



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Farmacologia

**ATIVAÇÃO DA VIA nNOS/H₂O₂ PELA
ATORVASTATINA: IMPLICAÇÕES NA
DISFUNÇÃO ENDOTELIAL INDUZIDA POR
LISOFOSFATIDILCOLINA**

Gianne Paul Campos Mota

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini

Belo Horizonte
2015

Gianne Paul Campos Mota

**ATIVAÇÃO DA VIA nNOS/H₂O₂ PELA
ATORVASTATINA: IMPLICAÇÕES NA
DISFUNÇÃO ENDOTELIAL INDUZIDA POR
LISOFOFATIDILCOLINA**

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

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini

**Belo Horizonte
2015**

Agradecimentos

Ao meu orientador, Luciano Capettini, que não mediu esforços para ajudar na concretização deste trabalho. Por conduzir, ensinar sobre pesquisa, pelos momentos difíceis que passamos enquanto equipe, pelo brilho no olhar e a paixão pelo trabalho, pela paciência, por gerenciar momentos de crise de modo único, pela generosidade em compartilhar desde um reagente até o saber. Tudo foi motivo de grande aprendizado e agradeco por ter vivenciado e aprendido com ele neste período.

A minha amiga e colega de pesquisa, Ju, por toda ajuda, apoio, momentos compartilhados de trabalho e amizade, pelos ensinamentos, pela força e doçura - tudo ao mesmo tempo! Foi uma dádiva tê-la como companheira de trabalho e amizade, teria sido imensamente mais difícil este processo sem a ajuda dela, pois juntas temos aprendido que "*Siempre que llovió paró!*"

Aos companheiros de trabalho do Laboratório de Biologia Vascular, Edenil e as alunas Jéssica e Cyntia, colegas mais que especiais, colaboradores na jornada e amigos sempre presentes que fazem cada dia de trabalho único e alegre!

Ao pessoal dos laboratórios de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular todo o apoio, momentos que me fizeram aprender muito com a experiência trocada por cada um, pela colaboração da professora Virgínia Lemos e de todos os colegas em especial à Rosária, Thiago, Dani e Josi. À Daniela, do laboratório de Citometria de Fluxo, pela colaboração e apoio nestes experimentos.

Aos professores que compõem esta Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia, que compartilham o saber conosco em cada disciplina ofertada, aos membros da Secretaria da pós, Nilda, Cintya e Rodner, sempre tão atenciosos e solícitos.

Aos membros da banca, professores do departamento de Farmacologia Daniella Bonaventura e Stéfany Cau, que aceitaram e dispuseram seu tempo para ler e fazer contribuições para este trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

Aos que me acompanharam ao longo do caminho, em especial à minha família, que mesmo distante sempre esteve me apoiando e dando suporte nas horas que precisei. Aos meus sogros, em especial minha sogra por ser uma grande incentivadora! Aos meus tios Hilda e Dorvil, por um suporte indescritível e tamanha torcida!

Vó, minha querida incentivadora, desde os primeiros passos! Mãe, maior exemplo de força e fé. Pai pelo carinho, meus irmãos Luciana e Caio, por todo apoio.

Ao meu esposo pelo incentivo, força e fé no meu trabalho. Por estar ao meu lado sempre. Por acreditar até quando eu duvidei. Pelo amor e carinho depositado em mim. Por sonhar os meus sonhos e compartilhar a jornada ao meu lado.

Mas principalmente agradeço a Deus, autor e consumidor da minha fé. Ver todo o universo microscópico e bioquímico da maquinaria humana tornou ainda mais real minha fé e gratidão ao Criador, como afirmou Isaac Newton " *Este mais belo Sistema do Sol, Planetas e Cometas poderia apenas proceder do conselho e domínio de um Ser inteligente e poderoso*".

Agradeço imensamente ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia pela oportunidade de realizar este trabalho, bem como às Agências de fomento: Capes, Fapemig e CNPq.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1 Introdução.....	1
2 Revisão da Literatura.....	4
2.1 O endotélio.....	5
2.1.1 NOS: regulação e função.....	6
2.1.2 Disfunção endotelial: o primeiro passo para a aterosclerose.....	9
2.2 Lisofosfatidilcolina.....	12
2.3 Estatinas.....	14
2.3.1 Efeitos pleiotrópicos.....	14
3 Justificativa.....	17
4 Objetivos.....	19
5 Metodologia.....	21
5.1 Modelo animal.....	22
5.2 Reatividade Vascular.....	22
5.2.1 Avaliação da integridade endotelial.....	22
5.2.2 Participação da LPC sobre a resposta vascular.....	22
5.2.3 Avaliação do efeito modulatório da atorvastatina sobre a resposta vascular.....	23
5.2.4 Avaliação dos mecanismos envolvidos no efeito modulatório da LPC e da atorvastatina sobre a função vascular.....	24
5.3 Citometria de fluxo.....	26
5.4 Western blot.....	26
5.5 Análises estatísticas e expressão dos resultados.....	28
6 Resultados.....	29
6.1 Reatividade Vascular.....	31
6.1.1 Efeito do tratamento com LPC sobre a função vascular.....	32

