

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Thaís Lemos Ferreira

**Efeito protetor da Amitriptilina *in vitro* na
disfunção endotelial e nas alterações
oxidativas e pró-inflamatórias induzidas
pela LDL oxidada**

Belo Horizonte

2022

Thaís Lemos Ferreira

Efeito protetor da Amitriptilina *in vitro* na disfunção endotelial e nas alterações oxidativas e pró-inflamatórias induzidas 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 a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini

Belo Horizonte

2022

043

Ferreira, Thaís Lemos.

Efeito protetor da Amitriptilina in vitro na disfunção endotelial e nas alterações oxidativas e pró-inflamatórias induzidas pela LDL oxidada [manuscrito] / Thaís Lemos Ferreira. – 2022.

71 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. Farmacologia. 2. Amitriptilina. 3. Inflamação. 4. Estresse oxidativo. 5. Óxido nítrico. 6. Lipoproteínas LDL. I. Capettini, Luciano dos Santos Aggum. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO Nº 558 DE THAÍS LEMOS FERREIRA

Às 14:00 horas do dia **19 do mês de maio de 2022**, transmitida via Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Thaís Lemos Ferreira**. 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. Daniella Bonaventura**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Sandra Lauton Santos**, DFS/Universidade Federal de Sergipe, e **Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: **"Efeito Protetor da Amitriptilina in Vitro na Disfunção Endotelial e nas Alterações Oxidativas e Pró-inflamatórias Induzidas pela LDL Oxidada"**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata 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, 19 de maio de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Bonaventura**, Professora do Magistério Superior, em 03/08/2022, às 15:12, 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 04/08/2022, às 10:52, 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 **Sandra Lauton Santos**, Usuário Externo, em 10/08/2022, às 12:09, 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 **1643324** e o código CRC **A28A5201**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Efeito Protetor da Amitriptilina in Vitro na Disfunção Endotelial e nas Alterações Oxidativas e Pró-inflamatórias Induzidas pela LDL Oxidada"

THAÍS LEMOS FERREIRA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **19 de maio de 2022**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

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

Profa. Dra. Sandra Lauton Santos, DFS/ Universidade Federal de Sergipe

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

Belo Horizonte, 19 de maio de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Bonaventura**, Professora do Magistério Superior, em 03/08/2022, às 15:12, 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 04/08/2022, às 10:52, 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 **Sandra Lauton Santos**, Usuário Externo, em 05/08/2022, às 13:15, 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 **1643325** e o código CRC **A761AD0E**.

Agradecimentos

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra me ajudaram a vencer os obstáculos durante toda a minha trajetória no mestrado. Este trabalho não teria sido possível sem o apoio de vocês!

À UFMG, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do ICB e à CAPES pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo auxílio financeiro e por todo o suporte prestado ao longo deste mestrado.

Ao meu orientador, Luciano dos Santos Aggum Capettini, por me receber em seu Laboratório de Biologia Vascular (LBV) de braços abertos e compartilhar toda a sua experiência, por ouvir minhas dúvidas e aflições com paciência, atenção, leveza e cuidado, por me acalmar nos momentos de estresse com serenidade e seu mantra ("Caaalma, tuuudo vai dar certo."), pela disponibilidade, por todo o seu entusiasmo com a pesquisa, pelos ensinamentos teóricos e práticos, pelas horas de bancada, pelas conversas e contribuições (dentro e fora do laboratório, sobre pesquisa e sobre a vida), pela alegria cotidiana, pela confiança, por ser humano acima de tudo. Agradeço imensamente por ter tido o privilégio de ser orientada por você!

Aos meus amigos e companheiros de laboratório no LBV (os que já estavam lá quando eu cheguei, os que passaram pelo lab, os que entraram durante meu mestrado, os que acompanharam minha jornada desde o início), pela troca de experiências e ricas discussões científicas, por toda a ajuda com as técnicas experimentais e outras questões práticas laboratoriais, pela amizade, pelas risadas, conversas e brincadeiras, pelos cafés (com ou sem bolo), pela alegria de todos os dias, pelo companheirismo e apoio emocional (principalmente nas minhas variações de humor). Ao Enes por compartilhar comigo sua sabedoria de vida e por me segurar nas horas em que eu estive prestes a desmoronar. Muito obrigada por terem feito meu mestrado mais leve.

Aos amigos dos laboratórios de Farmacologia Vascular (LFV), de Farmacologia da Inflamação e da Dor, de Farmacologia Cardiovascular e da Inflamação (LAFACI), de Substâncias Antitumorais (LSAT), de Membranas Excitáveis (LAMEX), de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABiN) e tantos outros presentes no meu dia a dia, pela amizade, parceria e colaboração.

Aos membros da banca que gentilmente aceitaram contribuir com este trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do ICB pelas aulas, discussões e sugestões que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do ICB e todos os outros técnicos de laboratório e funcionários, pela boa vontade e presteza. Ao pessoal das secretarias da Farmacologia e do PPGFisFar e aos representantes discentes, sempre solícitos. Obrigada pela ajuda e paciência em todos os momentos de necessidade.

Aos meus pais Roberto e Dorinha, à minha irmã, Bruna, por serem as pessoas mais maravilhosas que eu poderia ter ao meu lado em TODOS os momentos da minha vida, que apoiaram minhas decisões, que me deram força e condições para que eu pudesse chegar até aqui. Ao meu namorado, Pedro Callado, e à minha sogra, Christianne, por serem luzes na minha vida, minha segunda família. Muito obrigada pela paciência, pelo apoio, suporte e carinho, nos meus melhores e piores dias, durante a realização deste meu sonho.

"But I don't want to go among mad people," Alice remarked. "Oh, you can't help that," said the Cat: "we're all mad here. I'm mad. You're mad." "How do you know I'm mad?" said Alice. "You must be," said the Cat, "or you wouldn't have come here."

— LEWIS CARROLL, 1865, *ALICE IN WONDERLAND*

"I'm still searching for many things and, although I find some of them, there remain infinitely many that I lack (...). And I've grasped some solid and useful things (...). But I keep on making what I can't do yet in order to learn to be able to do it."

— VINCENT VAN GOGH, 1885 (TRADUZIDO DO HOLANDÊS)

Resumo

A aterosclerose é uma doença inflamatória que ocorre em resposta ao acúmulo de LDL oxidada (LDLox) nas artérias. Apesar dos tratamentos disponíveis para a aterosclerose, as doenças cardiovasculares continuam sendo a principal causa de mortes no mundo, exigindo cada vez mais opções terapêuticas viáveis. O reposicionamento de fármacos torna-se uma alternativa interessante, permitindo a utilização de fármacos com características farmacológicas conhecidas em contextos diferentes. Estudos têm mostrado que o emprego de antidepressivos, como a amitriptilina (AM), para o tratamento de dor e distúrbios inflamatórios vem crescendo. Assim, as propriedades anti-inflamatórias da AM poderiam ser aplicadas no controle do componente inflamatório da aterosclerose. O objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos da AM nas alterações provocadas pela LDLox em aortas e macrófagos (linhagem RAW264.7) murinos e em células endoteliais humanas (linhagem EA.hy926). A resposta contrátil das aortas de camundongo foi avaliada por curvas concentração-resposta à fenilefrina (Phe). As alterações na resposta de células endoteliais humanas e macrófagos murinos foram avaliadas por microscopia de fluorescência, citometria de fluxo e ELISA. Na presença de LDLox (50 µg/mL), a AM (0,1 µM) gerou uma resposta contrátil à Phe semelhante à do grupo controle (CT) em anéis aórticos de camundongo. A AM reduziu a concentração basal de óxido nítrico (NO) e a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) aumentadas nas células endoteliais incubadas com LDLox, mas não foi capaz de reverter a diminuição da expressão das óxido nítrico sintases endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), nem a concentração de NO estimulado com acetilcolina (ACh) na presença de LDLox. A AM não reduziu o aumento da expressão de NADPH oxidada (NADPHox) induzida pela LDLox em células endoteliais, mas atenuou os níveis de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) encontrados quando foi incubada com a LDLox. A AM reduziu o transiente de cálcio aumentado pela lisofosfatidilcolina (LPC) no estado basal e estimulado com ACh. Em macrófagos, a AM diminuiu a captação de LDLox reduzindo a expressão do receptor SRA, o que resultou na redução da expressão de iNOS e da concentração dos mediadores inflamatórios CCL2, IL-6, IL-1 β e TNF. Os resultados obtidos mostraram que a AM foi capaz de prevenir as alterações pró-inflamatórias e oxidativas induzidas pela LDLox, reduzindo citocinas pró-inflamatórias e expressão de iNOS, o que contribui para um estado menos oxidativo. Em conjunto, esses resultados sugerem que uma concentração subterapêutica de AM tem potencial para reduzir eventos pró-inflamatórios e o estresse oxidativo causados pela LDLox, porém, mais estudos são necessários para esclarecer as vias envolvidas no mecanismo de ação deste fármaco.

Palavras-chave: LDLox. Amitriptilina. Inflamação. Estresse oxidativo. Óxido nítrico.

Abstract

Atherosclerosis is an inflammatory disease that occurs in the subendothelial layer of the arteries due to oxLDL accumulation. Even though there are many available treatments for atherosclerosis, cardiovascular diseases are still the leading causes of death worldwide thus more therapeutic options are needed. Drug repositioning (also known as drug repurposing) is an interesting approach because it enables new clinical indications for drugs with well-established pharmacological properties. Amitriptyline (AM) is an antidepressant drug that has been used to treat pain and inflammatory disorders because of its anti-inflammatory action, thus it could also be used to regulate the inflammatory component of atherosclerosis. The purpose of this study was to investigate AM effects in the dysfunction and *in vitro* inflammation caused by oxLDL (50 µg/mL) in murine aortas and macrophages (RAW264.7), and in human endothelial cells (EA.hy926). Phenylephrin concentration-response curves were recorded on a wire myograph. Cell alterations were evaluated by fluorescence microscopy, flow cytometry and ELISA assays. Incubation with AM (0,1 µM) reverted the oxLDL-induced decreased vasoconstriction in murine aortas and the oxLDL-induced increase in NO concentration and iNOS expression in endothelial cells. AM did not increase eNOS and nNOS expression nor the ACh-stimulated nitric oxide (NO) concentration that were diminished by oxLDL incubation. AM did not reduce NADPHox augmentation in endothelial cells, but superoxide levels were reduced. Also, AM was able to lower the calcium transient increased by lysophosphatidylcholine (LPC) both at basal state and after ACh stimulation in endothelial cells. In macrophages, incubation with AM attenuated the oxLDL uptake by lowering SRA receptor expression, resulting in both reduced cytokine (CCL2, IL-6, IL-1β and TNF) levels and iNOS expression. The results show that AM was able to prevent the pro-inflammatory and oxidative changes induced by oxLDL, reducing pro-inflammatory cytokines and iNOS expression, which contributes to a less oxidative state. Taken together, these results show that low concentrations of AM have the potential to ameliorate pro-inflammatory events and oxidative stress caused by oxLDL, although more studies are needed to fully understand the mechanism of action of this drug.

Keywords: oxLDL. Amitriptyline. Inflammation. Oxidative stress. Nitric oxide.

Lista de Figuras

Figura 1.	Síntese de óxido nítrico e superóxido pelas óxido nítrico sintases e formação de peroxinitrito. Modificado de <i>Schiffrin et al. (2008)</i>	20
Figura 2.	Alterações moleculares na LDL nativa após sua oxidação. Retirado e modificado de <i>Khatana et al. (2020)</i>	23
Figura 3.	Estrutura molecular da amitriptilina. Retirado de <i>ChemIDplus (2022)</i> . .	25
Figura 4.	Efeito vasoconstritor induzido por Phe em anéis de aorta de camundongo expostos ou não à LDLox e/ou AM. Os dados representam a média $\pm$ EPM dos valores obtidos	41
Figura 5.	Efeito vasoconstritor induzido por Phe em anéis de aorta (n=6) de camundongo expostos ou não à LDLox e/ou AM na presença de L-NAME (300 μ M). Os dados representam a média $\pm$ EPM dos valores obtidos . .	42
Figura 6.	Viabilidade das células endoteliais após exposição a concentrações diferentes de LDLox (25, 50 e 80 μ g/mL) e de AM (0,1 e 1 μ M) na presença e ausência de LDLox (50 μ g/mL) por 24 horas. As barras representam a porcentagem média $\pm$ EPM dos valores obtidos de 6 experimentos separados com 10000 eventos cada. As populações com porcentagens médias maiores do que 80% foram consideradas viáveis.	43
Figura 7.	Resultados obtidos por citometria de fluxo em células endoteliais incubadas ou não com LDLox e/ou AM por 24 horas. As colunas mais claras representam os níveis de NO no estado basal e as mais escuras o NO estimulado com ACh. Os dados representam a média da intensidade de fluorescência (MFI) da sonda DAF multiplicada pela porcentagem de células de cada população $\pm$ EPM. Os valores foram obtidos de 4 experimentos separados com 10000 eventos cada (n=4)	44
Figura 8.	Expressão de eNOS, nNOS e iNOS por imunofluorescência em células endoteliais incubadas ou não com LDLox e/ou AM por 24 horas. As colunas representam a média da intensidade de fluorescência $\pm$ EPM por imagem. O n amostral de cada grupo está indicado nas colunas	45
Figura 9.	Dosagem de $O_2^{\bullet-}$ por citometria de fluxo em células endoteliais incubadas ou não com LDLox e/ou AM por 24 horas, no estado basal e após estímulo com ACh. Os dados representam a média da intensidade de fluorescência multiplicada pela porcentagem de células de cada população $\pm$ EPM. Os valores foram obtidos de 4 experimentos separados com 10000 eventos cada (n=4)	46

Figura 10.	Expressão das subunidades p22 e p47 da NADPH oxidase por imunofluorescência em células endoteliais incubadas ou não com LDLox e/ou AM por 24 horas. As colunas representam a média da intensidade de fluorescência $\pm$ EPM por imagem. O <i>n</i> amostral de cada grupo está indicado nas colunas.	47
Figura 11.	Concentrações intracelulares de cálcio no estado basal e após estímulo com ACh, quantificado por citometria de fluxo com a sonda Fluo-4. Em A , os dados representam a MFI da sonda Fluo-4, calculada multiplicando-se a média da intensidade de fluorescência captada pela porcentagem de células de cada população $\pm$ EPM. Em B , o gráfico mostra a razão entre os valores de MFI após estímulo com ACh e no estado basal de cada grupo em cada tempo analisado, ao longo de 30 minutos	48
Figura 12.	Captação de LDLox por fluorescência em macrófagos incubados ou não com LDLox e/ou AM por 24 horas. As colunas representam a média da intensidade de fluorescência $\pm$ EPM por imagem. O <i>n</i> amostral de cada grupo está indicado nas colunas	49
Figura 13.	Expressão do receptor SRA em macrófagos incubados com LDLox e/ou AM por 24 horas. As colunas representam a média da intensidade de fluorescência $\pm$ EPM por imagem. O <i>n</i> amostral de cada grupo está indicado nas colunas. Imagens representativas de cada grupo estão indicadas no painel	49
Figura 14.	Expressão do receptor CD36 em macrófagos incubados com LDLox e/ou AM por 24 horas. As colunas representam a média da intensidade de fluorescência $\pm$ EPM por imagem. O <i>n</i> amostral de cada grupo está indicado nas colunas. Imagens representativas de cada grupo estão indicadas no painel	50
Figura 15.	Expressão de iNOS por imunofluorescência em macrófagos incubados ou não com LDLox e/ou AM por 24 horas. As colunas representam a média da intensidade de fluorescência $\pm$ EPM por imagem. O <i>n</i> amostral de cada grupo está indicado nas colunas. Imagens representativas de cada grupo estão indicadas no painel	50
Figura 16.	Dosagem de citocinas no sobrenadante de macrófagos por ELISA após incubação com LDLox e/ou AM por 24 horas. As colunas representam a média $\pm$ EPM dos valores obtidos. O <i>n</i> amostral de cada grupo está indicado nos títulos dos gráficos	51
Figura 17.	Representação esquemática do resumo dos resultados apresentados no presente trabalho	52

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Principais ações farmacológicas clássicas e recentes da amitriptilina. Adaptado de McClure, 2017.	27
Tabela 2.	Divisão de grupos experimentais: (1) grupo controle (CT); (2, 3) grupos incubados somente com amitriptilina nas concentrações 0,1 μ M (AM 0,1) e 1 μ M (AM 1); (4) grupo incubado com LDLox, 50 μ g/mL (LDLox); (5, 6) grupos incubados com LDLox (50 μ g/mL) e amitriptilina nas concentrações 0,1 μ M (AMox 0,1) e 1 μ M (AMox 1).	32
Tabela 3.	Valores de Emax e pEC50 da resposta vascular à Phe sem L-NAME de cada grupo experimental.	41
Tabela 4.	Valores de Emax e pEC50 da resposta vascular à Phe com L-NAME de cada grupo experimental. ANOVA. Não houve diferença estatística entre os grupos.	42

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

μg	Micrograma
μg	Micrograma
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
5-HT	Serotonina
ACh	Acetilcolina (<i>Acetylcholine</i>)
ADT	Antidepressivo tricíclico
AKT	Proteína cinase B (PKB)
AM	Amitriptilina
AMox	Amitriptilina + LDLox
ASM	Esfingomielinase ácida
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro (<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>)
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
Ca ²⁺	Íon cálcio
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cálcio dihidratado
CAPI	Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB-UFMG
CCL2	Molécula quimiotática para monócitos 1 (MCP1)
CD36	Cluster de diferenciação 36 (receptor <i>scavenger</i> de classe B)
CELAM	Centro de Laboratórios Multiusuários, ICB-UFMG
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CFL	CruzFluor TM
CO ₂	Dióxido de carbono
CuSO ₄	Sulfato de cobre

DAF-FM	4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína
DAG	Diacilglicerol
DAPI	Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole
DHE	Dihidroetídio
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (meio de cultura celular)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC ₅₀	Concentração do agonista que produziu 50% da resposta máxima
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio (<i>Endothelium-derived relaxing factor</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
E _{max}	Resposta máxima do agonista
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial (NOS ₃)
FAD	Flavina mononucleotídeo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMN	Flavina adenina dinucleotídeo
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
h	Horas
HDL	Lipoproteína de alta densidade (<i>High density lipoprotein</i>)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
I _κ B	Inibidor do fator nuclear κ B
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
ICB-UFMG	Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IF	Intensidade de fluorescência
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível (NOS ₂)
IP	Iodeto de propídio

IP ₃	Inositol trifosfato (<i>Inositol triphosphate</i>)
KBr	Brometo de potássio
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginina Metil Éster
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low density lipoprotein</i>)
LDL _n	LDL nativa
LDLox	LDL oxidada
Lp-PLA ₂	Fosfolipase A ₂ associada a lipoproteína
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MFI	Intensidade de fluorescência média
mg	Miligrama
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado
MLCK	Cinase da cadeia leve de miosina (<i>Myosin light-chain kinase</i>)
NA	Noradrenalina
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPHox	NADPH oxidase (NOX)
NET	Transportador de noradrenalina (<i>Norepinephrin transporter</i>)
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear <i>kappa</i> B
NGF	Fator de crescimento nervoso
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
nm	Nanômetro
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal (NOS ₁)
NO	Óxido nítrico
NOR	Nortriptilina
NOS	Óxido nítrico sintases

O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OPD	Ortofenilenodiamina
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
p22 ^{phox}	Subunidade catalítica da NADPHox
p47 ^{phox}	Subunidade regulatória da NADPHox
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
pEC50	Logaritmo negativo (na base 10) da EC50 do agonista (pD2)
PFA	Paraformaldeído
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilefrina (<i>Phenylephrine</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase (<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato (<i>Phosphatidylinositol bisphosphate</i>)
PKC	Proteína cinase C
PLC	Fosfolipase C (<i>Phospholipase C</i>)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil (<i>Phenylmethysulfonyl fluoride</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
rpm	Rotações por minuto
SERT	Transportador de serotonina (<i>Serotonin transporter</i>)
SFB	Soro fetal bovino
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
SNC	Sistema Nervoso Central
SRA	<i>Scavenger receptor A</i>
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor necrose factor</i>)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
VCAM-1	Molécula de adesão vascular 1

Sumário

1. Introdução	19
2. Revisão de literatura	20
2.1. Síntese de óxido nítrico pelas óxido nítrico sintases	20
2.2. Patogênese da aterosclerose	21
2.3. Reposicionamento de fármacos	24
2.4. Amitriptilina	25
3. Justificativa	29
4. Objetivos	30
4.1. Objetivo geral	30
4.2. Objetivos específicos	30
5. Metodologia	31
5.1. Obtenção da LDLox	31
5.1.1. Isolamento da LDLn humana	31
5.1.2. Oxidação da LDLn humana	31
5.2. Delineamento experimental	32
5.3. Experimentos de reatividade vascular em aorta torácica de camundongo . . .	33
5.3.1. Animais	33
5.3.2. Obtenção dos anéis de aorta e incubação dos tratamentos	33
5.3.3. Montagem e estabilização dos vasos em sistema de banho de órgãos . .	34
5.3.4. Teste de viabilidade das preparações	34
5.3.5. Resposta contrátil à fenilefrina e participação das NOS	34
5.4. Cultivo celular	35
5.5. Experimentos com células endoteliais	36
5.5.1. Viabilidade celular	36
5.5.2. Quantificação de NO e superóxido	36
5.5.3. Expressão proteica de NOS e NADPH oxidase	37
5.5.4. Influxo de cálcio	38
5.6. Experimentos com macrófagos	39
5.6.1. Captação de LDL oxidada	39
5.6.2. Expressão proteica dos receptores CD36 e SR-A	39
5.6.3. Expressão proteica de iNOS	39
5.6.4. Dosagem de mediadores inflamatórios no sobrenadante celular	39
5.7. Análise estatística e expressão dos dados	40

6. Resultados	41
6.1. Resultados do estudo em anéis de aorta de camundongo	41
6.1.1. Efeito da AM sobre a disfunção vascular induzida pela LDLox	41
6.2. Resultados do estudo em células endoteliais	43
6.2.1. Viabilidade celular	43
6.2.2. Quantificação de NO	44
6.2.3. Expressão proteica das NOS	45
6.2.4. Efeito da AM no estresse oxidativo induzido por LDLox	46
I. Detecção de espécies reativas de oxigênio	46
II. Expressão proteica de NADPH oxidase	47
6.2.5. Avaliação do transiente intracelular de cálcio	47
6.3. Resultados do estudo em macrófagos	48
6.3.1. Captação de LDLox	48
6.3.2. Avaliação da expressão proteica de receptores CD36 e SRA	49
6.3.3. Avaliação da expressão proteica de iNOS	50
6.3.4. Dosagem de mediadores inflamatórios no sobrenadante celular	51
6.4. Resumo dos resultados	52
7. Discussão	53
7.1. Efeitos da exposição à LDLox	53
7.2. Efeitos da AM sobre as alterações induzidas pela LDLox	56
7.3. Efeitos isolados da AM	58
8. Conclusão	60
Referências bibliográficas	61

1. Introdução

A aterosclerose é uma doença que se desenvolve de forma silenciosa desencadeada por fatores de risco modificáveis e não modificáveis, como os hábitos alimentares e o processo de envelhecimento. Ocorre, então, um desbalanço no fluxo de colesterol associado a um processo inflamatório crônico, em um ambiente disfuncional, no qual há estresse oxidativo. O agravamento da placa aterosclerótica leva ao surgimento de complicações clínicas importantes, como insuficiência renal crônica, doença arterial periférica, acidente vascular encefálico e infarto do miocárdio, que afetam diretamente a qualidade de vida de milhões de pessoas no mundo e podem ser fatais (LIBBY et al., 2019). Apesar de existirem formas de intervenção eficazes atualmente, que buscam principalmente controlar os fatores de risco, as doenças cardiovasculares (DCV) ainda ocupam o posto de principal causa de mortes no mundo, tendo provocado a morte de 18,6 milhões de pessoas em 2019 (ROTH et al., 2020).

