes, tem papel bem esclarecido na ativação das células endoteliais, principal componente da parede vascular. Em síntese, a LDLox é capaz de desencadear uma série de eventos, que resultam na diminuição da biodisponibilidade de NO, que caracteriza a disfunção endotelial (LUSCHER; NOLL, 1994). Por esta razão este trabalho lança mão da LDLox como recurso para indução da disfunção endotelial nas células endoteliais e disfunção vascular em anéis de aorta para investigar o efeito do DTG. O grau de oxidação da LDLox é fator determinante para o reconhecimento das moléculas oxidadas pelos receptores. Para a indução da disfunção endotelial, o presente trabalho utiliza LDLox com grau médio de oxidação. Na prática a molécula de LDL nativa foi oxidada por

meio de CuSO_4 por 4 horas, esse tempo gera uma peroxidação lipídica suficiente para promover diferenciação entre a LDLox e a molécula da LDL nativa. Além disso a LDLox utilizada possui modificações em epítomos, que a torna mais facilmente reconhecida por receptores TLR4 e receptores PAFR (MILLER et al., 2005). Em ambos os modelos de estudo empregados para verificar o efeito do DTG sobre a disfunção endotelial induzida pela LDLox, esta demonstrou ser efetiva na indução, e isto ficará evidente na discussão que se segue.

Os estudos de reatividade vascular que avaliaram o efeito da LDLox, do DTG e de ambos os estímulos, sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em preparações de aorta torácica de camundongos, revelaram que LDLox promoveu significativa redução da resposta contrátil induzida pela fenilefrina, em comparação ao controle. Esse achado confirma, portanto, que a LDLox teve efeito negativo sobre o vaso. Além disso foi observado que a co-incubação com DTG + LDLox não alterou o padrão de resposta contrátil em relação a resposta com LDLox sozinha. Entretanto, o DTG sozinho promoveu aumento significativo da contração induzida pela fenilefrina, em relação ao controle e a co-incubação (LDLox + DTG). Estes dados sugerem que, independentemente da lesão induzida pela LDLox, o DTG foi capaz de aumentar a contratilidade vascular.

Uma vez demonstrado o potencial danoso da LDLox sobre os anéis de aorta e o efeito direto do DTG sobre eles, foram executados estudos de reatividade vascular, para avaliar a participação do NO na resposta contrátil induzida por fenilefrina nas preparações. Para tanto, foi inserido L-NAME ($300\mu\text{M}$) nas cubas, antes da tomada dos registros. Estes estudos revelaram que, como esperado, o L-NAME aumentou a contração induzida pela fenilefrina no controle, assim como aumentou a contração nas preparações expostas a LDLox a níveis similares ao controle. Quando se compara o delta de aumento da contração dos anéis expostos somente ao LDLox, observa-se que este é maior que o delta do controle, sugerindo uma maior produção de NO nos anéis expostos a LDLox.

Na sequência dos estudos para avaliar a participação do NO, sob inibição das NOS com L-NAME, verificou-se que a co-incubação do DTG com LDLox também aumentou a contração em níveis semelhantes ao encontrado no controle. O delta do aumento da contração foi maior nos anéis que foram co-incubados com LDLox + DTG, sugerindo que a exposição ao DTG promove aumento ainda maior na produção de

NO frente a exposição apenas a LDLox. Diferentemente do que aconteceu com as preparações incubadas apenas com LDLox, a incubação apenas com DTG promoveu aumento da contração na presença do inibidor não seletivo da NOS. Além disso a inibição delas com L-NAME aumentou a contração de maneira mais discreta que no controle. Este dado, somado a informação obtida do delta de aumento da contração, sugere que, sozinho o DTG reduz a biodisponibilidade de NO. Contudo ao se comparar a resposta contrátil a fenilefrina após exposição a LDLox com a resposta encontrada na co-incubação (LDLox + DTG), observa-se uma potencialização da resposta contrátil das preparações co-incubadas, após inibição das NOS com L-NAME, em comparação com a incubação com LDLox sozinha. Os dados do delta da contração demonstram de forma mais evidente que o DTG potencializa a produção basal de NO nos vasos tratados com LDLox.