Atualmente, pesquisadores têm buscado alvos farmacológicos mais específicos, com foco no componente inflamatório da aterosclerose, para reduzir efeitos colaterais e proporcionar mais conforto aos pacientes (JI; LEE, 2021); (SOEHNLEIN; LIBBY, 2021). Entretanto, o processo convencional de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos é demorado e dispendioso para a indústria farmacêutica. Dessa forma, o reposicionamento de fármacos, uma estratégia conveniente e segura para inserir novos fármacos no mercado, pode ser aplicado como forma de acelerar e facilitar o acesso a novas opções de tratamento. O reposicionamento de fármacos consiste, basicamente, em explorar fármacos com propriedades conhecidas em diferentes aplicações clínicas (GELOSA et al., 2020). Um dos principais exemplos dessa prática é o sildenafil, um inibidor seletivo da fosfodiesterase 5 indicado inicialmente para pacientes com angina, que revolucionou o tratamento da disfunção erétil na década de 80 (OSTERLOH, 2004).

A amitriptilina é um antidepressivo tricíclico (ADT) aprovado pelo FDA em 1961 para o tratamento de depressão e distúrbios associados, devido, principalmente, à sua ação de inibição não seletiva da recaptação de noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) no sistema nervoso central (SNC). Além de interagir com os transportadores de NA (NET) e 5-HT (SERT), a amitriptilina se liga ainda a vários outros receptores (serotoninérgicos, α_1 -adrenérgicos, histamínicos, muscarínicos e outros) e tem sido utilizada para o tratamento de enurese noturna, enxaqueca e dor neuropática. Porém, o mecanismo exato de ação da amitriptilina ainda não foi totalmente elucidado. Atualmente, evidências apontam que a amitriptilina tem efeitos anti-inflamatórios reduzindo a concentração de citocinas pró-inflamatórias, a migração de células de defesa e processos inflamatórios crônicos, o que poderia permitir sua aplicação também no controle da aterosclerose, desacelerando os eventos iniciais que levam à progressão da placa aterosclerótica.

2. Revisão de literatura

2.1. Síntese de óxido nítrico pelas óxido nítrico sintases

Em condições fisiológicas, o endotélio é responsável pela preservação da função e do tônus vascular, regulando sua homeostase através da produção de substâncias vasodilatadoras, dentre elas o óxido nítrico (NO). A produção de NO acontece em resposta a estímulos fisiológicos, como o estresse de cisalhamento exercido pelo fluxo sanguíneo na parede arterial (TEIXEIRA et al., 2014). Além de exercer o papel de fator relaxante derivado do endotélio (EDRF, do inglês *endothelium-derived relaxing factor*) (FURCHGOTT et al., 1980); (PALMER et al., 1987), regulando o tônus vascular, o NO também é responsável por prevenir a disfunção endotelial, reduzir o estresse oxidativo vascular, inibir a migração e adesão de leucócitos, a proliferação de células musculares lisas vasculares e a agregação plaquetária – eventos considerados pró-aterogênicos (MONCADA et al., 1988); (JIN; LOSCALZO, 2010); (CAPETTINI et al., 2011); (LEVINE et al., 2012).

A síntese de NO é realizada essencialmente pela família das enzimas óxido nítrico sintases (NOS), composta por 3 principais isoformas, sendo duas constitutivas, a neuronal (nNOS ou NOS1) e a endotelial (eNOS ou NOS3), e uma induzível (iNOS ou NOS2) que, apesar de seus nomes, podem ser encontradas em diversos tipos celulares e tecidos, inclusive nos vasos sanguíneos. A produção de NO ocorre a partir do aminoácido L-arginina, por meio de uma reação dependente de oxigênio (O_2) e cofatores que se ligam à enzima (Figura 1).

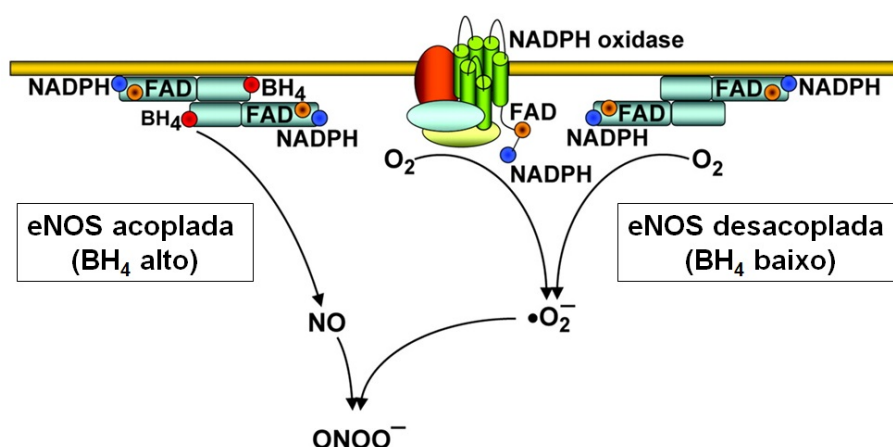


Figura 1.: Síntese de NO e $O_2^{\bullet-}$ pelas NOS e formação de $ONOO^-$. A biodisponibilidade de NO é regulada pelo equilíbrio entre a produção de NO e ROS. Quando a produção de ROS aumenta, seja por desacoplamento das NOSc ou ativação da enzima NADPH oxidase, ocorre redução de BH₄ e a eNOS produz $O_2^{\bullet-}$. O $O_2^{\bullet-}$ gerado reage com o NO formando $ONOO^-$, que tem efeitos deletérios. NO indica óxido nítrico; $O_2^{\bullet-}$, superóxido; NOSc, óxido nítrico sintases constitutivas; $ONOO^-$, peroxinitrito; ROS, espécies reativas de oxigênio; FAD, flavina mononucleotídeo; FMN, flavina adenina dinucleotídeo; BH₄, tetrahidrobiopterina. Modificado de Schiffrin et al. (2008).

As NOS apresentam-se em forma de homodímeros (duas subunidades idênticas com um domínio redutase e outro oxigenase cada) o que viabiliza a transferência de elétrons necessária para a produção de NO (LAMB DEN, 2019). Quando estão desacopladas, ou seja, com deficiência de cofatores, pela ocorrência de disfunção endotelial de forma geral, as NOS podem produzir altas quantidades de radicais livres, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que reage com o NO, reduzindo sua biodisponibilidade, formando peroxinitrito ($ONOO^-$) (Figura 1).

No caso das NOS constitutivas, ambas atuam na proteção vascular produzindo uma quantidade basal de NO. Sua produção pode ser estimulada pela fosforilação da eNOS via PI3K/AKT ou pelo aumento do cálcio intracelular, que pode ser induzido por agonistas, desencadeando, assim, uma série de eventos. A ligação da acetilcolina (ACh) com um receptor acoplado à proteína Gq, por exemplo, leva à ativação da fosfolipase C (PLC), que cliva o fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂), um fosfolípido de membrana, dando origem aos segundos mensageiros IP₃ e DAG, favorecendo o aumento da concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$). O cálcio forma o complexo Ca^{2+} -calmodulina, responsável pela ativação destas enzimas. O NO produzido que se difunde para as células musculares lisas ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que promove o aumento intracelular de monofosfato de guanosina cíclica (GMPc). O GMPc ativa a proteína cinase G (PKG), que promove a redução da $[Ca^{2+}]_i$, a fosforilação da cinase da miosina de cadeia leve (MLCK, do inglês *myosin light-chain kinase*) e a hiperpolarização da célula pela saída de íons potássio, favorecendo a vasodilatação (SILVA et al., 2021).

A iNOS, por outro lado, é expressa em processos inflamatórios podendo ser induzida por vários agentes pró-inflamatórios, como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e a LDL oxidada (LDLox), e pela liberação de mediadores pró-inflamatórios que estimulam a transcrição do gene da iNOS em macrófagos e outros tipos celulares. A expressão de iNOS e sua ativação independente do aumento intracelular de cálcio promovem a produção exagerada de NO. A regulação da quantidade de NO que será produzido é a base para explicar a característica dual do NO como benéfico ou maléfico ao organismo. A produção de grandes quantidades de NO pelas células está relacionada ao sistema de defesa do organismo, mas pode ser prejudicial se não controlada (ANTOSOVA et al., 2017).

2.2. Patogênese da aterosclerose

A aterosclerose é uma condição crônica e progressiva que se caracteriza por uma resposta inflamatória, levando a disfunção endotelial e, conseqüentemente, ao aprisionamento e à oxidação de moléculas de LDL na camada subendotelial das artérias (ZHAO; MALLAT, 2019), principalmente em áreas de curvatura acentuada e bifurcações, onde o fluxo celular é perturbado e as

células apresentam orientação aleatória (LUSIS, 2000).

Geralmente, a doença aterosclerótica depende de uma associação de fatores de risco cardiovascular modificáveis (dislipidemia, hipertensão, hábitos alimentares, tabagismo, diabetes, obesidade e estilo de vida sedentário) ou não modificáveis (como processo de envelhecimento, genética, gênero, etnia e condição cardiovascular pré-existente) não controlados. Elevadas concentrações de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e baixos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) no sangue, aumento do estresse de cisalhamento decorrente da hipertensão, tabagismo, dieta desbalanceada e outras lesões físicas e bioquímicas provocadas pelos fatores de risco favorecem, em conjunto ou individualmente, o estabelecimento de um estado de estresse oxidativo e disfunção endotelial característico da doença aterosclerótica (TOTH, 2008).

A aterogênese tem início nos locais de dano endotelial, onde as células disfuncionais se tornam incapazes de produzir NO e, conseqüentemente, de manter o equilíbrio do tônus vascular. Além disso, o desacoplamento das NOS, presente na disfunção endotelial, gera aumento da permeabilidade vascular e produção de radicais livres, o que facilita a entrada e a oxidação de moléculas de LDL para a camada subendotelial da artéria. A redução de NO associada às espécies reativas de oxigênio (ROS) e à presença de LDLox é comumente apontada como sendo a principal causa da formação da placa aterosclerótica (VANHOUTTE, 2009).

Os principais fatores que determinam a biodisponibilidade de NO são a expressão e a atividade das NOS, e o equilíbrio entre síntese e degradação da sua molécula (TOUSOULIS et al., 2012). Se por um lado a diminuição de NO está associada à disfunção endotelial que leva ao surgimento da aterosclerose, a sua produção exacerbada favorece a manutenção do estresse oxidativo, já que o NO pode interagir com o radical $O_2^{\bullet-}$ formando $ONOO^-$ (Figura 1), um composto extremamente reativo que pode oxidar o BH₄, importante cofator para a produção de NO pela NOS, favorecendo o desacoplamento da enzima e a produção sustentada de ROS por estas enzimas (KATUSIC, 2001).

Outra importante fonte de ROS envolvida no desenvolvimento da aterosclerose é a NADPH oxidase (NADPHox) (FEARON, 2006). Zhao e colaboradores (2009) mostraram que a LDLox é capaz de aumentar a expressão de NADPHox. Além disso, outros estudos mostraram que sua ativação pode ser mediada por diversos estímulos pró-inflamatórios, como citocinas, e que este processo envolve a PKC (RASTOGI et al., 2017). Quando a NADPHox é ativada, uma de suas subunidades citosólicas (p47^{phox}) é fosforilada e interage com uma das subunidades ancoradas à membrana (p22^{phox}), levando à produção de ROS. Altos níveis de ROS podem levar à oxidação de LDLox e ativação do fator nuclear κB (NF- κB). Em condições fisiológicas, o NF- κB encontra-se no citosol ligado ao seu inibidor, I κB . Após um estímulo, como o aumento da produção de ROS, o I κB é fosforilado e degradado, o que provoca liberação e migração do NF- κB para o núcleo

celular, promovendo a transcrição gênica de várias moléculas pró-inflamatórias. A presença de citocinas inflamatórias, como TNF e IL-1 β , também pode levar à ativação da via do NF- κ B (BARNES; KARIN, 1997).

Uma etapa primordial para o início da formação da placa aterosclerótica é a internalização da LDL na camada subendotelial das artérias, onde são aprisionadas na matriz extracelular e sofrem alterações oxidativas (Figura 2) por ROS e ação enzimática (KHATANA et al., 2020). A oxidação da molécula de LDL ativa a expressão de receptores, principalmente *scavenger receptor A* (SRA) e *cluster of differentiation 36* (CD36), responsáveis por seu reconhecimento e captação em macrófagos. Existem vários receptores capazes de executar essa tarefa em diferentes tipos celulares, e cada um deles reconhece um componente diferente da molécula de LDLox. Em geral, as modificações na porção proteica da molécula de LDL (apolipoproteína B) são reconhecidas pelo SRA, e as alterações lipídicas são reconhecidas pelo CD36 (LEVITAN et al., 2010). A inibição desses dois receptores resulta em redução da formação de células espumosas *in vitro* (RAHAMAN et al., 2006).

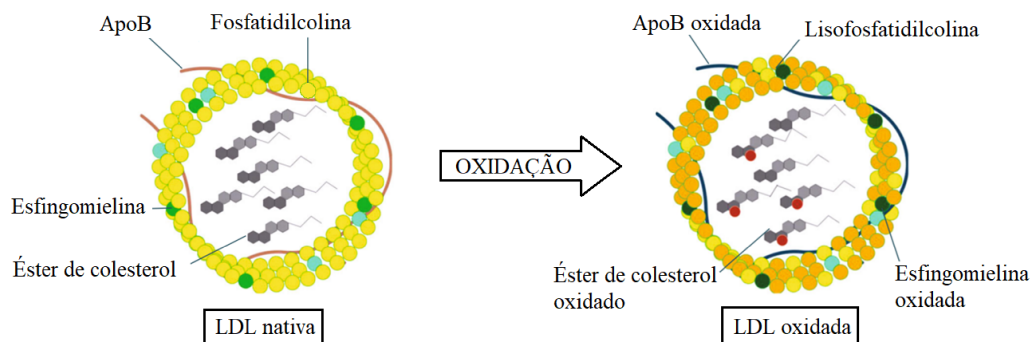


Figura 2.: Alterações moleculares na LDL nativa após sua oxidação. O núcleo hidrofóbico da molécula de LDL é composto de triglicerídeos e ésteres de colesterol. A superfície hidrofílica da molécula, por sua vez, é formada por fosfolípidos, colesterol não esterificado e pela apolipoproteína B (ApoB). Principalmente depois de alcançar a camada subendotelial, a molécula de LDL sofre modificações oxidativas diversas ao interagir com ROS e enzimas, por exemplo. Modificado de Khatana et al. (2020).

A presença de LDLox estimula a liberação de quimiocinas, como a CCL2, e o aumento da expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1 e VCAM-1, induzindo, consequentemente, o recrutamento de monócitos e linfócitos e facilitando a entrada destas células para a camada subendotelial do vaso. Os monócitos deixam a luz do vaso em direção à túnica íntima, onde são diferenciados em macrófagos e ativados, e tornam-se capazes de reconhecer e captar a LDLox. A LDLox captada pelos receptores *scavenger* promove retroalimentação positiva (RHOADS; MAJOR, 2018), induzindo a expressão de mais receptores, o que favorece o acúmulo desenfreado de LDLox. A captação contínua da molécula de LDLox transforma os macrófagos em células espumosas (LEIVA et al., 2015).

A partir de então, ocorre a liberação de uma série de mediadores pró-inflamatórios, como

IL-6, TNF e IL-1 β , e a ativação de vias de transdução de sinais intracelulares que promovem eventos pró-inflamatórios, favorecendo a progressão da lesão (CORRÊA-CAMACHO et al., 2007); (SIQUEIRA et al., 2006). Foi demonstrado que a LDLox pode aumentar os níveis intracelulares de cálcio, aumentando a liberação de ROS em vários tipos celulares (FEARON, 2006). Além disso, a própria LDLox é citotóxica para as células endoteliais, já que a LPC, um importante componente da molécula oxidada de LDL, é capaz de induzir apoptose via aumento e manutenção de altas concentrações de cálcio intracelular (JUNG et al., 2017).

As células espumosas entram, então, em estado de apoptose ou necrose celular, dando início à formação do núcleo necrótico característico da lesão aterosclerótica. Em sequência, ocorre a liberação de fatores de crescimento que induzem a migração de células musculares lisas vasculares da camada média para a íntima, onde se proliferam e formam uma cápsula fibrosa. O agravamento da lesão está relacionado à deposição de colágeno, e à estenose vascular, aumentando o risco de ulceração, agregação plaquetária e formação de trombo no local, podendo gerar manifestações clínicas graves (TOTH, 2008); (MADAMANCHI et al., 2005).

2.3. Reposicionamento de fármacos

O processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de um novo fármaco, desde o projeto inicial até sua liberação para venda, é complexo, caro, lento e sem garantia de sucesso (RUDRAPAL et al., 2020). Percorrer essa trajetória pode demorar mais de 15 anos e custar de 1 a 2 bilhões de dólares (PADHY; GUPTA et al., 2011). Além dos altos investimentos aplicados na fase de pesquisa, da burocracia envolvida para a venda do produto e do tempo de estudo, há um grande risco de perda dos investimentos, já que apenas 1 em cada 15 a 25 novos fármacos são aprovados nos testes de segurança e eficácia. Além disso, quando um novo medicamento é lançado no mercado, algumas vezes não é capaz de superar os custos de sua produção (LOMBARDINO; LOWE, 2004).

O reposicionamento de fármacos é uma estratégia que propõe novos usos clínicos para fármacos já aprovados, ou que estão em processo de desenvolvimento, ou que foram descontinuados. Sua aplicação tem sido muito explorada nos últimos anos e proporciona mais segurança e rapidez na criação de fármacos, já que as características farmacocinéticas, a toxicidade, a segurança e a eficácia daquele fármaco já foram estabelecidas em modelos pré-clínicos e, muitas vezes, em estudos clínicos (TALEVI; BELLERA, 2020). Além disso, atualmente existem várias técnicas *in silico* envolvendo análise de dados e inteligência artificial que facilitam e aceleram ainda mais esse processo (RUDRAPAL et al., 2020). O redirecionamento terapêutico apresenta-se ainda como importante ferramenta nas pesquisas para desenvolvimento de opções terapêuticas

para doenças raras, em que não é possível conduzir estudos que acompanhem o curso daquela condição, impedindo sua caracterização adequada e as vias biológicas responsáveis por sua patogênese (PUSHPAKOM et al., 2019). Muitos fármacos já são usados de forma *off-label*, ou seja, sem autorização oficial das agências reguladoras (TALEVI; BELLERA, 2020).

Até hoje a maioria dos fármacos foram reposicionados ao caso (por *serendipity*), o que significa que efeitos secundários de determinado fármaco começaram a ser observados, mesmo que não fossem alvo específico de nenhum estudo, e, a partir de então, eram explorados (PUSHPAKOM et al., 2019). Além disso, outras formas de reposicionar fármacos são possíveis, quando o mecanismo de ação ou alvo terapêutico de determinado fármaco se mostram importantes no desenvolvimento de outra doença, por exemplo (LI; JONES, 2012). Alguns exemplos de fármacos reposicionados são o sildenafil, um fármaco conhecido por seus efeitos na disfunção erétil, que foi inicialmente produzido para tratamento de angina; o minoxidil, desenvolvido para o tratamento da hipertensão que demonstrou ser eficaz na perda de cabelo; a zidovudina ou azido-timidina (AZT), proposta para o tratamento de câncer, falhou nos testes iniciais, mas ressurgiu quando houve a necessidade de desenvolvimento rápido de uma terapia para o controle do HIV; e a duloxetine, indicada para o tratamento da depressão e reposicionada para o tratamento de fibromialgia (JARADA et al., 2020); (ASHBURN; THOR, 2004).

2.4. Amitriptilina

Os antidepressivos tricíclicos (ADT) são classificados dessa forma porque possuem uma estrutura molecular composta por três cadeias carbônicas cíclicas, sendo duas aromáticas e uma não aromática, ligadas a uma acíclica. Existem dois grandes grupos de ADT, determinados pelo grupamento contido na cadeia acíclica da molécula, as aminas secundárias e as terciárias. A amitriptilina (AM) enquadra-se no segundo grupo, já que possui uma amina terciária em sua estrutura (Figura 3).

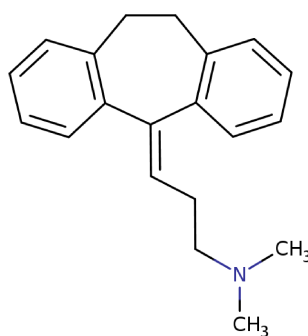


Figura 3.: Estrutura molecular da amitriptilina. Retirado de *ChemIDplus* (2022).

A AM foi o segundo ADT produzido nos Estados Unidos, em 1960, tendo sido aprovada pelo FDA, agência reguladora americana, para o tratamento da depressão, em 1961 (DAVIS, 2020). Atualmente, a AM é comercializada amplamente na forma genérica de cloridrato de amitriptilina e aparece na Lista Modelo de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2021), que relaciona medicamentos seguros, eficazes e com boa relação custo-benefício considerados básicos para um sistema de saúde, como medicamento indicado para dor, cuidados paliativos e distúrbios depressivos. No Brasil, a AM faz parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename, 2020), que contempla produtos necessários ao tratamento e controle da maioria das doenças prevalentes no país.

A AM é um antidepressivo com propriedades analgésicas, ansiolíticas e sedativas indicado para o tratamento de depressão em suas várias formas e enurese noturna em que causas orgânicas foram excluídas. Apesar de ter sua eficácia comprovada, a AM não é a primeira escolha para o tratamento dessas condições devido aos vários efeitos colaterais que provoca e ao alto risco de toxicidade principalmente em sobredosagem, o que será discutido mais adiante. Segundo o relatório de avaliação realizado pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) em 2017, vários estudos indicam que a AM também é eficaz na profilaxia de enxaqueca e alguns tipos de cefaléia, e no tratamento de dor crônica, principalmente neuropática, e fibromialgia, apesar de tais indicações não constarem em sua bula (COUCH; GROUP, 2011); (JACKSON et al., 2010); (MOORE et al., 2015); (CARVILLE et al., 2008); (BUHAGIAR et al., 2019).

As doses terapêuticas da AM partem de 10 mg/dia até 150 mg/dia (dose máxima recomendada de 3 mg/kg/dia para uma pessoa de 50 kg), podendo chegar a 300 mg/dia para pacientes hospitalizados. Geralmente, doses mais próximas do limite superior recomendado são utilizadas para o tratamento da depressão e distúrbios associadas, enquanto as doses menores são indicadas para o controle de outras condições, ou para o tratamento da depressão de pacientes vulneráveis, idosos e crianças, ou com história recente de infarto do miocárdio. Ajustes de dose devem ser feitos preferencialmente à noite (MCCLURE; DANIELS, 2021) e diversos esquemas terapêuticos podem ser aplicados dependendo de cada situação. Apesar de as doses terapêuticas variarem muito entre as pessoas que utilizam o medicamento (ZIEGLER et al., 1976), em geral, nas doses convencionais de AM (50 a 150 mg/dia) as concentrações plasmáticas associadas aos efeitos antidepressivos esperados encontram-se na faixa de 80 a 200 ng/mL, ou 0,28 a 0,9 µM, aproximadamente (EMC, 2021); (WU et al., 2012). A dose de 1000 mg/dia é capaz de provocar intoxicação e cardiotoxicidade severas (ZHAI et al., 2020), (HIEMKE et al., 2018), (ULRICH et al., 2001), (KERR et al., 2001), (MCCLURE; DANIELS, 2021); (NELSON; SPYKER, 2017); (CROME, 1986).

A AM pode ser administrada por várias vias, sendo que a mais comum é a oral. É completamente absorvida no trato gastrointestinal, tem seu pico de concentração plasmática em torno de 6 horas

após sua administração e biodisponibilidade de 33% a 62%. Sofre metabolismo de primeira passagem pelo fígado, onde é metabolizada por enzimas do citocromo P450 (CYP3A4, CYP2C19 e CYP2D6), gerando um metabólito ativo, a nortriptilina (NOR). Liga-se extensivamente a proteínas plasmáticas e é altamente lipofílica, sendo absorvida por diversos tecidos. A meia-vida da AM é 10 a 28 horas, enquanto a da NOR varia de 16 a 80 horas, sendo eliminadas por excreção renal (GUPTA et al., 1999).

O principal mecanismo de ação da AM se baseia na inibição não seletiva de SERT, com maior afinidade ($K_i = 3,13$ nM), e NET, com menor afinidade ($K_i = 13,3$). A nortriptilina, produto ativo do metabolismo da AM, é um potente inibidor do NET, com maior afinidade ($K_i = 1,49$ nM), e do SERT, com menor afinidade ($K_i = 16,5$ nM) (LAWSON, 2017). Além disso, a AM é antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos, α_1 -adrenérgicos, histaminérgicos, serotoninérgicos, glutamatérgicos (NMDA), bloqueador de canais de cálcio (Ca^{2+}), sódio (Na^+) e potássio (K^+), e agonista de receptores opioidérgicos, o que caracteriza seu amplo perfil farmacológico (Tabela 1) (DAVIS, 2020); (DEVINE, 2016); (CAI; MCCASLIN, 1992); (SINDRUP et al., 2005); (ONALI et al., 2010).

Os principais efeitos colaterais da AM são observados principalmente em doses comumente indicadas para o tratamento da depressão. Alguns pacientes podem apresentar também alguns efeitos adversos no sistema nervoso central (SNC) como tontura, sonolência, dor de cabeça, confusão, delírio e possibilidade de aumento de comportamento suicida. O risco de arritmias e redução da condução cardíaca com prolongamento do intervalo QT existe em casos de sobredosagem (THOUR; MARWAHA, 2019).

Ação farmacológica	Efeito resultante
Inibição da recaptação de NA e 5-HT via NET e SERT, aumento de BNDF	Alívio de sintomas depressivos
Parassimpatolítica (antagonismo de receptores muscarínicos)	Taquicardia, xerostomia, constipação, retenção urinária
Antagonismo α_1 -adrenérgico	Hipotensão ortostática
Bloqueio de canais iônicos (Ca^{2+} , Na^+ e K^+)	Redução da frequência e contração cardíacas, controle da dor neuropática
Anti-histamínico H ₁	Sedação, aumento de apetite e ganho de peso
<i>Em sobredosagem (20 mg/kg) a AM costuma apresentar cardiotoxicidade, provocando arritmia e prolongamento do intervalo QT.</i>	

Tabela 1.: Principais ações farmacológicas clássicas e recentes da amitriptilina. Adaptado de McClure, 2017.

Os efeitos terapêuticos da AM na depressão surge após um período de 2 a 4 semanas do início do tratamento, dessa forma, alguns trabalhos sugerem outros mecanismos de ação do fármaco, reforçando as evidências de que apenas a teoria das monoaminas não é capaz de explicar a depressão, mas que as teorias neurotrófica, neuroimunológica e inflamatória são partes igualmente importantes no desenvolvimento da doença (MCCLURE; DANIELS, 2021); (BRUNO et al., 2020), (SZALACH et al., 2019). O agonismo da AM a receptores tirosinocinase TrkA e TrkB, sítios de ligação do fator de crescimento nervoso (NGF) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), respectivamente, que são importantes neurotrofinas relacionadas ao desenvolvimento da depressão (ARTIM et al., 2020), tem sido associada ao componente neurotrófico do seu efeito antidepressivo (JANG et al., 2009).

Reiterando o papel anti-inflamatório dos antidepressivos, a AM se mostrou capaz de exercer ação antagonista sobre os receptores do tipo *Toll* (2 e 4), responsáveis pela indução de vários genes envolvidos na resposta imune, incluindo citocinas inflamatórias (MEDZHITOV, 2001); (HUTCHINSON et al., 2010). Além disso, a amitriptilina se mostrou capaz de modular a resposta inflamatória positivamente em vários modelos experimentais (JOHNSON III et al., 2016); (ACHAR et al., 2009), atenuando a migração de neutrófilos e a degranulação de mastócitos (GURGEL et al., 2013), a chegada de leucócitos e os níveis IL-1 β e TNF (VISMARI; ALVES et al., 2010) em edema de pata de ratos, e reduzindo a concentração de IL-6, TNF, CCL2 e a ativação de NF- κ B em inflamação crônica após implante de biomaterial, em camundongos (SCHEUERMANN et al., 2021). Alguns estudos apresentam a redução na produção de NO, pela via do NF- κ B (QIU et al., 2017), e na concentração de citocinas pró-inflamatórias como uma possível explicação para os efeitos anti-inflamatórios da AM (VISMARI; PALERMO-NETO, 2012); (YARON et al., 1999).

Xia e colaboradores (2019) mostraram que a AM diminuiu a concentração de TNF em modelo de coagulopatia induzida por sepse em camundongos. A produção de TNF é estimulada por ceramida, responsável pela supregulação da resposta inflamatória mediada por vários agentes, gerada após a quebra da esfingomielina pela enzima esfingomielinase ácida (ASM). Recentemente um estudo mostrou que a AM foi capaz de inibir a atividade da ASM, reduzindo, assim, a progressão da aterosclerose em camundongos (LU et al., 2020).

Todos esses estudos confirmam os efeitos anti-inflamatórios da AM, mas ainda não há um acordo em relação ao seu mecanismo de ação por trás desses efeitos. O presente estudo apresenta a hipótese de que a AM teria o potencial de prevenir a doença aterosclerótica, atenuando as etapas iniciais da formação da placa, reduzindo a captação de LDLox, a disfunção endotelial e os eventos inflamatórios subsequentes à formação das células espumosas.

3. Justificativa

As doenças cardiovasculares são a maior causa de morte no mundo, sendo que 85% dos casos fatais decorrem de infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico, que são importantes consequências clínicas da aterosclerose. A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica e silenciosa que ocorre quando há acúmulo e oxidação de LDL na camada íntima arterial e, apesar de existir tratamento, as terapias farmacológicas atuais retardam, mas não previnem a formação de placas e nem as recidivas. Dessa forma, o reposicionamento de fármacos surge como alternativa valiosa empregando a amitriptilina como possível agente vasoprotetor. Estudos mostraram que a amitriptilina, um conhecido antidepressivo tricíclico, possui características anti-inflamatórias que poderiam atuar nos estágios iniciais da inflamação que leva à formação da placa aterosclerótica, impedindo a progressão da doença. Elucidar o mecanismo de ação de doses subterapêuticas da amitriptilina é importante para seu possível reposicionamento como um adjuvante na terapia da aterosclerose.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Avaliar as alterações induzidas pela LDLox em aortas, células endoteliais e macrófagos e o impacto do tratamento com a AM sobre estas alterações.

4.2. Objetivos específicos

Avaliar o papel da AM nas alterações vasculares e celulares induzidas pela LDLox:

- a. avaliar a resposta vascular contrátil de aortas;
- b. quantificar mensageiros vasoativos (NO e $\text{O}_2^{\bullet-}$) em células endoteliais;
- c. verificar a expressão de enzimas responsáveis pela produção de NO (eNOS, nNOS e iNOS) e envolvidas no estresse oxidativo (subunidades p22 e p47 da NADPH oxidase) em células endoteliais;
- d. determinar a variação do transiente de cálcio em células endoteliais;
- e. analisar a captação de LDLox e a expressão dos receptores CD36 e SRA em macrófagos;
- f. mensurar a expressão de iNOS e a secreção de mediadores inflamatórios (CCL2, TNF, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6) em macrófagos;

5. Metodologia

5.1. Obtenção da LDLox

5.1.1. Isolamento da LDLn humana

A LDLn utilizada em todos os experimentos deste trabalho foi obtida pelo método proposto por Chung e colaboradores (1980), que permite a separação de lipoproteínas através da criação de um gradiente descontínuo de densidade por ultracentrifugação. Assim, cada lipoproteína pode ser isolada de acordo com sua faixa de densidade em um único ensaio (CHUNG et al., 1980).

Amostras de sangue de indivíduos saudáveis foram submetidas à centrifugação por 10 min, a 3.000 rpm, em temperatura ambiente, para separação do plasma, onde foram adicionados os conservantes (0,5 % (v/v) de aprotinina, 0,5 % (v/v) de benzamidina 2 mM, 1 % de solução contendo azida sódica 5 % (v/v), EDTA 8 % (v/v) e clorafenicol 0,1 % (v/v) e 0,05 % de PMSF 0,5 mM em DMSO). Em seguida, a densidade foi ajustada para 1,21 g/mL (densidade da HDL) com brometo de potássio (KBr) sólido e a solução foi distribuída em tubos de polipropileno próprios para ultracentrifugação junto com uma solução de KBr de densidade igual a 1,006 g/mL (densidade do IDL), formando uma mistura bifásica. Os tubos foram colocados em ultracentrífuga (Sorvall Ultra Pro 80, DuPont), a 50.000 rpm, a 4°C, por 2 horas e meia.

Após a ultracentrifugação, a banda de coloração amarelada correspondente à fração de LDL ($d = 1,019$ a $1,063$ g/ml) formada no centro dos tubos foi coletada e dialisada por 24 horas sob agitação constante, em câmara fria (4°C a 8°C) e ao abrigo da luz, em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, pH=7,4) para remoção do KBr, com uma troca de tampão na metade do tempo.

5.1.2. Oxidação da LDLn humana

A LDL dialisada foi coletada para oxidação com sulfato de cobre (CuSO_4 , 5 μM), a 37°C, por 4 horas, sob agitação constante em estufa. A utilização de íons cobre é um método comumente utilizado em experimentos *in vitro* para a obtenção de LDLox (LARA-GUZMÁN et al., 2018); (LEVITAN et al., 2010). A reação foi interrompida com EDTA (EDTA 2:1 CuSO_4). Ao final de nova diálise, com duas trocas de tampão, para remoção do CuSO_4 , a amostra foi esterilizada com filtro de seringa de 0.22 μm em fluxo laminar e armazenada a -20°C por no máximo 2 semanas.

5.2. Delineamento experimental

Os experimentos foram realizados utilizando células endoteliais humanas, macrófagos e fragmentos de aorta de camundongo. As concentrações de LDLox e AM foram as mesmas para todos os experimentos. A divisão dos grupos experimentais encontra-se na tabela 2 e se deu da seguinte forma: o grupo controle (CT) recebeu apenas veículo (água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q); dois grupos receberam apenas amitriptilina (AM) em concentrações diferentes (0,1 μM ou 1 μM); o grupo LDLox recebeu apenas LDLox (50 $\mu\text{g/mL}$); e dois grupos receberam uma associação de LDLox (50 $\mu\text{g/mL}$) e AM (0,1 μM ou 1 μM). Essas concentrações de AM foram utilizadas com base na literatura (WU et al., 2012); (EMC, 2021) e em experimentos anteriores do nosso grupo. As concentrações utilizadas para os experimentos em macrófagos e aortas de camundongos foram escolhidas de acordo com resultados obtidos nas células endoteliais e em estudos prévios do grupo.

(1) CT (veículo)	(2) AM 0,1 (0,1 μM)	(3) AM 1 (1 μM)
(4) LDLox (50 $\mu\text{g/mL}$)	(5) AMox 0,1 (LDLox + AM 0,1 μM)	(6) AMox 1 (LDLox + AM 1 μM)

Tabela 2.: Divisão de grupos experimentais: (1) grupo controle (CT); (2, 3) grupos incubados somente com amitriptilina nas concentrações 0,1 μM (AM 0,1) e 1 μM (AM 1); (4) grupo incubado com LDLox, 50 $\mu\text{g/mL}$ (LDLox); (5, 6) grupos incubados com LDLox (50 $\mu\text{g/mL}$) e amitriptilina nas concentrações 0,1 μM (AMox 0,1) e 1 μM (AMox 1).

A amitriptilina foi utilizada neste trabalho na forma de cloridrato de amitriptilina (313,87 g/mol), facilmente solúvel em água. Aliquotas nas concentrações 1×10^{-5} e 1×10^{-4} mol/L em água ultrapura foram preparadas, esterilizadas em filtros de 0.22 μm e estocadas a -20°C até o momento dos experimentos.

As amostras (aortas, células endoteliais e macrófagos) foram incubadas por 24 horas com os diferentes tratamentos junto com o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM *high glucose*, D7777, Sigma-Aldrich, composição: 4 mM L-glutamina, 4500 mg/L glicose, 1 mM piruvato de sódio) suplementado com 1500 mg/L bicarbonato de sódio e 1% (v/v) de antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina), livre de soro fetal bovino (SFB), a não ser quando especificado de outra forma no texto. Após o período de incubação, o material foi coletado para a realização dos experimentos. As informações referentes à divisão dos grupos experimentais serão citadas novamente nas seções subsequentes.

5.3. Experimentos de reatividade vascular em aorta torácica de camundongo

5.3.1. Animais

Camundongos machos da linhagem C57BL/6, com idade entre 14 e 16 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da UFMG, foram utilizados para a obtenção dos anéis de aorta utilizados nos experimentos de reatividade vascular. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (com no máximo 5 camundongos por gaiola) acondicionadas em ambiente com temperatura controlada e ciclos de luminosidade de 12 horas, no biotério do Departamento de Farmacologia do ICB (UFMG), tendo livre acesso a ração e água até o momento dos experimentos. Os experimentos realizados neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o protocolo número 423/2015.

5.3.2. Obtenção dos anéis de aorta e incubação dos tratamentos

Os animais foram eutanasiados por decapitação para obtenção de suas aortas torácicas por laparotomia. Os vasos, livres de tecido adiposo perivascular e de tecido conjuntivo, foram transferidos para uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit, pH=7,4 (NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, NaHCO₃ 25 mM, CaCl₂.2H₂O 2,5 mM, glicose 11 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄.7H₂O 1,2 mM), onde foram seccionados em anéis de aproximadamente 3 mm que foram transpassados por duas hastes metálicas triangulares.

Os anéis foram lavados solução de Krebs-Henseleit estéril, em capela de fluxo laminar, e transferidos para placas de cultura contendo DMEM (D7777, Sigma-Aldrich, composição: 4 mM L-glutamina, 4500 mg/L glicose, 1 mM piruvato de sódio) suplementado com 1500 mg/L bicarbonato de sódio e 1% (v/v) de antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) reduzido, ou seja, enriquecido com 1% (v/v) de SFB (Gibco™). Em seguida, a incubação dos tratamentos se deu de acordo com a seguinte divisão: o grupo CT recebeu apenas veículo (água ultrapura); um grupo recebeu apenas 0,1 µM de amitriptilina (AM 0,1); outro grupo recebeu apenas 50 µg/mL LDLox (LDLox); e o último grupo recebeu uma associação de LDLox (50 µg/mL) e AM (0,1 µM). Os vasos foram mantidos em incubadora de CO₂ a 5%, a 37°C, por 24 horas.

5.3.3. Montagem e estabilização dos vasos em sistema de banho de órgãos

Os anéis de aorta foram montados em um sistema de banho de órgãos contendo solução de Krekbs-Henseleit (a 37°C, pH=7,4) e injeção constante de mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), simulando condições fisiológicas. As cubas do sistema ficam conectadas a um sistema de transdução de tensão que faz os registros de tensão por meio da captação individual da tensão isométrica captada por transdutores isométricos (*World Precision Instruments, Inc.*, EUA). Os sinais captados passam por um amplificador (modelo TBM-4; *World Precision Instruments, Inc.*, EUA) acoplado a um computador equipado com uma placa conversora analógico-digital (AD16JR; *World Precision Instruments, Inc.*, EUA) que faz a conversão dos dados para o programa *WinDaq Data Acquisition* (Dataq® Instruments), permitindo a aquisição dos resultados para análise.

Uma tensão de repouso de 1 g foi aplicada aos anéis aórticos e monitorada por uma hora. A escolha da tensão aplicada foi baseada em curvas de tensão realizadas anteriormente no mesmo aparelho. Durante o período de estabilização das preparações, a solução de Krekbs-Henseleit presente nas cubas foi substituída em intervalos de 15 minutos para evitar o acúmulo de metabólitos e garantir a restauração dos níveis de glicose indispensáveis ao metabolismo vascular. Todas as etapas do processo foram executadas cuidadosamente para evitar dano aos tecidos endotelial e muscular.

5.3.4. Teste de viabilidade das preparações

Todas as preparações foram estimuladas com 80 mmol/L de cloreto de potássio (KCl), utilizado como agente despolarizante para induzir a contração máxima dos vasos, e aqueles que não responderam ao KCl foram eliminados do estudo. A solução de Krekbs-Henseleit foi trocada a cada 15 minutos até a eliminação completa do KCl. Todos os protocolos de contração seguintes foram realizados baseados na contração máxima ao KCl.

5.3.5. Resposta contrátil à fenilefrina e participação das NOS

As alterações provocadas pela pré-incubação com LDLox e/ou AM na resposta contrátil foram avaliadas por meio de curvas cumulativas concentração-reposta à fenilefrina (Phe), um agonista α 1-adrenérgico. Para isso, concentrações crescentes de Phe (10^{-9} a 10^{-4} M) foram adicionadas às preparações e a contração obtida em cada ponto foi registrada.