Os estudos de reatividade vascular demonstraram que a LDLox foi efetiva na promoção da disfunção vascular, pois diminuiu a resposta contrátil dos anéis de aorta. Além disso, o DTG também apresentou potencial para desencadear disfunção vascular, pois reduziu a biodisponibilidade de NO e, nas preparações onde estava associado ao LDLox, potencializou a produção basal de NO.

Sabendo que a disfunção endotelial induzida por estresse oxidativo é um dos fenômenos mais significativos para os indivíduos com doenças cardiovasculares, foram realizados estudos de citometria de fluxo com as células endoteliais incubadas com LDLox, DTG e ambos os estímulos para avaliar a produção de NO e superóxido. Os resultados destes estudos revelaram que a produção de NO aumentou tanto no estado basal quanto sob estimulação com ACh apenas nas células que receberam LDLox. As células tratadas apenas com DTG, em ambas as concentrações, não apresentaram aumento na produção de NO e as células que receberam (LDLox + DTG), apresentaram aumento na produção de NO. Contudo, este aumento foi menor que o aumento observado no grupo de células estimulado apenas com LDLox, tanto no estado basal, quanto no estimulado. Os aumentos detectados somente nos grupos onde a LDLox estava presente, podem ser atribuídos a existência de uma condição inflamatória, onde a biodisponibilidade do NO é maior, devido a ativação da via da isoforma iNOS.

Em relação a produção de superóxido, não foi detectado aumento da produção em nenhum grupo com as células no estado basal. Contudo, após tratamento com

LDLox os níveis de superóxido aumentam expressivamente, reagindo com o NO em uma reação aproximadamente seis vezes mais rápida que a dismutação de superóxido pela SOD (BECKMAN; KOPPENOL, 1996) e é produzido o potente oxidante, denominado peroxinitrito (ONOO⁻). Este agente está envolvido com oxidação proteica e formação de nitrotirosina, que é um marcador de estresse oxidativo (DARWISH; AMIRIDZE; AARABI, 2007) muito encontrado em lesões ateroscleróticas e o aumento dos seus níveis séricos é associado com a ocorrência de doenças cardiovasculares (SHISHEHBOR et al., 2003). Essa é uma situação, que pode auxiliar a explicar o resultado deste estudo, que não encontra uma diferença na produção de superóxido com as células no estado basal, onde encontramos aumento significativo de NO. É provável que o aumento de NO possa reduzir os níveis detectáveis de superóxido, uma vez que o peroxinitrito pode estar sendo formado.

Em relação a produção de superóxido, nas células estimuladas com ACh, o estudo revela que LDLox aumenta a produção de superóxido, DTG sozinho, em ambas as concentrações, não altera a produção de superóxido e DTG, quando associado a LDLox, em ambas as concentrações, não altera a produção de superóxido, em relação as células que receberam como estímulo inicial apenas LDLox. No entanto, a produção neste grupo ainda permanece maior que a produção de superóxido detectada no grupo controle, o que comprova a existência de estado oxidativo induzido por LDLox e demonstra, que o DTG não foi capaz de revertê-lo. Apenas com os resultados até então obtidos, não é possível afirmar que o DTG é capaz de reduzir ROS, no entanto (AFONSO et al., 2017) descreveram, que MVC, DTG e MVC + DTG diminuíram a produção basal de ROS, em células endoteliais isoladas da artéria coronária primária humana de indivíduo idoso.

A literatura científica aponta que ocorre redução significativa na biodisponibilidade de NO, em decorrência do desacoplamento da enzima eNOS, em modelos animais e humanos de dislipidemia envolvidos ou não com a formação de placa aterosclerótica (CAPETTINI et al., 2011). Nesse sentido, se o DTG reduz expressão de e-NOS, LDLox reduz a expressão de e-NOS e DTG associado a LDLox reduz ainda mais a expressão de e-NOS, fica evidenciado que o DTG pode reduzir a biodisponibilidade de NO e conseqüentemente favorecer a disfunção endotelial.