A participação das NOS nas respostas observadas também foi avaliada. Para isso, algumas preparações foram incubadas por 30 minutos com 300 μM de N^{G} -Nitro-L-Arginina Metil Éster (L-NAME, Sigma), um inibidor não seletivo das NOS, antes da realização das curvas concentração-resposta à Phe (10^{-9} a 10^{-4} M). Os experimentos com o inibidor foram realizados de forma não pareada. Todos os resultados obtidos foram expressos em contração percentual em relação à contração máxima dos vasos ao KCl para posterior comparação dos dados.

5.4. Cultivo celular

Os experimentos com células foram realizados utilizando-se células endoteliais humanas da linhagem EA.hy926 (ATCC®CRL-2922™) ou macrófagos de camundongo da linhagem RAW264.7 (ATCC®TIB-71™). A linhagem de células endoteliais humanas EA.hy926 é aderente e foi estabelecida por hibridização de células primárias HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana) com a linhagem A549 (células derivadas de tecido carcinomatoso pulmonar). A linhagem de macrófagos de camundongo RAW264.7 é aderente e deriva da Leucemia Murina de Abelson. Tanto as células EA.hy926 quanto as RAW264.7 são transformadas, ou seja, o fenótipo original das células é preservado enquanto o genótipo é alterado, o que proporciona alta taxa de multiplicação e ilimitada capacidade de proliferação, facilitando o cultivo (ALVES E. A.; GUIMARÃES, 2010).

As duas linhagens celulares foram cultivadas separadamente em garrafas de 75 cm^2 , próprias para cultivo celular, em incubadora de CO_2 a 5%, a 37°C, com DMEM suplementado com de 4 mM L-glutamina, 4500 mg/L glicose, 1 mM piruvato de sódio, 1500 mg/L bicarbonato de sódio e 1% (v/v) de antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina) completo, ou seja, enriquecido com 10% (v/v) de SFB (Gibco™). O subcultivo das células foi realizado de acordo com as recomendações da ATCC® (USA) para cada tipo celular.

Para a realização dos experimentos, as células foram plaqueadas em placas de 12, 24 ou 96 poços, de acordo com cada experimento e incubadas com DMEM completo até a confluência desejada. O meio de cultura era, então, substituído por DMEM reduzido (composição semelhante à do DMEM completo, porém com apenas 1% (v/v) de SFB), no qual as células ficavam por até 24 horas para interromper a proliferação celular. Em seguida, o meio de cultura reduzido era descartado e os tratamentos eram aplicados nos poços juntamente com DMEM livre de SFB (conforme descrito na seção 5.2, de delineamento experimental), com ou sem vermelho de fenol, para evitar possíveis interferências nos resultados.

5.5. Experimentos com células endoteliais

5.5.1. Viabilidade celular

A viabilidade das células endoteliais foi testada utilizando-se um kit de morte celular (V13241, Molecular Probes, Invitrogen) contendo iodeto de propídio (IP, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ~535/617 nm). O IP penetra nas células cuja membrana já não está mais íntegra, intercalando-se em seu DNA e indicando, assim, apoptose tardia ou morte celular (RIEGER et al., 2011), (VERMES et al., 1995), (FRIED et al., 1976).

Resumidamente, 2×10^5 células/poço foram plaqueadas e tratadas em placas de 12 poços conforme descrito anteriormente. As células foram lavadas com PBS e desagregadas enzimaticamente com tripsina-EDTA 0,05%. Após inativação da tripsina, o *pool* de células foi transferido para microtubos que foram centrifugados para descarte do sobrenadante e ressuspensão com 2 $\mu\text{g/mL}$ de IP por 15 minutos. Em seguida, a leitura de pelo menos 10000 eventos por amostra foi realizada no citômetro *BD FACS Calibur™ System* (BD Biosciences, EUA) do Laboratório de Citometria do ICB (Centro de Laboratórios Multiusuários, CELAM, do ICB - UFMG). Os programas utilizados para aquisição e análise dos dados foram, respectivamente, o *BD FACS CellQuest Pro* e o *FlowJo v10.0.6* e os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis (não marcadas com IP).

5.5.2. Quantificação de NO e superóxido

Os níveis de NO e ânion $\text{O}_2^{\bullet-}$ nas células endoteliais foram analisados por citometria de fluxo utilizando-se as sondas DAF-FM e DHE (Molecular Probes, EUA). A sonda DAF-FM fluoresce no verde ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ~495/519 nm, SpectraViewer Thermo Fisher Scientific) depois de interagir com o NO e fica aprisionada no interior das células por ação enzimática. O DHE, por sua vez, ao ser oxidado por espécies reativas, como o $\text{O}_2^{\bullet-}$, liga-se ao DNA da célula e emite fluorescência avermelhada ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ~518/606 nm, Thermo Fisher Scientific). Depois de difundidas e modificadas no meio intracelular, as sondas se tornam impermeáveis à membrana, permitindo a detecção apenas daquilo que encontra-se no interior das células.

Em resumo, 1×10^5 células/poço foram plaqueadas e tratadas em placas de 24 poços conforme descrito anteriormente. Após o descarte dos sobrenadantes, as células foram lavadas com PBS, dissociadas e transferidas para microtubos (conforme protocolo de viabilidade celular, na subseção 5.5.1) para adição das sondas. As sondas DAF-FM (5 $\mu\text{mol/L}$) e DHE (5 $\mu\text{mol/L}$), diluídas

em DMEM livre de SFB e vermelho de fenol, foram carregadas e as amostras foram colocadas em incubadora de CO₂ por 30 minutos, a 37°C.

Além da determinação dos níveis basais de NO e O₂^{•-}, avaliou-se a participação das NOS, de forma que algumas células foram estimuladas com ACh (10 µmol/L) por 30 minutos antes da aplicação das sondas. As células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 2% (v/v) em PBS e armazenadas a 4°C, ao abrigo da luz, até o momento da leitura, que foi realizada conforme o protocolo utilizado no teste de viabilidade celular descrito na subseção 5.5.1. Os resultados foram expressos em intensidade média de fluorescência (MFI) multiplicada pela porcentagem de células marcadas na população total de EA.hy926 (definida com base em tamanho e granulosidade da linhagem celular utilizada).

5.5.3. Expressão proteica de NOS e NADPH oxidase

A expressão proteica das enzimas produtoras de NO (nNOS, iNOS e eNOS) e ROS (NADPHox) foi avaliada por imunofluorescência em células endoteliais. Para isso, lamínulas circulares de vidro foram descontaminadas (álcool-éter e luz UV) e acondicionadas em placas de 12 poços, onde foram plaqueadas 2x10⁵ células/poço conforme descrito anteriormente. As células aderidas nas lamínulas foram fixadas com PFA a 4% (v/v) em PBS por 10 minutos, lavadas e permeabilizadas com metanol gelado por 1 minuto e solução de bloqueio (Triton X-100 0,1% + albumina 1% em PBS) por 30 minutos. Em seguida, as lamínulas foram lavadas para a incubação por 12 horas com diversos anticorpos primários, seguidos dos anticorpos secundários conjugados às sondas fluorescentes CFL 488 e 647 (1:200, Santa Cruz, EUA), incubados por 2 horas no escuro. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-iNOS, anti-nNOS, anti-eNOS, anti-p47^{phox} e anti-p22^{phox} (1:100, Santa Cruz, EUA).

As lamínulas foram lavadas e montadas em lâminas retangulares de vidro com o meio de montagem *ProLongTM Gold Antifade Mountant* (Molecular Probes) com DAPI, para identificar os núcleos celulares no momento da captura das imagens. As lâminas foram levadas ao microscópio de fluorescência Nikon Eclipse Ti do Centro de Processamento e Aquisição de Imagens (CAPI, ICB-UFMG) para obtenção das imagens de pelo menos 4 campos por lamínula para análise posterior no programa *ImageJ*. Para a captura das imagens, os parâmetros de tempo de exposição e intensidade da luz foram pré-fixados para que a aquisição de todas as imagens ocorresse sob as mesmas condições.

A análise das imagens foi feita contornando as células inteiras e a intensidade de fluorescência (IF) total foi calculada com a fórmula de fluorescência corrigida:

$$\text{Fluorescência Corrigida} = \text{IntDen} - (\text{area} \times \text{back}) \quad (5.1)$$

que leva em consideração a densidade integrada por célula (*IntDen*), a área de cada célula (*área*) e uma média de 3 regiões do *background* (*back*). Os resultados foram expressos em média da IF por imagem.

5.5.4. Influxo de cálcio

As alterações no transiente de cálcio, provocadas pelo estímulo com lisofosfatidilcolina (LPC, 10 μM) (CHAUDHURI et al., 2003) e tratamento com AM, foram avaliadas utilizando a sonda Fluo-4, capaz de emitir fluorescência ao interagir com o cálcio citoplasmático ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} \sim 494/506$ nm, Molecular Probes). A LPC é um produto da oxidação da LDLn, inclusive por cobre, que é gerada pela ação da fosfolipase A2 associada a lipoproteínas (Lp-PLA2), uma enzima que circula ligada a lipoproteínas de alta e baixa densidade e transforma fosfolipídios em lisofosfolipídios. A LPC é o principal fosfolipídio oxidado encontrado na molécula de LDLox, sendo responsável por vários dos efeitos da LDLox (COLLES; CHISOLM, 2000).

Células endoteliais (2×10^5 células/poço) foram plaqueadas em placas de 12 poços e os grupos experimentais foram divididos da seguinte maneira: o grupo CT recebeu apenas veículo (água ultrapura); o segundo grupo recebeu apenas 0,1 μM de amitriptilina (AM 0,1); o terceiro recebeu apenas LPC (10 μM); e o quarto recebeu uma associação de LPC (10 μM) e AM (0,1 μM). As amostras foram incubadas por 24 horas com os diferentes tratamentos e DMEM livre de SFB.

O protocolo da seção 5.5.1 com algumas modificações foi utilizado. Depois de serem transferidas das placas para os microtubos, as células foram carregadas com 5 μM da sonda Fluo-4 (em PBS) por 20 minutos no escuro e lavadas com PBS para a leitura do estado basal. Em seguida, a transiente de cálcio foi medida nos tempos 0, 5, 10, 15 e 30 minutos após estímulo com 10 μM de ACh. Os resultados foram expressos em MFI relativa ao basal (f/f_0 , em que f_0 é a MFI medida basal, anterior ao estímulo com ACh, e f é MFI medida em cada tempo após a adição da ACh).

5.6. Experimentos com macrófagos

5.6.1. Captação de LDL oxidada

A avaliação da formação de células espumosas foi realizada por fluorescência. Macrófagos (2×10^5 células/poço) foram cultivados conforme descrito na seção 5.4 para marcação da LDLox com a sonda Vermelho de Nilo (Sigma-Aldrich), que emite fluorescência alaranjada ($\lambda_{em} \leq 570$ nm) ao ligar-se a lipídeos neutros presentes na molécula de LDLox, como triglicerídeos e ésteres de colesterol (RUMIN et al., 2015); (GREENSPAN et al., 1985).

Após o tempo de tratamento, as células foram fixadas com PFA a 4% (v/v) em PBS por 10 minutos, lavadas e permeabilizadas com solução de bloqueio (Triton X-100 0,1% + albumina 1% em PBS) por 30 minutos. Antes da montagem das lâminas e obtenção das imagens conforme descrito na seção 5.5.3, as células foram incubadas por 30 minutos, no escuro, com a sonda Vermelho de Nilo (0,2 µg/mL).

5.6.2. Expressão proteica dos receptores CD36 e SR-A

Para determinar a expressão proteica de CD36 e SRA, os principais receptores de LDLox em macrófagos, realizou-se imunofluorescência conforme descrito na seção 5.5.3. Em experimentos isolados, foram utilizados os anticorpos primários anti-CD36 ou anti-SR-A (1:200, Invitrogen), e o anticorpo secundário conjugado à sonda fluorescente CruzFluor™ (CFL) 488 (Santa Cruz).

5.6.3. Expressão proteica de iNOS

A expressão proteica de iNOS em macrófagos foi avaliada por imunofluorescência conforme protocolo descrito para as células endoteliais (Seção 5.5.3). Foram utilizados os anticorpos primário anti-iNOS e secundário conjugado à sonda fluorescente CFL 488.

5.6.4. Dosagem de mediadores inflamatórios no sobrenadante celular

A determinação das concentrações de IL-1 β , TNF, IL-6 e CCL2 no sobrenadante de macrófagos foi feita por meio de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), um teste colorimétrico

imunoenzimático que permite capturar e detectar proteínas utilizando anticorpos através de reações enzimáticas que geram um produto final colorido mensurável em espectrofotômetro. As células foram plaqueadas (1×10^5 células/poço) e tratadas conforme descrito para o cultivo celular, na seção 5.4, em placas de 24 poços. Em seguida, os sobrenadantes celulares foram coletados e submetidos ao kit ELISA MAXTM Standard Set (Biolegend, EUA) para a quantificação de cada mediador de acordo com as instruções do fabricante. De forma resumida, microplacas (Nunc Maxisorp[®]) de 96 poços para ELISA foram revestidas com o *coating buffer* contendo os anticorpos de captura e armazenadas a 4°C por 12 horas no escuro. As placas foram lavadas com o *wash buffer* (Tween-20 0,05 % (v/v) em PBS) entre todas as incubações e armazenadas ao abrigo da luz sempre que necessário. Após 1 hora de bloqueio (1 % (p/v) de albumina de soro bovino (BSA) em PBS), os padrões e as amostras foram incubados por mais 12 horas, a 4°C, até a incubação dos anticorpos de detecção por 1 hora, em temperatura ambiente. Em seguida, o complexo Avidina-HRP (*horseradish peroxidase*) foi incubado por 30 minutos e uma solução de ortofenilenodiamina (OPD) composta de OPD 3,7 mM e 2 µL de H₂O₂ 30% (v/v) em 10mL de tampão citrato-fosfato, ácido cítrico 28 mM e Na₂HPO₄·7H₂O 94 mM (pH=5) foi utilizada como substrato. A reação foi interrompida após 15 minutos com uma solução de H₂SO₄ a 1 M. A absorbância das amostras foi medida no comprimento de onda de 450 nm pelo leitor de placas SynergyTM 2 utilizando o programa Gen5TM (ambos da BioTek[®] Instruments, Inc).

5.7. Análise estatística e expressão dos dados

A análise de todos os resultados foi realizada utilizando o programa *GraphPad Prism 7.00*. A presença de *outliers* foi identificada pelo teste de Grubbs. A distribuição dos dados foi analisada com os testes de normalidade de D'Agostino & Pearson ou Shapiro-Wilk. Para os dados com distribuição normal, foram utilizados o teste t, para comparar 2 grupos, ou a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida do pós-teste de Tukey, para comparar 3 grupos ou mais. Os resultados dos experimentos de reatividade vascular foram expressos em percentual da contração máxima induzida pelo KCl. A concentração que induziu 50% de resposta (EC₅₀), a potência do agonista (pEC₅₀, ou pD₂, que equivale ao -log EC₅₀) e a resposta máxima (E_{max}) provocada pelo agonista também foram determinados por regressão não linear das curvas concentração-resposta obtidas. Todos os resultados foram expressos como média ± EPM e foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1. Resultados do estudo em anéis de aorta de camundongo

6.1.1. Efeito da AM sobre a disfunção vascular induzida pela LDLox

A exposição dos fragmentos de aorta à LDLox por 24 horas diminuiu a contração induzida pela Phe em relação ao grupo CT (Figura 4). A AM, por sua vez, potencializou a contração induzida pela Phe na ausência e na presença de LDLox (Figura 4). Os valores de Emax e pEC50 relativos à contração pela Phe sem podem ser consultados na tabela 3.

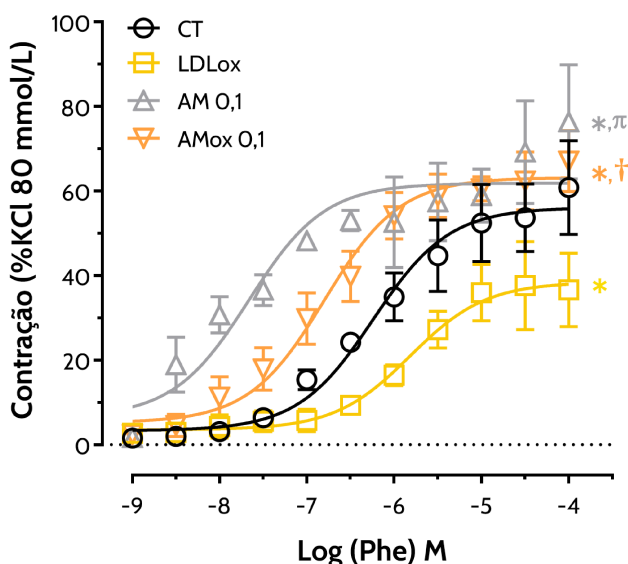


Figura 4.: Efeito vasoconstritor induzido por Phe em anéis de aorta (n=6) de camundongo expostos ou não à LDLox e/ou AM. Os dados representam a média $\pm$ EPM dos valores obtidos. Two-way ANOVA e *post hoc* de Tukey. Os diferentes símbolos representam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação aos grupos CT (*), LDLox (†) e AMox 0,1 (π).

Phe sem L-NAME				
Grupo	CT	LDLox	AM 0,1	AMox 0,1
Emax (%)	60,84 $\pm$ 11,1	36,64 $\pm$ 8,7*	76,41 $\pm$ 13,5	67,11 $\pm$ 7,2 [†]
pEC50	6,24 $\pm$ 0,18	5,82 $\pm$ 0,20*	7,67 $\pm$ 0,25*, π	6,8 $\pm$ 0,1*, [†]

Tabela 3.: Valores de Emax e pEC50 da resposta vascular à Phe sem L-NAME de cada grupo experimental. ANOVA e *post hoc* de Tukey. Os diferentes símbolos representam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação aos grupos CT (*), LDLox (†) e AMox 0,1 (π).

A adição de L-NAME gerou um aumento na contração de todos os grupos (Figura 5), mas o aumento da contração no grupo LDLox foi maior do que no grupo CT, resultando em maior variação da área sob a curva (*area under curve*, AUC). Esse resultado indica que há mais NO no grupo LDLox.

Na presença de LDLox, a AM normaliza o delta da AUC com L-NAME, o que mostra que a AM reduziu o excesso de NO produzido pela LDLox. Por outro lado, a AM também reduziu os níveis de NO na ausência de LDLox, ou seja, o delta da AUC dos grupos incubados com AM foram menores do que os grupos CT e LDLox, independente da LDLox. Os valores de Emax e pEC50 relativos à contração pela Phe com L-NAME podem ser consultados na tabela 4.

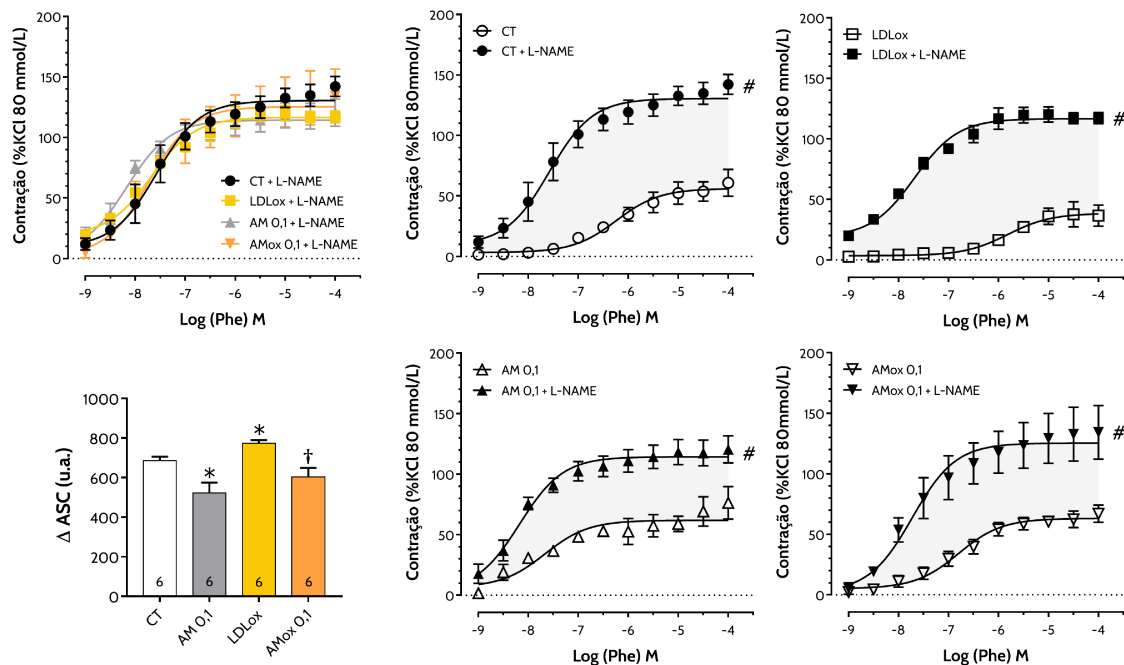


Figura 5.: Efeito vasoconstritor induzido por Phe em anéis de aorta (n=6) de camundongo expostos ou não à LDLox e/ou AM na presença de L-NAME (300 μM). Os dados representam a média ±EPM dos valores obtidos. Teste t ou ANOVA e *post hoc* de Tukey. Os diferentes símbolos representam diferença estatística (p<0,05) em relação aos grupos CT (*), LDLox (†) e entre curvas do mesmo grupo com e sem L-NAME (#).