Os resultados encontrados nos estudos de imunofluorescência no presente trabalho, foram discordantes, dos resultados encontrados com os antirretrovirais MVC,

DTG, RAL e MVC + DTG, em outro trabalho de 2017, onde os autores afirmaram, que os antirretrovirais citados, não alteraram a expressão proteica da e-NOS, envolvida na produção de NO e comprometida na situação de disfunção endotelial, enquanto ATV e DRV diminuíram a e-NOS em 68% e 48 % respectivamente, em células endoteliais isoladas da artéria coronária primária humana (HCAEC; PromoCell, Heidelberg, Alemanha) de doadores do sexo masculino não diabéticos e não obesos (AFONSO et al., 2017). É necessário ressaltar que os estudos, embora tenham sido desenvolvidos em células endoteliais em ambos os casos, que as células tiveram origens diferentes. No estudo citado, as células originaram-se de doadores que faziam uso dos respectivos fármacos por via oral, ou seja, estavam sujeitas a outras alterações sistêmicas advindas do metabolismo.

A biodisponibilidade de NO é regulada por três diferentes mecanismos: expressão gênica da NOS, atividade enzimática da NOS e degradação do NO (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). Devido a existência destes mecanismos, por mais que um determinado trabalho apresente dados, eles apenas serão indicativos. Além disso, o NO é uma molécula altamente reativa, conseguir em algum modelo de estudo controlar todos os mecanismos de regulação e afirmar com precisão sobre a biodisponibilidade, é um tanto, quanto difícil.

A compreensão da função da nNOS no desencadeamento da aterosclerose, bem como o seu papel no desenvolvimento, em nível celular e molecular, ainda não está totalmente esclarecido, no entanto, Wilcox e seus colaboradores demonstraram que as três isoformas da enzima NOS são encontradas em regiões de placa aterosclerótica em humanos (WILCOX et al., 1997). O presente trabalho revela que DTG, em ambas as concentrações, LDLox e o estímulo com ambos os agentes simultaneamente reduz a expressão da enzima nNOS.

Altos níveis de LDLox promovem aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, que leva ao aumento na expressão da iNOS, que conseqüentemente aumenta a produção de NO, este em excesso, pode levar à lesão vascular (KIBBE; BILLIAR; TZENG, 1999; STATHOPULOS et al., 2001). O aumento na produção de NO pela iNOS está relacionado à expressiva formação de peroxinitrito, espécie altamente reativa, que induz nitrosilação proteica, que resulta na formação de nitrotirosina, que favorece a disfunção endotelial, alterações no miocárdio e conseqüente falência cardíaca (FENG et al., 2001). Na prática a inflamação vascular,

desencadeada pela LDLox causa redução na expressão e atividade da eNOS e aumento progressivo na expressão da iNOS. No primeiro momento, a biodisponibilidade de NO reduz, este acontecimento favorece a disfunção endotelial, já que aumenta o estresse oxidativo e promove ativação de iNOS, que passa a produzir muito NO. Altos níveis de NO leva à nitrosilação proteica e desestabilização de mRNA, que contribui ainda mais para manutenção da inflamação e estresse oxidativo.

A literatura afirma que espécies reativas de oxigênio são responsáveis pelo aumento da produção de citocinas pro-inflamatórias (NAIK; DIXIT, 2011) e que estas citocinas possuem papel de destaque na ativação de receptores celulares relacionados com a disfunção endotelial (RAJAGOPALAN et al., 1996). Posto isto, foram realizados Elisa com o intuito de verificar o efeito da LDLox, do DTG e de ambos os estímulos em relação ao perfil inflamatório nas células endoteliais.

Os resultados encontrados revelaram que LDLox aumenta a produção de TNF, DTG sozinho não aumenta a produção de TNF e DTG na presença de LDLox em ambas as concentrações, não altera a produção de TNF induzida pela LDLox. Em relação a citocina IL-6, os resultados revelaram que LDLox aumenta a produção de IL-6, DTG sozinho não aumenta a produção de IL-6 e DTG na presença de LDLox, em ambas as concentrações, não reduz o aumento induzido pela LDLox. Em relação a CCL2, os resultados revelaram que LDLox aumenta a produção de CCL2, DTG sozinho não aumenta a produção de CCL2 e DTG na presença de LDLox, em ambas as concentrações, não reduz o aumento induzido pela LDLox.