Phe com L-NAME				
Grupo	CT	LDLox	AM 0,1	AMox 0,1
Emax (%)	142,2 ± 8,2	117,2 ± 4,6	120,5 ± 11,2	134,3 ± 22,1
pEC50	7,58 ± 0,14	7,68 ± 0,1	8,18 ± 0,16	7,73 ± 0,23

Tabela 4.: Valores de Emax e pEC50 da resposta vascular à Phe com L-NAME de cada grupo experimental. ANOVA. Não houve diferença estatística entre os grupos.

6.2. Resultados do estudo em células endoteliais

6.2.1. Viabilidade celular

Os resultados apresentados na figura 6 representam a porcentagem média de células vivas em cada grupo avaliado em relação ao grupo CT. Valores menores de 80% foram considerados inviáveis. O detergente Triton X-100 1% (v/v) foi utilizado como controle positivo de morte celular. A análise dos resultados do ensaio de viabilidade celular (Figura 6) revelou que a LDLox na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a viabilidade das células endoteliais, ao passo que as concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ não. Dessa forma, a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ foi escolhida por ser a maior concentração que não provoca morte celular.

O teste mostrou ainda que as concentrações de AM utilizadas (0,1 μM e 1 μM), na ausência ou presença de LDLox (50 $\mu\text{g/mL}$), não foram tóxicas para as células endoteliais (Figura 6). Baseado em estudos prévios, a menor concentração (0,1 μM) foi escolhida para realizar todos os outros experimentos.

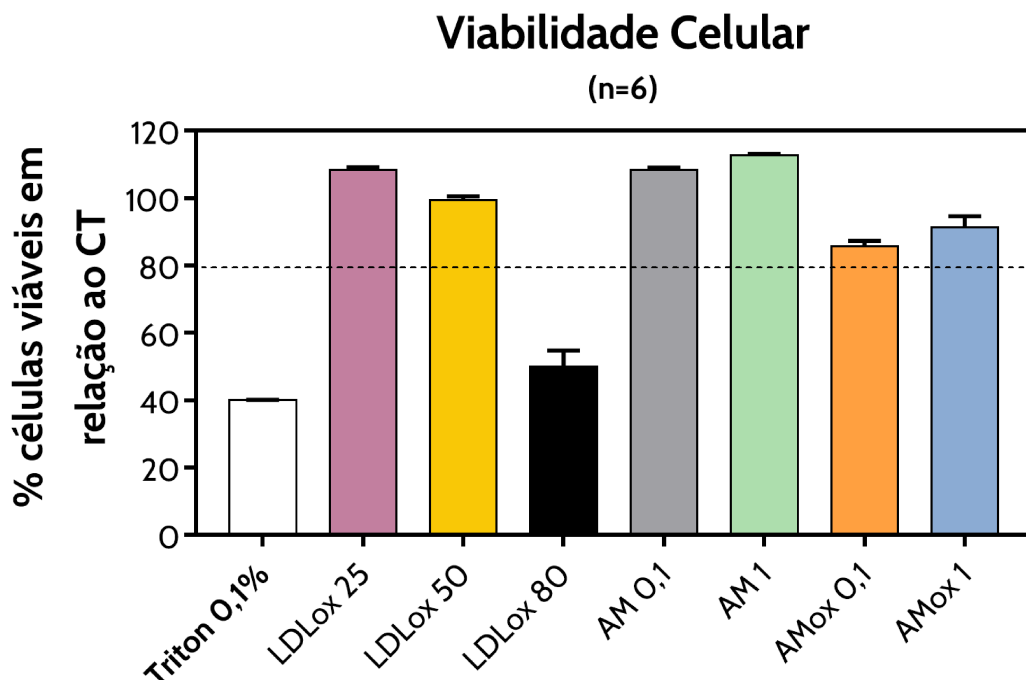


Figura 6.: Viabilidade das células endoteliais após exposição a concentrações diferentes de LDLox (25, 50 e 80 $\mu\text{g/mL}$) e de AM (0,1 e 1 μM) na presença e ausência de LDLox (50 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. As barras representam a porcentagem média $\pm$ EPM dos valores obtidos de 6 experimentos separados com 10000 eventos cada. As populações com porcentagens médias maiores do que 80% foram consideradas viáveis.

6.2.2. Quantificação de NO

Buscando compreender a variação na resposta contrátil observada nos experimentos de reatividade celular, o próximo passo foi quantificar o NO em células endoteliais no estado basal e estimulado com ACh. Os dados obtidos por citometria de fluxo revelaram que a concentração basal de NO foi maior nas células incubadas com LDLox (Figura 7) do que nas do grupo CT. Esses resultados reiteram o que foi observado na resposta vascular na presença de LDLox. A incubação com AM reduziu os níveis basais de NO em relação ao grupo CT na ausência de LDLox e, de forma mais pronunciada, na presença de LDLox.

O estímulo com ACh aumentou quantidade de NO em todos os grupos (Figura 7), porém, o aumento observado nos grupos não incubados com LDLox foi maior do que naqueles incubados com LDLox (em relação ao estado basal). Essa diferença pode ser visualizada no gráfico da figura 7 pela diferença entre as barras que representam o NO basal e o estimulado com ACh. A AM não alterou o NO estimulado com ACh em relação ao grupo CT, mas reduziu os níveis de NO em relação ao grupo LDLox na presença de LDLox.

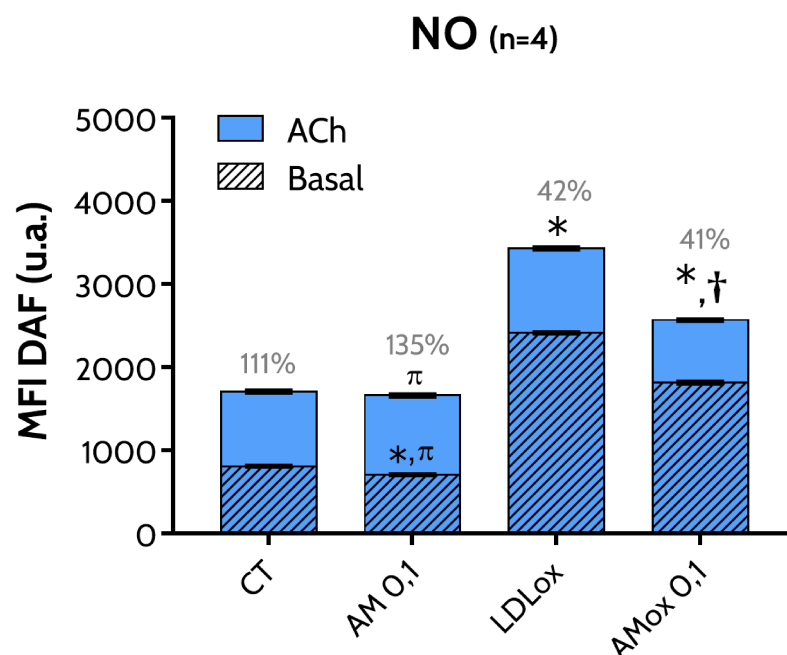


Figura 7.: Resultados obtidos por citometria de fluxo em células endoteliais incubadas ou não com LDLox e/ou AM por 24 horas. As colunas mais claras representam os níveis de NO no estado basal e as mais escuras o NO estimulado com ACh. Os dados representam a média da intensidade de fluorescência (MFI) da sonda DAF multiplicada pela porcentagem de células de cada população $\pm$ EPM. Os valores foram obtidos de 4 experimentos separados com 10000 eventos cada (n=4). ANOVA e *post hoc* de Tukey. Os diferentes símbolos representam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação aos grupos CT (*), LDLox (†) e AMox 0,1 (π). A porcentagem de aumento de cada grupo encontra-se acima de sua respectiva coluna.

6.2.3. Expressão proteica das NOS

Os resultados de imunofluorescência mostraram que a LDLox reduziu a expressão proteica de eNOS (Figura 8 A) e nNOS (Figura 8 B) e aumentou a de iNOS (Figura 8 C) nas células endoteliais em relação ao grupo CT. A incubação com AM na ausência de LDLox reduziu a expressão de todas as isoformas da NOS em relação ao grupo CT, como pode ser visto na figura 8. Na presença de LDLox, a AM não alterou o efeito produzido pela LDLox na expressão de eNOS e nNOS, mas reduziu a expressão de iNOS quando comparada ao grupo LDLox (Figura 8).

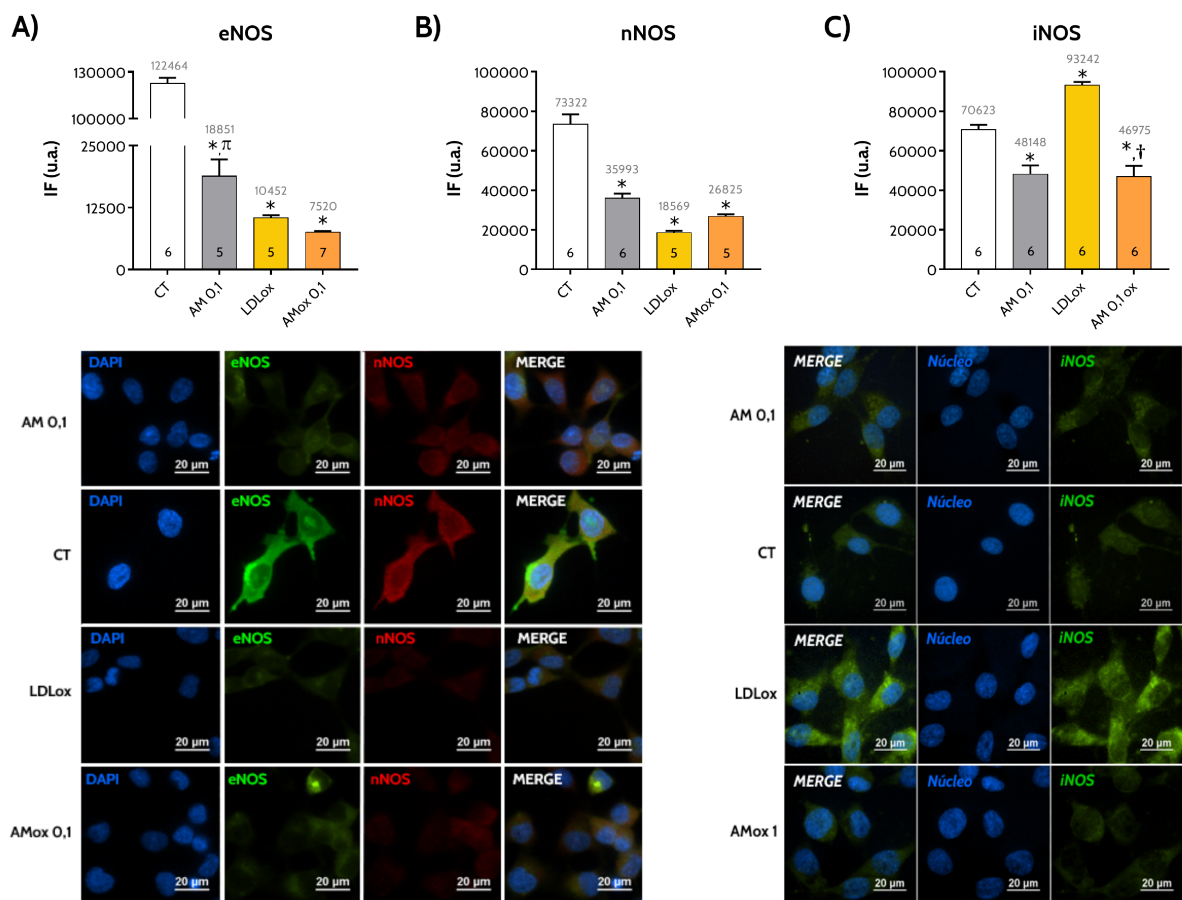


Figura 8.: Expressão de eNOS (A), nNOS (B) e iNOS (C) por imunofluorescência em células endoteliais incubadas ou não com LDLox e/ou AM por 24 horas. As colunas representam a média da intensidade de fluorescência $\pm$ EPM por imagem. O n amostral de cada grupo está indicado nas colunas. ANOVA e *post hoc* de Tukey. Os diferentes símbolos representam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação aos grupos CT (*), LDLox (†) e AMox 0,1 (π). As imagens representativas de cada grupo estão indicadas no painel. A média de cada grupo encontra-se acima de sua respectiva coluna.

6.2.4. Efeito da AM no estresse oxidativo induzido por LDLox

I. Detecção de espécies reativas de oxigênio

Os resultados dos experimentos de citometria para a detecção de ROS mostraram que a quantidade basal de $O_2^{\bullet-}$ (Figura 9) foi maior nas células incubadas com LDLox e/ou AM em relação ao grupo CT. Na ausência de LDLox a AM provocou aumento no $O_2^{\bullet-}$ basal, ao passo que, na presença de LDLox, provocou redução. Para investigar a origem do $O_2^{\bullet-}$, as células foram estimuladas com ACh.

Os resultados obtidos após estímulo com ACh encontram-se na figura 9. A ACh aumentou a quantidade detectada de ROS nos grupos incubados com LDLox e/ou AM. Na presença de LDLox, a AM reduziu os níveis de $O_2^{\bullet-}$ em relação ao grupo LDLox. Na ausência de LDLox, a incubação com AM gerou um aumento de ROS em relação ao grupo CT.

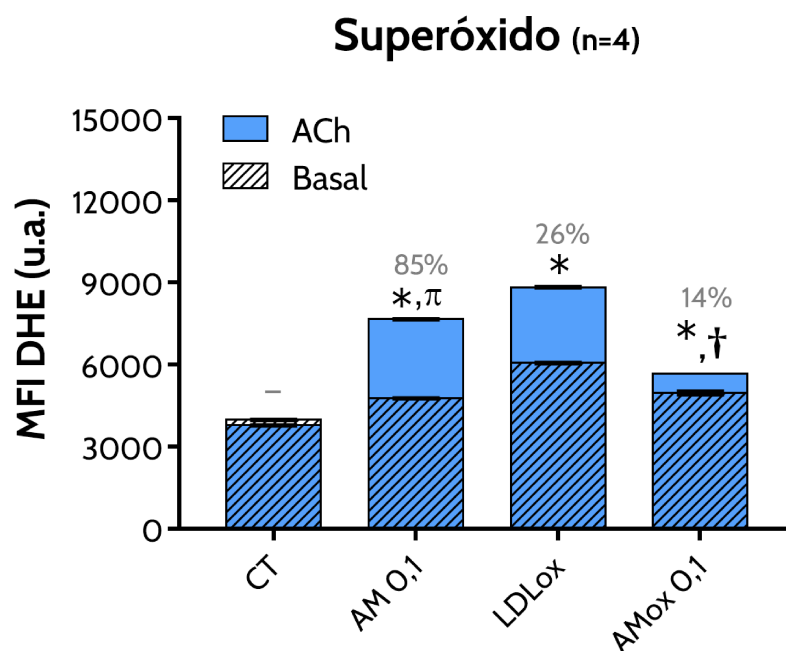


Figura 9.: Dosagem de $O_2^{\bullet-}$ por citometria de fluxo em células endoteliais incubadas ou não com LDLox e/ou AM por 24 horas, no estado basal e após estímulo com ACh (10 μ M) por 30 minutos (**A**). Os dados representam a média da intensidade de fluorescência multiplicada pela porcentagem de células de cada população $\pm$ EPM. Os valores foram obtidos de 4 experimentos separados com 10000 eventos cada (n=4). ANOVA e *post hoc* de Tukey. Os diferentes símbolos representam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação aos grupos CT (*), LDLox (†) e AMox 0,1 (π). A porcentagem de aumento de cada grupo encontra-se acima de sua respectiva coluna.

II. Expressão proteica de NADPH oxidase

Com base nos resultados de ROS, a expressão proteica das subunidades p22^{phox} e p47^{phox} NADPHox foi avaliada. Como pode ser visto na figura 10, a incubação com AM aumentou a expressão das duas subunidades da NADPHox independente da LDLox, assim a AM não foi capaz de reverter a alteração provocada pela LDLox via NADPHox.

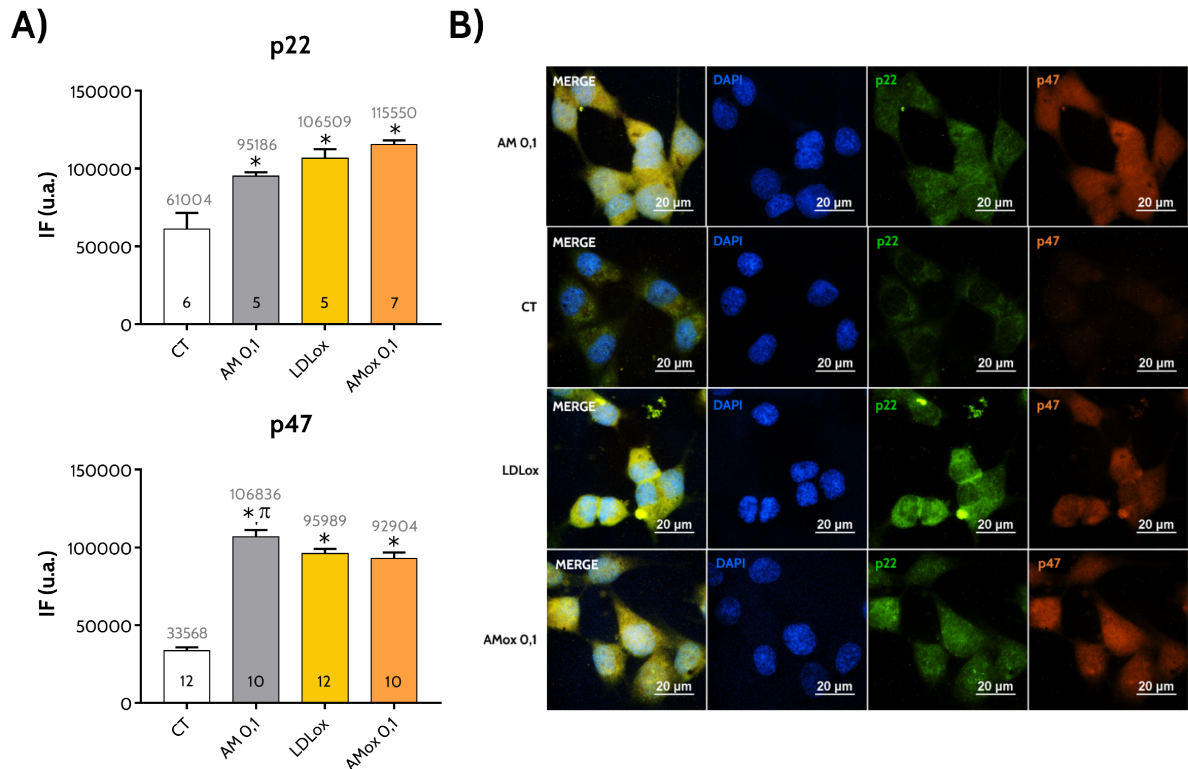


Figura 10.: Em **A**, expressão das subunidades p22 e p47 da NADPH oxidase por imunofluorescência em células endoteliais incubadas ou não com LDLox e/ou AM por 24 horas. As colunas representam a média da intensidade de fluorescência $\pm$ EPM por imagem. O *n* amostral de cada grupo está indicado nas colunas. ANOVA e *post hoc* de Tukey. Os diferentes símbolos representam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação aos grupos CT (*), LDLox ([†]) e AMox 0,1 (^π). A média de cada grupo encontra-se acima de sua respectiva coluna. Em **B**, imagens representativas de cada grupo.

6.2.5. Avaliação do transiente intracelular de cálcio

O cálcio é um sinalizador de extrema relevância para vários processos celulares. Como houve variação nos níveis de NO após estímulo com ACh e o cálcio é essencial no mecanismo de produção de NO estimulada por ACh, foi realizada a análise do transiente de cálcio em células endoteliais no estado basal e após estímulo com ACh durante 30 minutos.

Os resultados de cálcio basal mostraram que a $[Ca^{2+}]_i$ foi maior nas células pré-incubadas com LPC por 24 horas quando comparadas às do grupo CT (Figura 11 A). A incubação com AM na ausência de LPC não alterou a $[Ca^{2+}]_i$ em relação ao grupo CT (Figura 11 A). Quando as células foram estimuladas com ACh, a LPC aumentou a $[Ca^{2+}]_i$ nas células endoteliais a partir do décimo minuto (Figura 11 B). A AM, na ausência ou presença de LPC, manteve a $[Ca^{2+}]_i$ igual à do grupo CT (Figura 11 B), mas inibiu o pico de cálcio observado no grupo CT nos primeiros 5 minutos de estímulo com ACh.