Os resultados dos Elisa confirmaram a efetividade da LDLox para desencadear disfunção endotelial, pois revelaram aumento na produção dos três mediadores inflamatórios testados nos grupos estimulados apenas com LDLox. Estes estudos revelaram ainda, que o DTG não tem potencial para induzir inflamação, quando utilizado isoladamente, assim como também não foi capaz de reverter totalmente a inflamação desencadeada pela LDLox, em ambas as concentrações, nas células onde estava associado a ela. Em relação a alterações no perfil inflamatório: os resultados encontrados demonstram que o DTG não promove aumento de mediadores pró-inflamatórios, portanto não colabora para inflamação. Este achado vêm de encontro com o que afirma o artigo publicado por (AFONSO et al., 2017), que verifica o impacto

do CCR5, inibidores de integrase e protease na função da célula endotelial humana, estresse, inflamação e senescência.

7.1 Outras Considerações sobre os Estudos Realizados, ART e HIV

É importante ressaltar que este trabalho ainda que seja um estudo de farmacologia básica, que verifica o efeito do DTG na disfunção endotelial induzida pela LDLox, sob o ponto de vista fisiológico isolado, bem como investiga alterações bioquímicas e moleculares, em células, que não foram retiradas de vasos de indivíduos portadores do HIV, submetidos a tratamento prévio com DTG, fornece dados sobre o fármaco, que poderão ser úteis para que a indústria farmacêutica possa aprimorá-lo e conseqüentemente reduzir os riscos de DCV em pacientes HIV positivos, que necessitam utilizá-lo.

A inexistência de um modelo de estudo ideal e já estabelecido para atender o objetivo principal deste trabalho, foi certamente o maior desafio encontrado. Contudo, este fato, não foi impedimento, muito pelo contrário, fez com que protocolos experimentais fossem adaptados e/ou desenvolvidos para a execução de experimentos para estudar o fármaco escolhido. Estes, por sua vez, foram devidamente submetidos a testes, que certificaram a viabilidade e responsividade dos vasos, bem como a vitalidade das células e o percentual de células vivas no universo testado, para assegurar resultados condizentes e sobretudo seguros.

Inúmeras variáveis impedem determinar o efeito específico do fármaco pesquisado na disfunção endotelial, pois na prática clínica os indivíduos que precisam conviver com o HIV, não tomam apenas um ART, eles necessitam tomar fármacos associados para controlar a carga viral. Esta situação impede que sejam identificados os efeitos adversos causados por cada fármaco separadamente. Além disso, existem outras variáveis não relacionadas com a associação de ART, que interferem com o efeito do DTG, como por exemplo: farmacogenética, que tem implicações diretas na resposta particular do indivíduo a determinada droga. Alterações sistêmicas pré-existentes, como por exemplo: doenças hepáticas e doenças renais, que podem ser favoráveis ou não para a absorção e / ou eliminação do fármaco. Assim como acesso e adesão do paciente ao tratamento recomendado, entre outras.

O envelhecimento das pessoas vivendo com HIV, torna imperativo os estudos farmacológicos acerca dos ARV, assim como torna necessário a existência de mais

estudos de segurança farmacoterapêutica, já que interações medicamentosas entre a TARV e medicamentos usados para tratar outras comorbidades advindas da senescência, dentre elas as DCV, que podem ser bastante perigosas e potencialmente fatais para este grupo de indivíduos (TSENG et al., 2012).