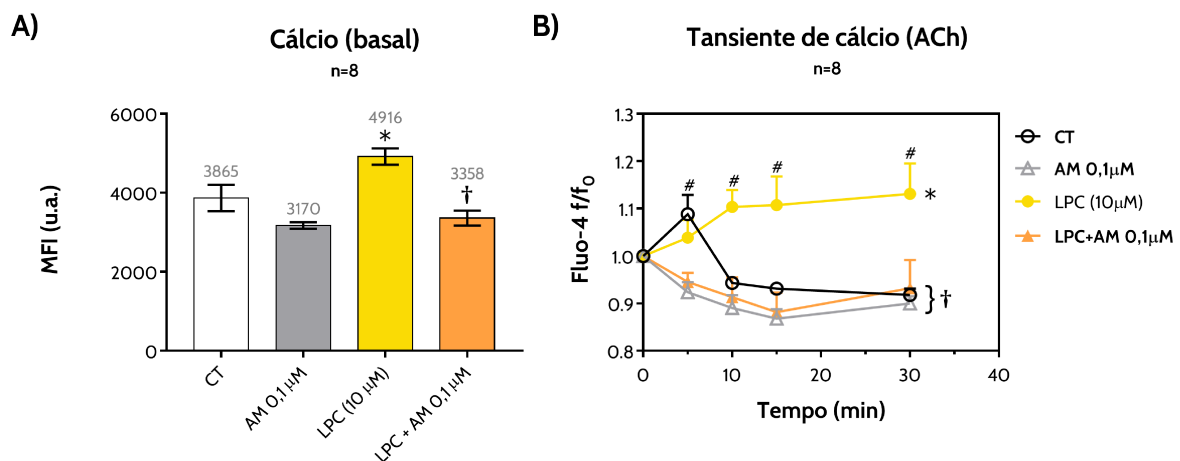


Figura 11.: Concentrações intracelulares de cálcio no estado basal e após estímulo com ACh, quantificado por citometria de fluxo com a sonda Fluo-4. Em **A**, os dados representam a MFI da sonda Fluo-4, calculada multiplicando-se a média da intensidade de fluorescência captada pela porcentagem de células de cada população $\pm$ EPM. Em **B**, o gráfico mostra a razão entre os valores de MFI após estímulo com ACh e no estado basal de cada grupo em cada tempo analisado, ao longo de 30 minutos. Os valores foram obtidos de 8 experimentos separados com 10000 eventos cada. ANOVA e *post hoc* de Tukey. Os diferentes símbolos representam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação aos grupos CT (*), LDLox (†) e ao tempo zero do próprio grupo (#). A média de cada grupo encontra-se acima de sua respectiva coluna.

6.3. Resultados do estudo em macrófagos

6.3.1. Captação de LDLox

Diante dos resultados obtidos em vasos e células endoteliais, o efeito da AM em macrófagos incubados com LDLox foi avaliado. Diferente das células endoteliais, os macrófagos possuem natureza fagocítica, sendo responsáveis pela captação da LDLox e formação de células espumosas, processo importante na progressão da placa aterosclerótica (BEKKERING et al., 2014). A AM foi capaz de reduzir a captação de LDLox, como pode ser visto na figura 12.

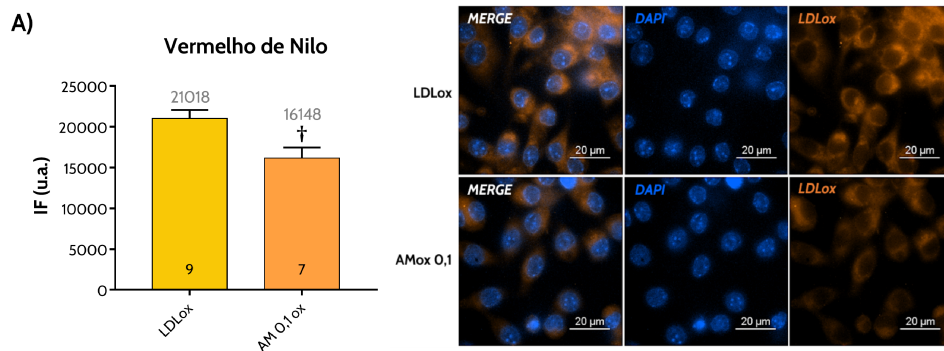


Figura 12.: Captação de LDLox por fluorescência em macrófagos incubados ou não com LDLox e/ou AM por 24 horas. As colunas representam a média da intensidade de fluorescência $\pm$ EPM por imagem. O n amostral de cada grupo está indicado nas colunas. Teste t não pareado. O símbolo † representa diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo LDLox. A média de cada grupo encontra-se acima de sua respectiva coluna. As imagens representativas de cada grupo estão indicadas no painel.

6.3.2. Avaliação da expressão proteica de receptores CD36 e SRA

A análise da expressão dos receptores CD36 e SR-A revelou que a expressão dos dois receptores, SRA e CD36, foi maior nos grupos incubados com LDLox em relação aos respectivos grupos CT. A incubação com AM aumentou a expressão basal de SRA (Figura 13) e CD36 (Figura 14). Por outro lado, na presença de LDLox, a AM provocou duas situações distintas: reduziu a expressão de SRA (Figura 13) e aumentou a de CD36 (Figura 14).

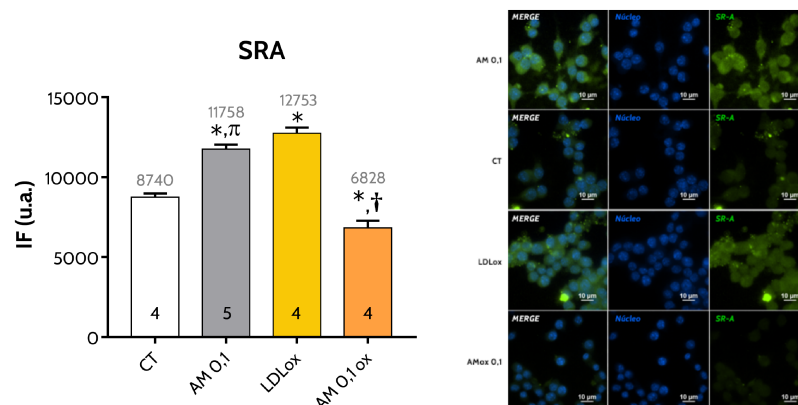


Figura 13.: Expressão do receptor SRA em macrófagos incubados com LDLox e/ou AM por 24 horas. As colunas representam a média da intensidade de fluorescência $\pm$ EPM por imagem. O n amostral de cada grupo está indicado nas colunas. ANOVA e *post hoc* de Tukey. Os diferentes símbolos representam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação aos grupos CT (*), LDLox (†) e AMox 0,1 (π). A média de cada grupo encontra-se acima de sua respectiva coluna. As imagens representativas de cada grupo estão indicadas no painel.

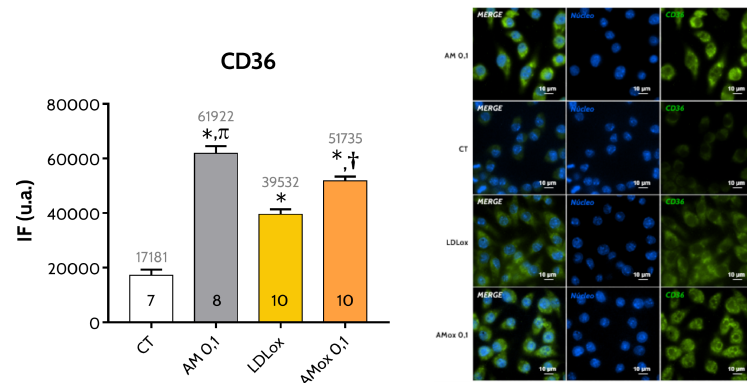


Figura 14.: Expressão do receptor CD36 em macrófagos incubados com LDLox e/ou AM por 24 horas. As colunas representam a média da intensidade de fluorescência $\pm$ EPM por imagem. O n amostral de cada grupo está indicado nas colunas. ANOVA e *post hoc* de Tukey. Os diferentes símbolos representam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação aos grupos CT (*), LDLox (†) e AMox 0,1 (π). A média de cada grupo encontra-se acima de sua respectiva coluna. As imagens representativas de cada grupo estão indicadas no painel.

6.3.3. Avaliação da expressão proteica de iNOS

A LDLox aumentou a expressão proteica de iNOS tanto em células endoteliais quanto em macrófagos (Figura 15). O resultado reforça o papel da LDLox na ativação da iNOS observado em células endoteliais. A AM reduziu a expressão de iNOS na presença de LDLox e não foi diferente em relação ao grupo CT na ausência de LDLox (Figura 15 A). Esses resultados confirmam que a AM reduz a expressão de iNOS induzida por LDLox, assim como ocorreu com as células endoteliais.

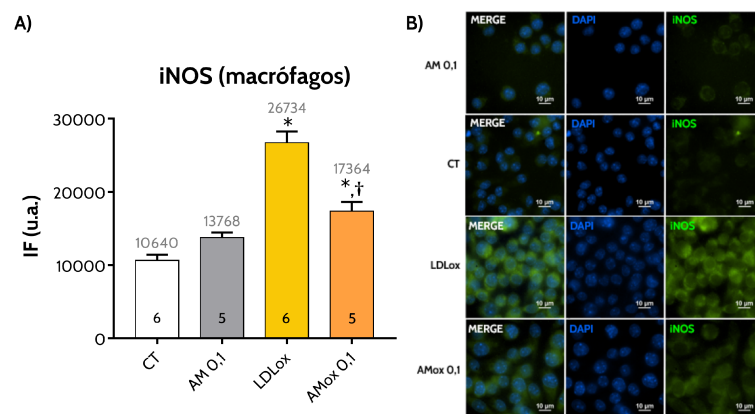


Figura 15.: Em **A**, expressão de iNOS por imunofluorescência em macrófagos incubados ou não com LDLox e/ou AM por 24 horas. As colunas representam a média da intensidade de fluorescência $\pm$ EPM por imagem. O n amostral de cada grupo está indicado nas colunas. ANOVA e *post hoc* de Tukey. Os diferentes símbolos representam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação aos grupos CT (*), LDLox (†) e AMox 0,1 (π). A média de cada grupo encontra-se acima de sua respectiva coluna. Em **B**, imagens representativas de cada grupo.

6.3.4. Dosagem de mediadores inflamatórios no sobrenadante celular

Os resultados revelaram que a incubação com LDLox promoveu o aumento de todos os mediadores pró-inflamatórios avaliados (CCL2, IL-6, IL-1 β e TNF) em relação ao grupo CT (Figura 16). Na presença de LDLox, a AM foi capaz de reduzir os níveis de CCL2, IL-6, IL-1 β e TNF aumentados pela LDLox (Figura 16). A incubação com AM na ausência de LDLox não provocou diferenças em relação ao controle (Figura 16).

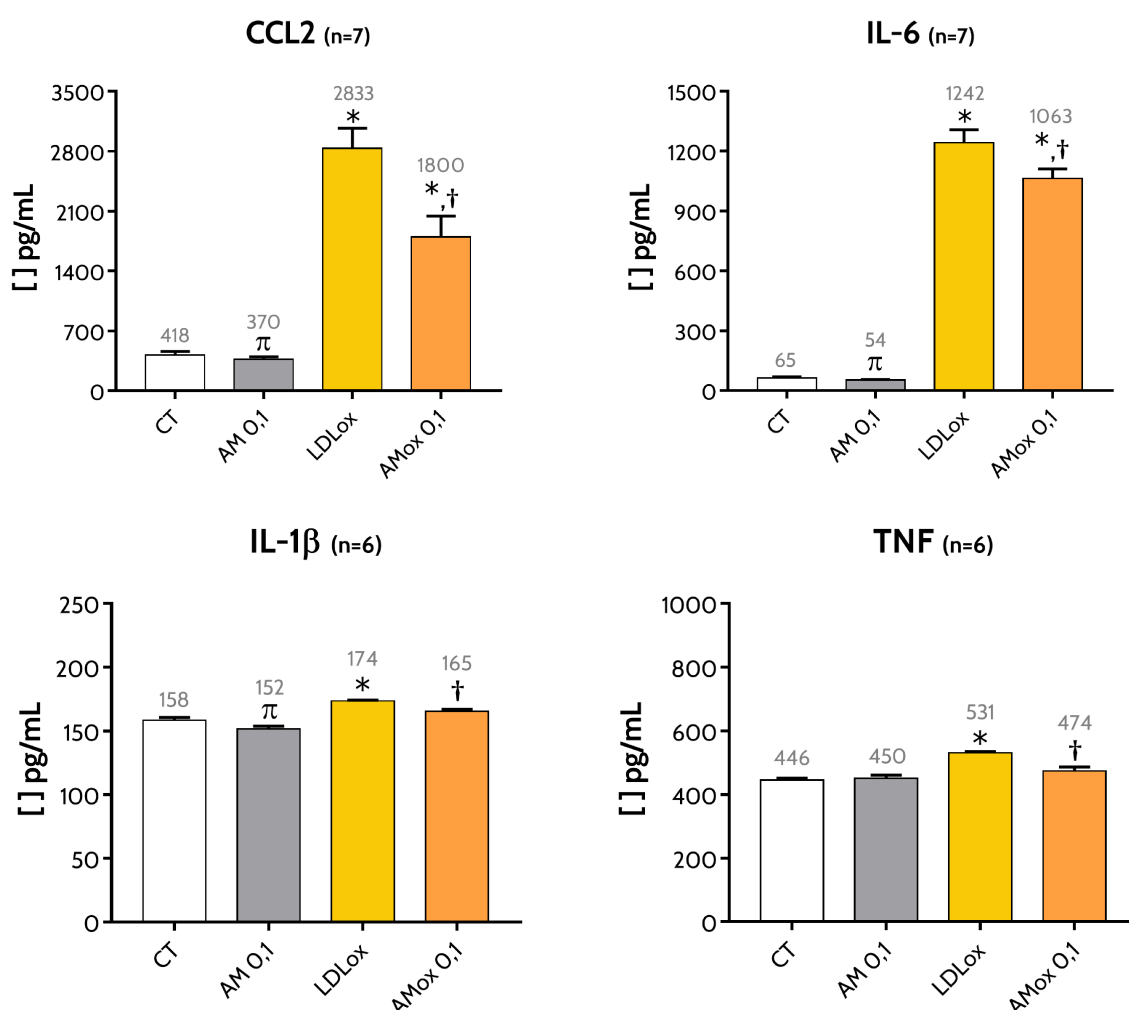


Figura 16.: Dosagem de citocinas no sobrenadante de macrófagos por ELISA após incubação com LDLox e/ou AM por 24 horas. As colunas representam a média $\pm$ EPM dos valores obtidos. O *n* amostral de cada grupo está indicado nos títulos dos gráficos. ANOVA e *post hoc* de Tukey. Os diferentes símbolos representam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação aos grupos CT (*), LDLox (†) e AMox 0,1 (π). A média de cada grupo encontra-se acima de sua respectiva coluna.

6.4. Resumo dos resultados

O presente trabalho mostra de forma consistente os seguintes resultados. A LDLox foi capaz de aumentar os níveis basais de NO via aumento na expressão de iNOS, reduzindo a contratilidade induzida pela Phe; promover estresse oxidativo, via aumento de ROS; aumentar o cálcio intracelular; induzir o aumento da captação de LDLox, via aumento na expressão dos receptores CD36 e SRA; e elevar a concentração de CCL2, IL-6, IL-1 β e TNF. A AM modulou as alterações induzidas pela LDLox prevenindo a hiporresponsividade vascular induzida pela LDLox, reduzindo a produção de NO pela iNOS e o influxo de cálcio aumentado pela LPC. Dessa forma, a AM atenuou o acúmulo de LDLox via redução na expressão de SRA e, conseqüentemente, diminuiu a liberação de CCL2, IL-6, IL-1 β e TNF. Por fim, a AM, por si, aumentou a resposta contrátil induzida pela Phe e reduziu a expressão das 3 isoformas da NOS, porém, aumentou a quantidade detectada de NO após estímulo com ACh, reduziu a $[Ca^{2+}]_i$ e aumentou a expressão dos receptores de LDLox (CD36 e SRA) sem alterar a concentração de CCL2, IL-6, IL-1 β e TNF. A figura 17 consiste na representação esquemática do resumo dos resultados encontrados neste estudo.

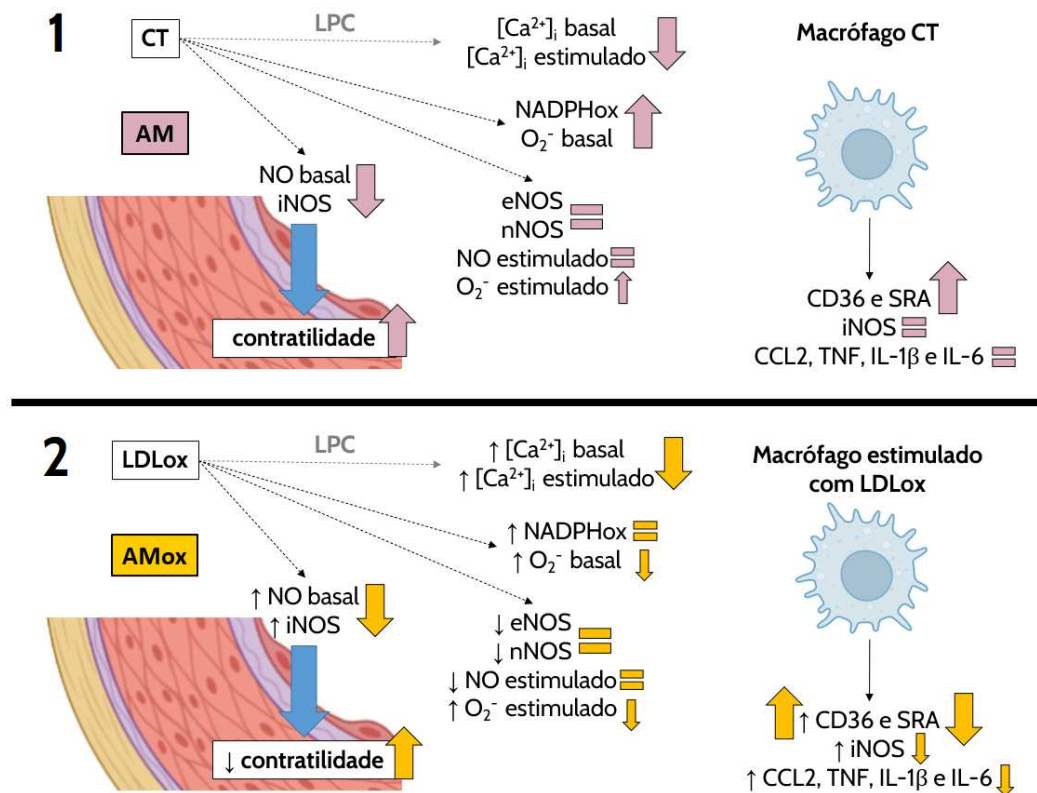


Figura 17.: Representação esquemática do resumo dos resultados apresentados no presente trabalho. O esquema 1 mostra os efeitos da AM (0,1 μ M) sobre as respostas do controle (símbolos em lilás); o esquema 2, as alterações provocadas pela LDLox (50 μ g/mL) sobre o controle (símbolos em preto) e a ação da AM sobre as alterações provocadas pela LDLox (símbolos em amarelo).

7. Discussão

7.1. Efeitos da exposição à LDLox

A aterosclerose é uma doença progressiva e silenciosa que pode ser evitada e tratada pelo controle dos fatores de risco e por uma gama de fármacos. Mesmo assim, as DCV continuam sendo a maior causa de mortes no mundo desde 1990 (RITCHIE; ROSER, 2018), o que intensifica a necessidade da busca por mais opções de tratamento para a doença. No presente estudo, a pré-incubação com LDLox (50 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas reduziu a contração à Phe em relação ao grupo CT e tal resposta foi associada ao aumento da expressão de iNOS em células endoteliais, resultando em aumento dos níveis basais de NO. Além disso, uma vez que a iNOS é expressa, é capaz de produzir de 100 a 1000 vezes mais NO do que as isoformas constitutivas (KIBBE et al., 1999). Além disso, como mostrado por Strunk e colaboradores (2001), a indução prolongada da expressão da iNOS pode levar a hiporresponsividade vascular em ratos com sepse induzida por LPS devido às altas quantidades de NO produzidas. Tal fato leva a um quadro hipotensivo sistêmico que é revertido pela inibição seletiva da iNOS (STRUNK et al., 2001). Estes dados são suportados pelo significativo aumento na contratilidade dos vasos tratados com LDLox em presença de L-NAME. Navia-Pelaez e colaboradores (2017) mostraram que a incubação com uma concentração menor de LDLox (25 $\mu\text{g/mL}$) por 6 horas aumentou a resposta contrátil de aorta de camundongo à Phe (NAVIA-PELAEZ et al., 2017). Este é um exemplo de que o tempo de incubação, a concentração de LDLox, a forma de oxidação da lipoproteína e o modelo experimental podem determinar o perfil de resposta observado.

Em um primeiro momento, a LDLox pode provocar redução na biodisponibilidade de NO associado ao desacoplamento da eNOS e nNOS (CAMPOS-MOTA et al., 2017) e consequente aumento da vasoconstrição induzida pela Phe. Com o prolongamento do estímulo, o perfil de resposta muda, uma vez que é ativada a cascata inflamatória provocando aumento na expressão da iNOS e na produção basal de NO. Em paralelo, há intensa liberação de mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio (levando ao estresse oxidativo) que, juntos, alimentam a lesão aterosclerótica (DETMERS et al., 2000); (GLIOZZI et al., 2019). No presente estudo, quando foi analisado o delta da AUC na presença e ausência de L-NAME, observou-se que o tratamento com a LDLox levou a um aumento da variação observada, sugerindo aumento na biodisponibilidade de NO neste grupo. Como a única isoforma das NOS aumentada neste grupo foi a iNOS, conclui-se que tal aumento de NO foi devido ao aumento da iNOS.

Para os experimentos de reatividade vascular, os anéis aórticos foram pré-incubados por 24 horas em meio de cultura e em incubadora de CO_2 antes da montagem no sistema de banho de

órgãos e avaliação da resposta vascular, de acordo com uma adaptação do protocolo de Navia-Pelaez e colaboradores (NAVIA-PELAEZ et al., 2017), que utilizaram um tempo de 6 horas de pré-incubação. O período de pré-incubação de 24 horas, por si só, parece ter levado a uma hiporresponsividade ao agonista contrátil Phe, reduzindo a contração máxima, bem como a sustentação necessária para a realização das curvas de relaxamento. Dessa forma, apenas as alterações contráteis à Phe foram avaliadas. Esta limitação impossibilitou a avaliação da integridade endotelial das preparações utilizadas neste estudo. Na tentativa de contornar tal limitação, foi realizada, em paralelo, a montagem de anéis aórticos recém-isolados de camundongo pelo mesmo experimentador e seguindo o mesmo critério em todas as montagens, para a verificação da integridade endotelial. Logo, a possibilidade de falha mecânica durante o processo de montagem foi minimizada. Contudo, como a resposta ao KCl foi preservada, os dados de contração vascular induzida pela Phe foram expressos como percentual da contração máxima ao KCl de cada preparação individualmente.