O fato de não existir terapia capaz de reverter a infecção pelo HIV, faz com que os ARV sejam a única ferramenta disponível para controlar este vírus. Sendo assim, ainda que os ARV possam ter efeitos adversos, que predisponham a disfunção endotelial, por consequência DCV, eles devem ser utilizados pelos portadores do HIV, pois as consequências negativas advindas da ausência do TARV são maiores e mais danosas para o indivíduo. A inexistência do TARV aumenta a carga viral no portador do vírus, por conseguinte seu organismo se torna imunologicamente mais suscetível a outras infecções e evolução para o quadro mais grave desencadeado pelo HIV: a AIDS. Além disso, o indivíduo, sem TARV e acompanhamento clínico, estará mais propenso a transmitir o HIV. Desta forma a falta do TARV, que é o único método farmacológico até então conhecido e eficaz, que possibilita o portador conviver com o vírus, sem estar tão propenso aos seus efeitos deletérios, não irá ser apenas prejudicial para ele, poderá repercutir e ser prejudicial para a população em geral.

8. Conclusão

Com base nos resultados apresentados, é possível concluir que: 1) o DTG sozinho é capaz de induzir hiper contratilidade vascular via redução da biodisponibilidade de NO associada a uma redução da expressão endotelial de eNOS e nNOS; 2) associado a LDLox, o DTG aumenta o perfil de contratilidade na presença de L-NAME, sugerindo aumento da produção basal de NO em anéis de aorta. Em células endoteliais, o DTG reduz a produção basal e estimulada de NO induzida pela LDLox, apesar de reduzir os níveis de radicais livres. Além disso, o DTG reduz a expressão endotelial de iNOS apesar de não restaurar os níveis reduzidos de eNOS e nNOS. O DTG também não foi capaz de reduzir o aumento dos níveis de CCL2, TNF e IL-6 induzidos pela LDLox. Logo, apesar de reduzir os níveis de iNOS associados a inflamação associada a dislipidemia, o DTG pode promover piora da função vascular por reduzir a biodisponibilidade de NO produzido pelas isoformas constitutivas da NOS.

Referências Bibliográficas

- ABD, T. T. et al. The Role of C-Reactive Protein as a Risk Predictor of Coronary Atherosclerosis: Implications from the JUPITER Trial. [s.d.].
- AFONSO, P. et al. Impact of CCR5, integrase and protease inhibitors on human endothelial cell function, stress, inflammation and senescence. **Antiviral Therapy**, v. 22, n. 8, p. 645–657, 2017.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical journal**, v. 357, n. Pt 3, p. 593–615, 1 ago. 2001.
- ANDERSON, T. J. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 34, n. 3, p. 631–638, 1999.
- BAKER, W. L. Systematic Review: Comparative Effectiveness of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors or Angiotensin II–Receptor Blockers for Ischemic Heart Disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 151, n. 12, p. 861, 15 dez. 2009.
- BALLANTYNE, C. M. Treatment of Dyslipidemia to Reduce Cardiovascular Risk in Patients with Multiple Risk Factors. **Clinical Cornerstone**, v. 8, n. SUPPL. 6, p. S6–S13, 1 jan. 2007.
- BARBARO, G. Cardiovascular manifestations of HIV infection. **Circulation**, v. 106, n. 11, p. 1420–1425, 10 set. 2002.
- BARQUERA, S. et al. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. **Archives of medical research**, v. 46, n. 5, p. 328–338, 1 jul. 2015.
- BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424>, v. 271, n. 5 40-5, 1996.
- BITAR, M. S. et al. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. **European Journal of Pharmacology**, v. 511, n. 1, p. 53–64, 21 mar. 2005.
- BONETTI, P. O.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction: A marker of atherosclerotic risk. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 2, p. 168–175, 1 fev. 2003.
- BRANDES, R. P. et al. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. [s.d.].
- BURCHARDT, P. et al. Low-density lipoprotein, its susceptibility to oxidation and the role of lipoprotein-associated phospholipase A2 and carboxyl ester lipase lipases in atherosclerotic plaque formation. **Archives of Medical Science : AMS**, v. 9, n. 1, p. 151, fev. 2013.
- CAPETTINI, L. S. A. et al. Decreased production of neuronal NOS-derived hydrogen peroxide contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis. **British journal of pharmacology**, v. 164, n. 6, p. 1738–1748, nov. 2011.
- CAPETTINI, L. S. A.; CORTES, S. F.; LEMOS, V. S. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 643, n. 2–3, p. 260–266, set. 2010.
- CHUNG, B. H. et al. [8] Single Vertical Spin Density Gradient Ultracentrifugation. **Methods in Enzymology**, v. 128, n. C, 1986.