Vários estudos mostraram que a disfunção endotelial provocada pela LDLox promove o desacoplamento de eNOS e nNOS, causando redução na produção de NO (NAVIA-PELAEZ et al., 2017); (CAMPOS-MOTA et al., 2017); (GRADINARU et al., 2015); (STEPP et al., 2002). Além disso, a LDLox consegue inibir a eNOS por meio de alterações estruturais nas caveolas – um tipo de balsa lipídica membranar onde a eNOS fica ancorada – promovendo o deslocamento da eNOS e da caveolina, uma proteína de ancoragem da eNOS na caveola, para outro sítios na célula (SHAUL, 2003). Neste trabalho foi visto que a LDLox reduziu a expressão total de eNOS e nNOS e a produção de NO estimulada por ACh quando comparada ao grupo CT. Além disso, a LDLox aumentou os níveis de $O_2^{\bullet-}$ no estado basal e após estímulo com ACh, sugerindo também um provável desacoplamento destas enzimas.

Apesar de o desacoplamento de eNOS e nNOS estar associado à produção de $O_2^{\bullet-}$, a maior fonte de ROS nos vasos sanguíneos é a NADPHox (OU et al., 2010). Azumi e colaboradores (2002) mostraram que existe correlação entre a produção de ROS e a expressão de NADPHox (p22-phox) com a LDLox em carótidas de pacientes com angina pectoris (AZUMI et al., 2002). A NADPHox possui duas subunidades catalíticas associadas que ficam na membrana (p91^{phox} e p22^{phox}) e três regulatórias que ficam no citosol (p47^{phox}, p40^{phox} e p67^{phox}). Para que ocorra a ativação da NADPHox, é necessária a migração do complexo citosólico para a membrana, onde a p47^{phox} interage com a p22^{phox} depois de sofrer fosforilação. Wang e colaboradores (2018) viram que a LDLox é capaz de induzir a migração de p47-phox para a membrana (WANG et al., 2018). Neste trabalho foi visto que a LDLox aumenta a expressão de p22^{phox} e p47^{phox} em células endoteliais. Quando o $O_2^{\bullet-}$ interage com o NO, favorece a disfunção endotelial por meio da redução da biodisponibilidade do NO e da formação de ONOO⁻, levando à progressão da placa aterosclerótica na presença de LDLox (NAVIA-PELAEZ et al., 2017). O ONOO⁻ é uma espécie reativa altamente deletéria gerada após a reação do $O_2^{\bullet-}$ com o NO que provoca peroxidação e nitração de vários

substratos orgânicos, depleção de BH₄ e desacoplamento das NOS constitutivas (DAVIGNON; GANZ, 2004). No entanto, o presente estudo não avaliou os níveis de ONOO⁻.

A LDLox pode induzir a ativação de diversas vias pró-inflamatórias, como a do NFκB, induzindo a transcrição gênica de iNOS e mediadores pró-inflamatórios (ANRATHER et al., 2006); (BONOMINI et al., 2015). Segundo Leiva e colaboradores (2015), a LDLox é capaz de estimular a produção de ROS e a liberação de CCL2, TNF e IL-1β. Em concordância com a literatura, foi mostrado no presente estudo que a LDLox aumentou a expressão de iNOS e os níveis CCL2, IL-6, IL-1β e TNF em macrófagos. Uma importante etapa relacionada à ativação de vias pró-inflamatórias é reconhecimento da LDLox pelos receptores de LDLox, o que também foi mostrado neste estudo. Em relação ao grupo CT, a LDLox provocou aumento na expressão dos receptores CD36 e SRA. Esses dados corroboram com Bekkering e colaboradores (2014) que mostraram que a exposição prolongada com LDLox (por 24 horas) promoveu a formação de células espumosas pelo aumento da expressão dos receptores scavenger CD36 e SRA, resultando em aumento na produção de vários mediadores inflamatórios como IL-6, TNF, IL-8, IL-18 e CCL2 (BEKKERING et al., 2014).

O cálcio é um importante segundo mensageiro envolvido em uma série de eventos celulares, desde a produção de NO pelas NOS constitutivas nas células endoteliais e a contração muscular nas células musculares lisas, até a apoptose em diversos tipos celulares. Mazière e colaboradores (2005) mostraram que a LDLox é capaz de aumentar os níveis de cálcio intracelular, assim como a LPC, um importante componente da molécula de LDLox associada aos seus efeitos pró-aterogênicos (MAZIÈRE et al., 2005). Nos resultados aqui apresentados, a LPC (10 μM) produziu um aumento sustentado na [Ca²⁺]_i a partir de 10 minutos do estímulo com ACh em células endoteliais, ao passo que no grupo CT houve somente um pico de cálcio após 5 minutos de estímulo. Além disso, o cálcio basal também estava aumentado no grupo LPC em relação ao grupo CT. Tal resultado está em concordância com os resultados de Chaudhuri e colaboradores (2003), que mostraram um aumento intracelular de cálcio provocado pela LPC (12,5 μM) em células endoteliais sem estímulo com ACh (CHAUDHURI et al., 2003). O aumento da [Ca²⁺]_i também está relacionado à ocorrência de apoptose por meio da ativação de inflamassoma e caspases (ORRENIUS et al., 2003), e da amplificação da secreção de IL-1β, IL-6 e TNF, favorecendo um estado pró-inflamatório (ROSSOL et al., 2012). Seabra e colaboradores (1998) mostraram que a inibição da elevação de cálcio intracelular, por meio do bloqueio de canais de cálcio na membrana, reduziu a produção de TNF em células de Kupffer (macrófagos residentes no fígado) (SEABRA et al., 1998). Logo, moduladores do aumento de cálcio induzido por lipídeos oxidados seriam de extrema utilidade clínica para o manejo da doença aterosclerótica.

7.2. Efeitos da AM sobre as alterações induzidas pela LDLox

O objetivo geral do presente estudo foi investigar os efeitos da AM nas alterações provocadas pela LDLox em aortas e macrófagos murinos, e em células endoteliais humanas. Portanto, foi utilizado um modelo de incubação prolongada (por 24 horas) de células e vasos com LDLox (50 $\mu\text{g/mL}$), crucial para o início e a manutenção da resposta imunoinflamatória característica da doença. Como discutido anteriormente, os resultados obtidos mostraram que o modelo *in vitro* escolhido foi capaz de reproduzir alguns dos eventos iniciais envolvidos na formação da placa aterosclerótica. Como dito nos resultados, desafio com LDLox na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ foi escolhido porque esta foi a maior concentração de LDLox que não apresentou citotoxicidade. Além disso, tal concentração de LDLox encontra-se dentro da faixa comumente utilizada em modelos *in vitro* para estudar a aterosclerose (XAVIER et al., 2004). A concentração de 0,1 μM de AM, por sua vez, foi escolhida por ter sido considerada subterapêutica de acordo com as estimativas realizadas e com a literatura. Em seu uso como antidepressivo e analgésico, estima-se que as concentrações plasmáticas sejam de aproximadamente 80 a 200 ng/mL, ou 0,28 a 0,9 μM (EMC, 2021); (WU et al., 2012). Dessa forma, é plausível dizer que a exposição das células e dos vasos à concentração de 0,1 μM de AM simulou uma dose subterapêutica do fármaco.

Vários estudos têm mostrado o papel anti-inflamatório dos ADT, reduzindo o recrutamento de células do sistema imune, a liberação de citocinas pró-inflamatórias e a ativação de vias pró-inflamatórias (BIANCHI; PANERAI, 1996). No estudo de Lu e colaboradores (2020), a AM inibiu a aterosclerose e a esteatose hepática não alcoólica em camundongos por meio da modulação de esfingolipídios de membrana, reduzindo a produção de ceramida e, consequentemente, a expressão de citocinas pró-inflamatórias e ativação de vias apoptóticas (LU et al., 2020). Além disso, já foi mostrado também que a AM pode prevenir a angiogênese (GUAN et al., 2019), processo pró-aterogênico que favorece a instabilidade da placa e a ocorrência de eventos tromboembólicos (CAMARÉ et al., 2017).

No presente estudo a AM foi capaz de reverter a queda acentuada da contração observada no grupo LDLox, aproximando a resposta observada à que foi vista no controle. Além disso, a análise do delta da AUC na presença do L-NAME mostrou que a diferença do grupo incubado com LDLox e AM foi menor que o do grupo incubado apenas com LDLox, sugerindo que a AM reduz o aumento de NO induzido pela LDLox. Na presença de LDLox, a quantidade de ROS detectada no grupo incubado com LDLox e AM foi menor quando comparada à do grupo LDLox, porém, a AM não foi capaz de restaurar a expressão de eNOS e nNOS (reduzidas pela LDLox), o que pode justificar o menor aumento de NO após estímulo com ACh em células endoteliais. Contudo, tanto a expressão de iNOS quanto o NO basal foram significativamente menores no

grupo incubado com LDLox e AM. Esses resultados estão em concordância com um estudo que avaliou os efeitos de ADT em modelo de dor neuropática em ratos, em que a administração em dose única da AM (25 mg/kg) foi eficaz em promover antinocicepção por meio da inibição da iNOS no SNC (FARGHALY et al., 2012). Portanto, os dados aqui apresentados sugerem que a AM poderia reduzir a resposta inflamatória controlando a expressão de iNOS induzida pela LDLox.

Na presença de LDLox, a AM aumentou a expressão de receptores CD36, porém, a captação de LDLox foi atenuada, o que provavelmente está relacionado à redução na expressão de receptores SR-A observada em macrófagos. Em 2010, Mäkinen e colaboradores mostraram que o silenciamento de um dos receptores, CD36 ou SR-A, é eficaz em reduzir a aterogênese em camundongos e macrófagos da linhagem RAW264.7 incubados com LDLox por 24 horas. Foi mostrado também que a falta de um receptor pode ser compensada pelo aumento na expressão do outro (MÄKINEN et al., 2010). Além disso, a AM reduziu o transiente de cálcio em células endoteliais na presença de LDLox, tanto no estado basal quanto após estímulo com ACh. Rahaman e colaboradores (2011) mostraram que a captação de LDLox, que também pode ser realizada pela célula endotelial, é um processo dependente de cálcio (RAHAMAN et al., 2006). No grupo incubado com LDLox e AM houve também redução na expressão de iNOS e na liberação dos mediadores inflamatórios CCL2, IL-6, IL-1 β e TNF no sobrenadante de macrófagos em relação ao grupo LDLox. Em um modelo de fibrose pulmonar em ratos, a AM (10 mg/kg) reduziu a expressão de iNOS e NF- κ B e os níveis de TNF (ZAAFAN et al., 2019). Dessa forma, esses resultados sugerem que a AM possui um papel no controle dos eventos pró-inflamatórios desencadeados pela LDLox.

Outra hipótese de mecanismo por trás das ações da AM sobre as alterações induzidas pela LDLox, além da inibição de vias pró-inflamatórias, seria a ativação de vias anti-inflamatórias. Kubera e colaboradores (2000) mostraram que a administração de AM (10 mg/kg) em camundongos C57BL/6, por 4 semanas, aumentou a secreção da citocina anti-inflamatória IL-10. Além disso, alguns trabalhos mostram que o efeito anti-inflamatório da AM está relacionado à redução de estresse oxidativo. Kolla e colaboradores (2005) viram que o tratamento com AM (100 μ M por 24 horas ou 50 μ M por 48 horas) estava associado a um aumento da atividade da SOD em células PC12 de rato (KOLLA et al., 2005). O $O_2^{\bullet-}$ pode ser regulado pela atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), facilitando a conversão de $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e contribuindo no controle do estresse oxidativo celular. No presente trabalho, embora a expressão de NADPHox não tenha sido alterada no grupo incubado com LDLox e AM, a atividade da enzima parece ter sido reduzida, uma vez que os níveis de ROS foram menores neste grupo em relação ao grupo LDLox no estado basal.

7.3. Efeitos isolados da AM

Em doses terapêuticas, a AM geralmente produz hipotensão ortostática devido ao antagonismo de receptores α_1 -adrenérgicos e ao bloqueio do influxo de cálcio em células musculares lisas (VILA et al., 1999). Em um estudo que avaliou o efeito de ADT em aortas de rato, a AM atenuou a contração em anéis aórticos sem endotélio e o relaxamento provocado pela AM foi independente de endotélio (HUANG, 1996). Entretanto, no presente trabalho, o grupo incubado apenas com AM apresentou um aumento na resposta contrátil à Phe em relação ao grupo CT, resultado atribuído à redução da expressão das NOS e, conseqüentemente, dos níveis de NO em células endoteliais. Além disso, o delta da AUC com L-NAME dos grupos incubados apenas com AM foi menor em relação ao grupo CT, indicando menor biodisponibilidade de NO. Esses resultados estão em concordância com dados ainda em fase de publicação pelo nosso grupo que mostram que, com 30 minutos de tratamento, a AM (0,1 μ M) reduziu a produção de NO em células endoteliais. Alguns dados na literatura sugerem que o potencial efeito anti-inflamatório da AM esteja associado à redução de NO pela iNOS (VISMARI; PALERMO-NETO, 2012). Yaron e colaboradores (1999) viram que a AM (0,3 a 2 μ g/mL) reduziu o NO estimulado por LPS e citocinas em modelo de inflamação articular em células sinoviais humanas, mas não alterou a produção de NO em células saudáveis (YARON et al., 1999). Alguns autores viram que a AM pode mudar seu perfil de resposta com base na concentração ou dose utilizada (JOSHI et al., 1999).

Apesar da discreta alteração basal de NO, os níveis de NO após estímulo com ACh foram semelhantes aos do controle. Embora conflitante, este dado sugere que a redução da expressão das NOS constitutivas, induzida pela AM, parece não reduzir a atividade destas enzimas após 24 horas de incubação. Pelo contrário, para a manutenção dos níveis estimulados de NO diante da redução da expressão das NOS, estas enzimas deveriam encontrar-se mais ativas. No entanto, a análise do estresse oxidativo mostrou que os níveis de ROS também aumentaram após estímulo com ACh no grupo incubado com AM, sugerindo atividade enzimática em um estado desacoplado.

No entanto, a AM inibiu o pico de cálcio intracelular (visto no grupo CT após estímulo com ACh) e este resultado está em concordância com os dados da literatura que sugerem um efeito bloqueador de canais de cálcio pela AM (CARDOSO et al., 2022); (WU et al., 2012); (LAVOIE et al., 1990). A redução de cálcio nas células endoteliais deveria resultar em redução de NO após estímulo com ACh, mas no presente trabalho, tal resposta não foi observada. Dessa forma, os resultados de NO e ROS observados parecem ser resultantes de outra via conhecida para a produção de NO, a de fosforilação direta das NOS pela PI3K/AKT. A confirmação dessa hipótese poderia ser inferida pela análise da fosforilação dos sítios de ativação e inativação da eNOS e nNOS. Contudo, o presente trabalho não traz essa análise. Porém, resultados ainda em fase de

publicação pelo nosso grupo mostraram que a incubação com uma concentração maior de AM (1 μ M), em relação à utilizada no presente trabalho, e por um tempo menor (30 minutos), resultou em redução da produção de NO via redução da fosforilação de eNOS^{ser1177} (sitio de ativação) e aumento de nNOS^{ser852} (sitio de inativação).

A AM aumentou também os níveis basais de $O_2^{\bullet-}$ em relação ao controle. Tal aumento poderia ser explicado, pelo menos parcialmente, pela diminuição do NO basal, gerando o acúmulo de $O_2^{\bullet-}$. Além disso, a expressão de NADPHox também aumentou. Em contrapartida, Guan e colaboradores (2019) não viram alterações os níveis de ROS resultantes da incubação com AM (2,5 a 10 μ M) em células endoteliais microvasculares de camundongo (GUAN et al., 2019).

Outro dado interessante a respeito do tratamento apenas com a AM foi a modulação da expressão de receptores *scavenger*. A AM sozinha aumentou a expressão de receptores CD36 e SRA. Como a AM pode atuar como antagonista de receptores TLR4, a interação do fármaco com este receptor pode gerar um aumento compensatório na expressão dos outros receptores. Em contrapartida, a expressão de iNOS e os níveis dos mediadores inflamatórios em macrófagos terem sido inalterados se comparados ao controle. Obuchowicz e colaboradores (2006) mostraram que a AM inibiu a liberação de IL-1 β e TNF em cultura de micróglia de ratos (OBUCHOWICZ et al., 2006). Outros autores também mostraram que ADT são capazes de reduzir a liberação de IL-6, IL-1 β e TNF em monócitos estimulados com LPS (XIA, Z. et al., 1996).

8. Conclusão

A LDLox foi capaz de provocar uma hiporresponsividade vascular, causada pelo aumento da expressão de iNOS e consequente produção de NO. A LDLox provocou ainda disfunção endotelial, caracterizada pela redução da expressão das NOS constitutivas, diminuição da produção estimulada de NO e aumento do estresse oxidativo (via aumento da produção de ROS e da expressão de NADPHox). Além disso, na presença de LPC, houve aumento da $[Ca^{2+}]_i$ nas células endoteliais. A LDLox induziu, ainda, o aumento da expressão dos receptores CD36 e SRA em macrófagos, provocando captação de LDLox, aumento na expressão de iNOS e liberação de CCL2, IL-6, IL-1 β e TNF.

Na presença de LDLox, a AM reverteu a hiporresponsividade causada pela LDLox por meio da redução da expressão de iNOS e dos níveis basais de NO, sem restaurar a expressão das NOS constitutivas reduzidas pela LDLox. Além disso, a AM parece promover um estado com prevalência de respostas anti-inflamatórias, já que reduziu os níveis totais de ROS, a $[Ca^{2+}]_i$, a captação de LDLox (via redução de receptores SRA) e a liberação dos mediadores inflamatórios induzidos pela LDLox. Na ausência de LDLox, a AM induz um aumento na resposta vascular contrátil por meio da redução da expressão tanto das NOS constitutivas quanto da iNOS, com consequente redução de NO. Contudo, mesmo tendo aumentado a expressão de NADPHox, a AM sozinha não parece aumentar o estresse oxidativo de forma direta, nem estimula a liberação de CCL2, IL-6, IL-1 β e TNF.

Assim, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a AM foi capaz de prevenir as alterações pró-inflamatórias e oxidativas induzidas pela LDLox, reduzindo citocinas pró-inflamatórias e expressão de iNOS, o que contribui para um estado menos oxidativo. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer as vias envolvidas no mecanismo de ação deste fármaco.

Referências bibliográficas

- ACHAR, Eduardo et al. Amitriptyline attenuates interstitial inflammation and ameliorates the progression of renal fibrosis. **Kidney international**, Elsevier, v. 75, n. 6, p. 596–604, 2009.
- ALVES E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: CONCEITOS e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. [S.l.]: EPSJV, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010. v. 2. p. 215–253.
- ANRATHER, Josef et al. NF- κ B regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. **Journal of Biological Chemistry**, ASBMB, v. 281, n. 9, p. 5657–5667, 2006.
- ANTOSOVA, M et al. Physiology of nitric oxide in the respiratory system. **Physiological Research**, v. 66, 2017.
- ARTIM, Stephen C et al. Comparison of tyrosine kinase domain properties for the neurotrophin receptors TrkA and TrkB. **Biochemical Journal**, Portland Press, v. 477, n. 20, p. 4053–4070, 2020.
- ASHBURN, Ted T; THOR, Karl B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature reviews Drug discovery**, Nature Publishing Group, v. 3, n. 8, p. 673–683, 2004.
- AZUMI, Hiroshi et al. Superoxide generation in directional coronary atherectomy specimens of patients with angina pectoris: important role of NAD (P) H oxidase. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Am Heart Assoc, v. 22, n. 11, p. 1838–1844, 2002.
- BARNES, Peter J; KARIN, Michael. Nuclear factor- κ B—a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **New England journal of medicine**, Mass Medical Soc, v. 336, n. 15, p. 1066–1071, 1997.
- BEKKERING, Siroon et al. Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Am Heart Assoc, v. 34, n. 8, p. 1731–1738, 2014.
- BIANCHI, M; PANERAI, AE. Antidepressant drugs and experimental inflammation. **Pharmacological research**, Elsevier, v. 33, n. 4-5, p. 235–238, 1996.
- BONOMINI, Francesca et al. NF- κ B—A Key Factor in Atherogenesis and Atheroprotection. In: THROMBOSIS, Atherosclerosis and Atherothrombosis-New Insights and Experimental Protocols. [S.l.]: IntechOpen, 2015.
- BRUNO, Antonio et al. Inflammation-associated synaptic alterations as shared threads in depression and multiple sclerosis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, Frontiers, v. 14, p. 169, 2020.
- BUHAGIAR, Luana Mifsud et al. Safety Implications of Low-Dose Amitriptyline in Neuropathic Pain. **Pharmaceutical Frontiers**, Pharmaceutical Frontiers, v. 1, n. 1, 2019.