- DA SILVA, E. F. R. et al. Imbalance between endothelial progenitors cells and microparticles in HIV-infected patients naive for antiretroviral therapy. **AIDS**, v. 25, n. 13, p. 1595–1601, 24 ago. 2011.
- DARWISH, R. S.; AMIRIDZE, N.; AARABI, B. Nitrotyrosine as an oxidative stress marker: evidence for involvement in neurologic outcome in human traumatic brain injury. **The Journal of trauma**, v. 63, n. 2, p. 439–442, ago. 2007.
- DUBÉ, M. P. et al. Glucose metabolism, lipid, and body fat changes in antiretroviral-naive subjects randomized to nelfinavir or efavirenz plus dual nucleosides. **AIDS**, v. 19, n. 16, p. 1807–1818, 4 nov. 2005.
- ENDEMANN, D. H. Endothelial Dysfunction. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 8, 1 ago. 2004.
- ENDEMANN, D. H.; SCHIFFRIN, E. L. Endothelial dysfunction. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 15, n. 8, p. 1983–1992, ago. 2004.
- FARLEY, J. et al. Prevalence of elevated cholesterol and associated risk factors among perinatally HIV-infected children (4–19 years old) in Pediatric AIDS Clinical Trials Group 219C. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 38, n. 4, p. 480–487, 1 abr. 2005.
- FENG, Q. et al. Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality after myocardial infarction in mice. **Circulation**, v. 104, n. 6, p. 700–704, 7 ago. 2001.
- FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 923–939, maio 2010.
- FRIED, J.; PEREZ, A. G.; CLARKSON, B. D. Flow cytometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. Properties of the method and mathematical analysis of the data. **The Journal of Cell Biology**, v. 71, n. 1, p. 172, 1 out. 1976.
- FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 1980.
- GRINSPOON, S. K. et al. State of the science conference initiative to decrease cardiovascular risk and increase quality of care for patients living with HIV/AIDS executive summary. **Circulation**, v. 118, n. 2, p. 198–210, 8 jul. 2008.
- HEGYI, L. et al. The presence of apoptotic cells in human atherosclerotic lesions. **The American Journal of Pathology**, v. 150, n. 1, p. 371, jan. 1997.
- HIGASHI, Y. et al. Oxidative stress and endothelial dysfunction: clinical evidence and therapeutic implications. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 24, n. 4, p. 165–169, 2014.
- HILEMAN, C. O.; FUNDERBURG, N. T. Inflammation, Immune Activation, and Antiretroviral Therapy in HIV HHS Public Access. v. 14, n. 3, p. 93–100, 2017.
- HSUE, P. Y.; WATERS, D. D. **HIV infection and coronary heart disease: mechanisms and management**. **Nature Reviews Cardiology** Nature Publishing Group, , 1 dez. 2019.
- IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 246, n. 1, p. 218–226, 1988.

- KATTOOR, A. J.; GOEL, A.; MEHTA, J. L. LOX-1: Regulation, Signaling and Its Role in Atherosclerosis. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 7, maio 2019.
- KETELHUTH, D. F. J.; HANSSON, G. K. Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: Break of tolerance in the artery wall. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 106, n. 5, p. 779–786, 23 nov. 2011.
- KIBBE, M.; BILLIAR, T.; TZENG, E. Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. **Cardiovascular research**, v. 43, n. 3, p. 650–657, 15 ago. 1999.
- KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. **Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion (inflammation/shear rate/NG-monomethyl-L-arginine/NG-nitro-L-arginine methyl ester/arginine)** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. [s.l.: s.n.].
- LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 9, 2012.
- LIBBY, P.; RIDKER, P. M. **Inflammation and Atherothrombosis. From Population Biology and Bench Research to Clinical Practice.** *Journal of the American College of Cardiology*, 7 nov. 2006.
- LIU, Z. et al. Endothelial cell-derived tetrahydrobiopterin prevents aortic valve calcification. **European heart journal**, 9 fev. 2022.
- LUDEWIG, B.; ZINKERNAGEL, R. M.; HENGARTNER, H. Arterial Inflammation and Atherosclerosis. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 12, n. 4, p. 154–159, 1 maio 2002.
- LUSCHER, T. F.; NOLL, G. Endothelium dysfunction in the coronary circulation. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 24 Suppl 3, p. S16–S26, 1994.
- MACH, F.; MONTECUCCO, F.; STEFFENS, S. Cannabinoid receptors in acute and chronic complications of atherosclerosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. 290–298, 2008.
- MADAMANCHI, N. R.; VENDROV, A.; RUNGE, M. S. Oxidative stress and vascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 1, p. 29–38, jan. 2005.
- MAGGI, P. et al. Rapid progression of carotid lesions in HAART-treated HIV-1 patients. **Atherosclerosis**, v. 192, n. 2, p. 407–412, jun. 2007.
- MAGO CLERICI, M. et al. Altered Lipidome Composition Is Related to Markers of Monocyte and Immune Activation in Antiretroviral Therapy Treated Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection and in Uninfected Persons. **Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org**, v. 1, p. 785, 2019.
- MAIOLINO, G. et al. The Role of Oxidized Low-Density Lipoproteins in Atherosclerosis: The Myths and the Facts. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 13, 2013.
- MARINCOWITZ, C. et al. Vascular endothelial dysfunction in the wake of HIV and ART. **The FEBS Journal**, v. 286, n. 7, p. 1256–1270, 28 abr. 2019.
- MESSIAEN, P. et al. Clinical Use of HIV Integrase Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 8, n. 1, p. e52562, 9 jan. 2013a.
- MESSIAEN, P. et al. Clinical Use of HIV Integrase Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 9 jan. 2013b.

- MGHAMBA, F. W.; MASSAWE, A.; SASI, P. Adherence to antiretroviral therapy among HIV infected children measured by caretaker report, medication return, and drug level in Dar Es Salaam, Tanzania. 2013.
- MILLER, Y. I. et al. Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 6, p. 1213–1219, jun. 2005.
- MONCADA, S.; VANE, J. R. Unstable metabolites of arachidonic acid and their role in haemostasis and thrombosis. **British Medical Bulletin**, v. 34, n. 2, p. 129–135, 1 maio 1978.
- MONTECUCCO, F. et al. Editor's choice: Fast Track: The activation of the cannabinoid receptor type 2 reduces neutrophilic protease-mediated vulnerability in atherosclerotic plaques. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 846, abr. 2012.
- MUDAU, M. et al. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. **Cardiovascular Journal of Africa**, v. 23, n. 4, p. 222, maio 2012.
- NAIK, E.; DIXIT, V. M. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. **The Journal of experimental medicine**, v. 208, n. 3, p. 417–420, 14 mar. 2011.
- NAKAHARAI, K. et al. Severe Thrombocytopenia During Dolutegravir-containing Antiretroviral Therapy. **Intern Med**, v. 56, p. 2229–2232, 2017.
- NAVIA-PELAEZ, J. M. et al. nNOS uncoupling by oxidized LDL: Implications in atherosclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 113, p. 335–346, 1 dez. 2017.
- NOELS, H.; WEBER, C. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. 2011.
- PARK, K. H.; PARK, W. J. Endothelial dysfunction: Clinical implications in cardiovascular disease and therapeutic approaches. **Journal of Korean Medical Science**, v. 30, n. 9, p. 1213–1225, 2015.
- PEZZUTO, J. M. Plant-derived anticancer agents. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, n. 2, p. 121–133, 24 jan. 1997.
- POMMIER, Y.; JOHNSON, A. A.; MARCHAND, C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 4, n. 3, p. 236–248, mar. 2005.
- QUERCIA, R. et al. Comparative Changes of Lipid Levels in Treatment-Naive, HIV-1-Infected Adults Treated with Dolutegravir vs. Efavirenz, Raltegravir, and Ritonavir-Boosted Darunavir-Based Regimens Over 48 Weeks. **Clinical Drug Investigation**, v. 35, n. 3, 2015.
- RADOMSKI, M.; PALMER, R.; MONCADA, S. **The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide.** [s.l.: s.n.].
- RAJAGOPALAN, S. et al. **Reactive Oxygen Species Produced by Macrophage-derived Foam Cells Regulate the Activity of Vascular Matrix Metalloproteinases In Vitro Implications for Atherosclerotic Plaque Stability**J. Clin. Invest. [s.l.: s.n.].
- RAJESH, M. et al. CB2-receptor stimulation attenuates TNF- α -induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 4, p. 2210–2218, out. 2007.
- RAMBAUT, A. et al. The causes and consequences of HIV evolution. **Nature Reviews Genetics** 2004 5:1, v. 5, n. 1, p. 52–61, jan. 2004.