- CAI, Zhengwei; MCCASLIN, Patrick P. Amitriptyline, desipramine, cyproheptadine and carbamazepine, in concentrations used therapeutically, reduce kainate- and N-methyl-D-aspartate-induced intracellular Ca^{2+} levels in neuronal culture. **European journal of pharmacology**, Elsevier, v. 219, n. 1, p. 53–57, 1992.
- CAMARÉ, Caroline et al. Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. **Redox biology**, Elsevier, v. 12, p. 18–34, 2017.
- CAMPOS-MOTA, Gianne P et al. Role of ERK1/2 activation and nNOS uncoupling on endothelial dysfunction induced by lysophosphatidylcholine. **Atherosclerosis**, Elsevier, v. 258, p. 108–118, 2017.
- CAPETTINI, LSA et al. Decreased production of neuronal NOS-derived hydrogen peroxide contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis. **British journal of pharmacology**, Wiley Online Library, v. 164, n. 6, p. 1738–1748, 2011.
- CARDOSO, Fernanda C et al. Inhibition of N-type calcium ion channels by tricyclic antidepressants—experimental and theoretical justification for their use for neuropathic pain. **RSC Medicinal Chemistry**, Royal Society of Chemistry, 2022.
- CARVILLE, Serena F et al. EULAR evidence-based recommendations for the management of fibromyalgia syndrome. **Annals of the rheumatic diseases**, BMJ Publishing Group Ltd, v. 67, n. 4, p. 536–541, 2008.
- CHAUDHURI, Pinaki et al. Lysophosphatidylcholine inhibits endothelial cell migration by increasing intracellular calcium and activating calpain. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Am Heart Assoc, v. 23, n. 2, p. 218–223, 2003.
- CHUNG, BH et al. Preparative and quantitative isolation of plasma lipoproteins: rapid, single discontinuous density gradient ultracentrifugation in a vertical rotor. **Journal of lipid research**, Elsevier, v. 21, n. 3, p. 284–291, 1980.
- COLLES, Scott M; CHISOLM, Guy M. Lysophosphatidylcholine-induced cellular injury in cultured fibroblasts involves oxidative events. **Journal of Lipid Research**, ASBMB, v. 41, n. 8, p. 1188–1198, 2000.
- CORRÊA-CAMACHO, Camila R et al. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. **Arq Ciênc Saúde**, v. 14, n. 1, p. 41–48, 2007.
- COUCH, James R; GROUP, Amitriptyline Versus Placebo Study. Amitriptyline in the prophylactic treatment of migraine and chronic daily headache. **Headache: The Journal of Head and Face Pain**, Wiley Online Library, v. 51, n. 1, p. 33–51, 2011.
- CROME, Peter. Poisoning due to tricyclic antidepressant overdose. **Medical toxicology**, Springer, v. 1, n. 4, p. 261–285, 1986.
- DAVIGNON, Jean; GANZ, Peter. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**, Am Heart Assoc, v. 109, 23_suppl_1, p. iii–27, 2004.

- DAVIS, Mellar P. Amitriptyline and Depressions. **NeuroPsychopharmacotherapy**, Springer, p. 1–19, 2020.
- DETMERS, Patricia A et al. Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **The Journal of Immunology**, Am Assoc Immnol, v. 165, n. 6, p. 3430–3435, 2000.
- DEVINE, Kerri. Amitriptyline. **Practical Diabetes**, John Wiley & Sons, Ltd Chichester, UK, v. 33, n. 1, p. 34–35, 2016.
- EMC. AMITRIPTYLINE TABLETS BP 10mg. **The electronic medicines compendium (EMC). Accord-UK Ltd**, 2021. Disponível em: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/5698/smpc>. Acesso em: 20 abr. 2022.
- FARGHALY, Hanan Sayed Mohamed et al. Comparative evaluation of the effect of tricyclic antidepressants on inducible nitric oxide synthase expression in neuropathic pain model. **Nitric oxide**, Elsevier, v. 27, n. 2, p. 88–94, 2012.
- FEARON, Ian M. OxLDL enhances L-type Ca²⁺ currents via lysophosphatidylcholine-induced mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production. **Cardiovascular research**, Elsevier Science, v. 69, n. 4, p. 855–864, 2006.
- FRIED, Jerrold et al. Flow cytofluorometric 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. 172–181, 1976.
- FURCHGOTT, Robert F et al. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **nature**, Nature Publishing Group, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 1980.
- GELOSA, Paolo et al. Drug repurposing in cardiovascular diseases: Opportunity or hopeless dream? **Biochemical Pharmacology**, Elsevier, v. 177, p. 113894, 2020.
- GLIOZZI, Micaela et al. Modulation of nitric oxide synthases by oxidized LDLs: role in vascular inflammation and atherosclerosis development. **International journal of molecular sciences**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 20, n. 13, p. 3294, 2019.
- GRADINARU, Daniela et al. Oxidized LDL and NO synthesis—Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. **Mechanisms of ageing and development**, Elsevier, v. 151, p. 101–113, 2015.
- GREENSPAN, Phillip et al. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. **The Journal of cell biology**, v. 100, n. 3, p. 965–973, 1985.
- GUAN, Yinglu et al. Tricyclic antidepressant amitriptyline inhibits autophagic flux and prevents tube formation in vascular endothelial cells. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, Wiley Online Library, v. 124, n. 4, p. 370–384, 2019.

GUPTA, Suneel K et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of OROS® and immediate-release amitriptyline. **British journal of clinical pharmacology**, Wiley Online Library, v. 48, n. 1, p. 71–78, 1999.

GURGEL, José Alves et al. Amitriptyline, clomipramine, and maprotiline attenuate the inflammatory response by inhibiting neutrophil migration and mast cell degranulation. **Brazilian Journal of Psychiatry**, SciELO Brasil, v. 35, p. 387–392, 2013.

HIEMKE, C et al. Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology: update 2017. **Pharmacopsychiatry**, © Georg Thieme Verlag KG, v. 51, n. 01/02, p. 9–62, 2018.

HUANG, Yu. Inhibitory effect of noradrenaline uptake inhibitors on contractions of rat aortic smooth muscle. **British journal of pharmacology**, Wiley Online Library, v. 117, n. 3, p. 533–539, 1996.

HUTCHINSON, Mark R et al. Evidence that tricyclic small molecules may possess toll-like receptor and myeloid differentiation protein 2 activity. **Neuroscience**, Elsevier, v. 168, n. 2, p. 551–563, 2010.

JACKSON, Jeffrey L et al. Tricyclic antidepressants and headaches: systematic review and meta-analysis. **Bmj**, British Medical Journal Publishing Group, v. 341, 2010.

JANG, Sung-Wuk et al. Amitriptyline is a TrkA and TrkB receptor agonist that promotes TrkA/TrkB heterodimerization and has potent neurotrophic activity. **Chemistry & biology**, Elsevier, v. 16, n. 6, p. 644–656, 2009.

JARADA, Tamer N et al. A review of computational drug repositioning: strategies, approaches, opportunities, challenges, and directions. **Journal of cheminformatics**, BioMed Central, v. 12, n. 1, p. 1–23, 2020.

JI, Eunhye; LEE, Sahmin. Antibody-based therapeutics for atherosclerosis and cardiovascular diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 22, n. 11, p. 5770, 2021.

JIN, Richard C; LOSCALZO, Joseph. Vascular nitric oxide: formation and function. **Journal of blood medicine**, Dove Press, v. 1, p. 147, 2010.

JOHNSON III, Bobby L et al. Amitriptyline usage exacerbates the immune suppression following burn injury. **Shock (Augusta, Ga.)**, NIH Public Access, v. 46, n. 5, p. 541, 2016.

JOSHI, Preeti G et al. High concentrations of tricyclic antidepressants increase intracellular Ca²⁺ in cultured neural cells. **Neurochemical research**, Springer, v. 24, n. 3, p. 391–398, 1999.

JUNG, Hye-Jin et al. Effects of chlorogenic acid on intracellular calcium regulation in lysophosphatidylcholine-treated endothelial cells. **BMB reports**, Korean Society for Biochemistry & Molecular Biology, v. 50, n. 6, p. 323, 2017.

KATUSIC, Zvonimir S. Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, American Physiological Society Bethesda, MD, v. 281, n. 3, h981–h986, 2001.

KERR, GW et al. Tricyclic antidepressant overdose: a review. **Emergency Medicine Journal**, British Association for Accident e Emergency Medicine, v. 18, n. 4, p. 236–241, 2001.

KHATANA, Chainika et al. Mechanistic insights into the oxidized low-density lipoprotein-induced atherosclerosis. **Oxidative medicine and cellular longevity**, Hindawi, v. 2020, 2020.

KIBBE, Melina et al. Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. **Cardiovascular research**, Elsevier Science, v. 43, n. 3, p. 650–657, 1999.

KOLLA, Nathan et al. Amitriptyline and fluoxetine protect PC12 cells from cell death induced by hydrogen peroxide. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, Journal of Psychiatry e Neuroscience, v. 30, n. 3, p. 196–201, 2005.

LAMBDEN, Simon. Bench to bedside review: therapeutic modulation of nitric oxide in sepsis—an update. **Intensive Care Medicine Experimental**, SpringerOpen, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2019.

LARA-GUZMÁN, Oscar J et al. Oxidized LDL triggers changes in oxidative stress and inflammatory biomarkers in human macrophages. **Redox Biology**, Elsevier, v. 15, p. 1–11, 2018.

LAVOIE, P-A et al. Tricyclic antidepressants inhibit voltage-dependent calcium channels and $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchange in rat brain cortex synaptosomes. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, NRC Research Press Ottawa, Canada, v. 68, n. 11, p. 1414–1418, 1990.

LAWSON, Kim. A brief review of the pharmacology of amitriptyline and clinical outcomes in treating fibromyalgia. **Biomedicines**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 5, n. 2, p. 24, 2017.

LEIVA, E et al. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. **Hypercholesterolemia**, IntechOpen London, p. 55–78, 2015.

LEVINE, Arlene Bradley et al. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. **Cardiology**, Karger Publishers, v. 122, n. 1, p. 55–68, 2012.

LEVITAN, Irena et al. Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. **Antioxidants & redox signaling**, Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, v. 13, n. 1, p. 39–75, 2010.

LI, Yvonne Y; JONES, Steven JM. Drug repositioning for personalized medicine. **Genome medicine**, Springer, v. 4, n. 3, p. 1–14, 2012.

LIBBY, Peter et al. Atherosclerosis. **Nature Reviews Disease Primers**, Nature Publishing Group, v. 5, n. 56, p. 1–18, 2019.

- LOMBARDINO, Joseph G; LOWE, John A. The role of the medicinal chemist in drug discovery—then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, Nature Publishing Group, v. 3, n. 10, p. 853–862, 2004.
- LU, Zhongyang et al. Amitriptyline inhibits nonalcoholic steatohepatitis and atherosclerosis induced by high-fat diet and LPS through modulation of sphingolipid metabolism. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, American Physiological Society Bethesda, MD, v. 318, n. 2, e131–e144, 2020.
- LUSIS, A. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, p. 233–241, 2000.
- MADAMANCHI, Nageswara R et al. Oxidative stress and vascular disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Am Heart Assoc, v. 25, n. 1, p. 29–38, 2005.
- MÄKINEN, Petri I et al. Silencing of either SR-A or CD36 reduces atherosclerosis in hyperlipidaemic mice and reveals reciprocal upregulation of these receptors. **Cardiovascular research**, Oxford University Press, v. 88, n. 3, p. 530–538, 2010.
- MAZIÈRE, Cécile et al. Oxidized low-density lipoprotein elicits an intracellular calcium rise and increases the binding activity of the transcription factor NFAT. **Free Radical Biology and Medicine**, Elsevier, v. 38, n. 4, p. 472–480, 2005.
- MCCLURE, Elliot W; DANIELS, R Nathan. Classics in Chemical Neuroscience: Amitriptyline. **ACS Chemical Neuroscience**, ACS Publications, v. 12, n. 3, p. 354–362, 2021.
- MEDZHITOV, Ruslan. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, Nature Publishing Group, v. 1, n. 2, p. 135–145, 2001.
- MONCADA, Salvador et al. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochemical pharmacology**, Elsevier, v. 37, n. 13, p. 2495–2501, 1988.
- MOORE, RA et al. Amitriptyline for neuropathic pain in adults.(CD008242). **Cochrane Database Syst Rev**, v. 7, 2015.
- NAVIA-PELAEZ, Juliana Maria et al. nNOS uncoupling by oxidized LDL: Implications in atherosclerosis. **Free radical biology & medicine**, v. 113, p. 335–346, 2017.
- NELSON, J Craig; SPYKER, Daniel A. Morbidity and mortality associated with medications used in the treatment of depression: an analysis of cases reported to US poison control centers, 2000–2014. **American journal of psychiatry**, Am Psychiatric Assoc, v. 174, n. 5, p. 438–450, 2017.
- OBUCHOWICZ, Ewa et al. Amitriptyline and nortriptyline inhibit interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α release by rat mixed glial and microglial cell cultures. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, Cambridge University Press Cambridge, UK, v. 9, n. 1, p. 27–35, 2006.

- ONALI, Pierluigi et al. Direct agonist activity of tricyclic antidepressants at distinct opioid receptor subtypes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, ASPET, v. 332, n. 1, p. 255–265, 2010.
- ORRENIUS, Sten et al. Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. **Nature reviews Molecular cell biology**, Nature Publishing Group, v. 4, n. 7, p. 552–565, 2003.
- OSTERLOH, Ian H. The discovery and development of Viagra®(sildenafil citrate). In: **SILDENAFIL**. [S.l.]: Springer, 2004. p. 1–13.
- PADHY, BM; GUPTA, YK et al. Drug repositioning: re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. **Journal of postgraduate medicine**, Medknow Publications, v. 57, n. 2, p. 153, 2011.
- PALMER, Richard MJ et al. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 327, n. 6122, p. 524–526, 1987.
- PUSHPAKOM, Sudeep et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature reviews Drug discovery**, Nature Publishing Group, v. 18, n. 1, p. 41–58, 2019.
- QIU, Wenhui et al. Suppressive immunoregulatory effects of three antidepressants via inhibition of the nuclear factor- κ B activation assessed using primary macrophages of carp (*Cyprinus carpio*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, Elsevier, v. 322, p. 1–8, 2017.
- RAHAMAN, S Ohidar et al. A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. **Cell metabolism**, Elsevier, v. 4, n. 3, p. 211–221, 2006.
- RASTOGI, Radhika et al. NOX activation by subunit interaction and underlying mechanisms in disease. **Frontiers in cellular neuroscience**, Frontiers, v. 10, p. 301, 2017.
- RHOADS, Jillian P; MAJOR, Amy S. How oxidized low-density lipoprotein activates inflammatory responses. **Critical Reviews™ in Immunology**, Begel House Inc., v. 38, n. 4, 2018.
- RIEGER, Aja M et al. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 50, e2597, 2011.
- RITCHIE, Hannah; ROSER, Max. Causes of Death. **Our World in Data**, 2018. Disponível em: <https://ourworldindata.org/causes-of-death>. Acesso em: 21 mar. 2022.
- ROSSOL, Manuela et al. Extracellular Ca²⁺ is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors. **Nature communications**, Nature Publishing Group, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2012.
- ROTH, Gregory A et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 study. **Journal of the American College of Cardiology**, American College of Cardiology Foundation Washington DC, v. 76, n. 25, p. 2982–3021, 2020.
- RUDRAPAL, Mithun et al. Drug repurposing (DR): an emerging approach in drug discovery. **Drug Repurposing Hypothesis Mol. Asp. Ther. Appl**, 2020.

- RUMIN, Judith et al. The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. **Biotechnology for biofuels**, BioMed Central, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2015.
- SCHEUERMANN, Karina et al. Amitriptyline downregulates chronic inflammatory response to biomaterial in mice. **Inflammation**, Springer, v. 44, n. 2, p. 580–591, 2021.
- SCHIFFRIN, Ernesto L. Oxidative stress, nitric oxide synthase, and superoxide dismutase: a matter of imbalance underlies endothelial dysfunction in the human coronary circulation. **Hypertension**, Am Heart Assoc, v. 51, n. 1, p. 31–32, 2008.
- SEABRA, Vítor et al. Taurine blunts LPS-induced increases in intracellular calcium and TNF- α production by Kupffer cells. **Journal of leukocyte biology**, Wiley Online Library, v. 64, n. 5, p. 615–621, 1998.
- SILVA, Gabriela Maria da et al. Nitric Oxide as a Central Molecule in Hypertension: Focus on the Vasorelaxant Activity of New Nitric Oxide Donors. **Biology**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 10, n. 10, p. 1041, 2021.
- SINDRUP, Søren H et al. Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, Wiley Online Library, v. 96, n. 6, p. 399–409, 2005.
- SIQUEIRA, Antonela FA et al. LDL: da síndrome metabólica à instabilização da placa aterosclerótica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, SciELO Brasil, v. 50, p. 334–343, 2006.
- SOEHNLEIN, Oliver; LIBBY, Peter. Targeting inflammation in atherosclerosis—from experimental insights to the clinic. **Nature Reviews Drug Discovery**, Nature Publishing Group, v. 20, n. 8, p. 589–610, 2021.
- STEPP, David W et al. Native LDL and minimally oxidized LDL differentially regulate superoxide anion in vascular endothelium in situ. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, American Physiological Society Bethesda, MD, v. 283, n. 2, h750–h759, 2002.
- STRUNK, Volker et al. Selective iNOS inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium-dependent vasodilation. **Anesthesia & Analgesia**, LWW, v. 92, n. 3, p. 681–687, 2001.
- SZAŁACH, Łukasz P et al. The influence of antidepressants on the immune system. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, Springer, v. 67, n. 3, p. 143–151, 2019.
- TALEVI, Alan; BELLERA, Carolina L. **Challenges and opportunities with drug repurposing: finding strategies to find alternative uses of therapeutics**. v. 15. [S.l.]: Taylor & Francis, 2020. p. 397–401.
- TEIXEIRA, Bruno Costa et al. Inflammatory markers, endothelial function and cardiovascular risk. **Jornal Vascular Brasileiro**, SciELO Brasil, v. 13, p. 108–115, 2014.
- THOUR, Amit; MARWAHA, Raman. Amitriptyline, 2019.

- TOTH, PP. Subclinical atherosclerosis: what it is, what it means and what we can do about it. **International journal of clinical practice**, Wiley Online Library, v. 62, n. 8, p. 1246–1254, 2008.
- TOUSOULIS, Dimitris et al. The role of nitric oxide on endothelial function. **Current vascular pharmacology**, Bentham Science Publishers, v. 10, n. 1, p. 4–18, 2012.
- ULRICH, S et al. Serum levels of amitriptyline and therapeutic effect in non-delusional moderately to severely depressed in-patients: a therapeutic window relationship. **Pharmacopsychiatry**, © Georg Thieme Verlag Stuttgart· New York, v. 34, n. 01, p. 33–40, 2001.
- VANHOUTTE, Paul M. Endothelial dysfunction the first step toward coronary arteriosclerosis. **Circulation Journal**, The Japanese Circulation Society, v. 73, n. 4, p. 595–601, 2009.
- VERMES, István et al. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. **Journal of immunological methods**, Elsevier, v. 184, n. 1, p. 39–51, 1995.
- VILA, José M et al. Relaxant effects of antidepressants on human isolated mesenteric arteries. **British journal of clinical pharmacology**, Wiley Online Library, v. 48, n. 2, p. 223–229, 1999.
- VISMARI, L; ALVES, GJ et al. Amitriptyline and acute inflammation: a study using intravital microscopy and the carrageenan-induced paw edema model. **Pharmacology**, v. 86, n. 4, p. 231–239, 2010.
- VISMARI, L; PALERMO-NETO, J. A possible role to nitric oxide in the anti-inflammatory effects of amitriptyline. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 34, n. 4, p. 578–585, 2012.
- WANG, Jing et al. oxLDL-mediated cellular senescence is associated with increased NADPH oxidase p47phox recruitment to caveolae. **Bioscience Reports**, Portland Press, v. 38, n. 3, 2018.
- WU, Wenhui et al. Amitriptyline modulates calcium currents and intracellular calcium concentration in mouse trigeminal ganglion neurons. **Neuroscience Letters**, Elsevier, v. 506, n. 2, p. 307–311, 2012.
- XAVIER, Hermes Toros et al. Effects of oxidized LDL on in vitro proliferation and spontaneous motility of human coronary artery endothelial cells. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, SciELO Brasil, v. 83, n. 6, p. 488–492, 2004.
- XIA, Brent T et al. Amitriptyline treatment mitigates sepsis-induced tumor necrosis factor expression and coagulopathy. **Shock**, LWW, v. 51, n. 3, p. 356–363, 2019.
- XIA, Zhenlei et al. Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 β and TNF- α release in human blood monocytes and IL-2 and interferon- γ in T cells. **Immunopharmacology**, Elsevier, v. 34, n. 1, p. 27–37, 1996.
- YARON, Ilana et al. Fluoxetine and amitriptyline inhibit nitric oxide, prostaglandin E₂, and hyaluronic acid production in human synovial cells and synovial tissue cultures. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, Wiley Online Library, v. 42, n. 12, p. 2561–2568, 1999.

ZAAFAN, Mai A et al. Amitriptyline attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis: modulation of the expression of NF- κ B, iNOS, and Nrf2. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, Springer, v. 392, n. 3, p. 279–286, 2019.

ZHAI, You et al. Bioequivalence Study of Amitriptyline Hydrochloride Tablets in Healthy Chinese Volunteers Under Fasting and Fed Conditions. **Drug Design, Development and Therapy**, Dove Press, v. 14, p. 3131, 2020.

ZHAO, Ruozhi; MA, Xiuli et al. Involvement of NADPH oxidase in oxidized LDL-induced upregulation of heat shock factor-1 and plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, American Physiological Society, v. 297, n. 1, e104–e111, 2009.

ZHAO, Tian X; MALLAT, Ziad. Targeting the immune system in atherosclerosis: JACC state-of-the-art review. **Journal of the American College of Cardiology**, American College of Cardiology Foundation Washington, DC, v. 73, n. 13, p. 1691–1706, 2019.

ZIEGLER, Vincent E et al. Amitriptyline plasma levels and therapeutic response. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, Wiley Online Library, v. 19, n. 6, p. 795–801, 1976.