SEBBEN KRAMER, A. et al. Metabolic Abnormalities, Antiretroviral Therapy and Cardiovascular Disease in Elderly Patients with HIV. [s.d.].

SHISHEHBOR, M. H. et al. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. **JAMA**, v. 289, n. 13, p. 1675–1680, 2 abr. 2003.

SIMA, A. V.; STANCU, C. S.; SIMIONESCU, M. Vascular endothelium in atherosclerosis. **Cell and Tissue Research**, v. 335, n. 1, p. 191–203, jan. 2009.

SIMIONESCU, M.; ANTOHE, F. Functional ultrastructure of the vascular endothelium: changes in various pathologies. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 176, n. 176 Pt 1, p. 41–69, 2006.

STATHOPOULOS, P. B. et al. Increased L-arginine uptake and inducible nitric oxide synthase activity in aortas of rats with heart failure. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 280, n. 2, 2001.

STEFFENS, S.; MACH, F. Inflammation and Atherosclerosis. **Herz**, v. 29, 2004.

SVIRIDOV, D. et al. Comorbidities of HIV infection: role of Nef-induced impairment of cholesterol metabolism and lipid raft functionality. **AIDS (London, England)**, v. 34, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2020.

TSENG, Z. H. et al. Sudden Cardiac Death in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection. 2012.

UEMURA, S. et al. Diabetes Mellitus Enhances Vascular Matrix Metalloproteinase Activity Role of Oxidative Stress. 2001.

VAN LUNZEN, J. et al. Once daily dolutegravir (S/GSK1349572) in combination therapy in antiretroviral-naïve adults with HIV: planned interim 48 week results from SPRING-1, a dose-ranging, randomised, phase 2b trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 111–118, 1 fev. 2012.

WEBB, N.; MOORE, K. Macrophage-Derived Foam Cells in Atherosclerosis: Lessons from Murine Models and Implications for Therapy. **Current Drug Targets**, v. 8, n. 12, p. 1249–1263, 14 dez. 2007.

WEBER, K. T.; COSENTINO, F.; LUSCHER, T. F. Cardiovascular Conundrum Series Editor: Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. **Cardiovascular Research**, v. 43, p. 274–278, 1999.

WILCOX, J. N. et al. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 17, n. 11, p. 2479–2488, 1997.

WING, E. J. HIV and aging. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 53, p. 61–68, 1 dez. 2016.

WWW.AIDS.GOV.BR. **Ministério da Saúde inclui dolutegravir e ceftriaxona na lista de medicamentos essenciais do SUS | Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis**. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/noticias/ministerio-da-saude-inclui-dolutegravir-e-ceftriaxona-na-lista-de-medicamentos-essenciais>>. Acesso em: 2 nov. 2021.

YANAGISAWA, M. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature** **1988 332:6163**, v. 332, n. 6163, p. 411–415, 1988.

ZAMAN, A. G. et al. The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 149, n. 2, p. 251–266, 1 abr. 2000.

ZEIHER, A. M. et al. **Nitric Oxide Modulates the Expression of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in Cultured Human Endothelial Cells**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://ahajournals.org>>.