6.1.2 Efeito da incubação aguda com atorvastatina sobre a resposta vascular.....	37
6.1.3 Efeito do tratamento com atorvastatina sobre a disfunção endotelial causada pela LPC.....	42
6.2 Medidas de NO, H ₂ O ₂ e superóxido.....	45
6.2.1 Produção de NO.....	45
6.2.2 Produção de H ₂ O ₂	49
6.2.3 Produção de superóxido.....	52
6.3 Western blot.....	54
7 Discussão.....	56
7.1 A LPC como causador de disfunção endotelial.....	56
7.2 Efeitos da atorvastatina sobre a função endotelial.....	63
8 Conclusão.....	67
9 Referências Bibliográficas.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µg/mL	Micrograma por mililitro
µM	Micro molar
ACh	Acetilcolina
ATOR	Atorvastatina
AKT	Proteína cinase B (PKB)
AMPK	Proteína cinase ativada por AMP
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
°C	Grau centígrado
CAPI	Centro de Aquisição e processamento de imagens
CaMKII	Calmodulina cinase
DAPI	4,6-diamidina-2-fenilindole, dihydrochloride
DAN	2,3-diaminonaftaleno
DAF-FM	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluoresceína
DCF	2',7'-dichlorofluoresceína
DCFH	2,7-dichlorodihydrofluorescein
DHE	Dihydroethidium dihydroetidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EA.hy926	Células endoteliais da veia umbilical humana
eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
ERK1/2	Cinase regulada por sinal extracelular
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
cGMP	monofosfato cilico de guanosina
HDL	High density lipoprotein - proteína de alta densidade
HUVEC	Células endoteliais umbilicais humanas

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HCL	Ácido Clorídrico
h	Hora(s)
ICAM	Molécula-1 de adesão intercelular
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLox	LDL oxidada
LPC	Lisofosfatidilcolina
mg	Miligrama
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-kB	Fator de transcrição nuclear–kappa B
nm	Nanômetro
NOS	Óxido nítrico sintase
NO	Óxido nítrico
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NaOH	Hidróxido de sódio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH [·]	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCAM	Molécula de adessao celular
PKA	Proteína cinase A
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Rpm	Rotações por minuto
SOD	Superóxido dismutase
SDS	sodium dodecil (lauril) sulfato
THP-1	Linhagem celular monocítica humana
U/mL	Unidades por mililitro
VCAM-1	Molécula-1 de adesão vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática ilustrando a formação de NO e L-citrulina a partir de L-arginina e O ₂	07
Figura 2: Representação esquemática demonstrando a formação de uma partícula densa de LDL facilitada pela fosfolipase A ₂ (sPLA ₂) a partir do LDL nativo.....	12
Figura 3: Esquema demonstrando os tratamentos e análises que serão desenvolvidos neste trabalho.....	20
Figura 4: Figura 4: Figura esquemática da metodologia empregada no experimento de reatividade vascular demonstrando tempo de exposição do vaso à LPC, bem como às drogas L-NAME, TRIM, Catalase, L-arginina.....	25
Figura 5: A: Figura esquemática da metodologia empregada no experimento de reatividade vascular demonstrando tempo de exposição do vaso à atorvastatina com ou sem LPC, e às drogas L-NAME, TRIM, Catalase.....	25
Figura 6: Figura esquemática da metodologia empregada no experimento de reatividade vascular demonstrando tempo de exposição do vaso à atorvastatina.....	25
Figura 7: A: Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aorta de camundongo com endotélio funcional no controle e presença de LPC 10 µM, 30 µM, LPC 50 µM. B: Resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina no controle, LPC 10µM, 30 µM, 50 µM.....	32
Figura 8. A: Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aorta de camundongo na presença e ausência de endotélio; LPC 10µM. B: Resposta contrátil induzida por fenilefrina na presença e ausência de endotélio e LPC.....	33
Figura 9 A: Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aorta de camundongo com endotélio funcional no controle e presença de LPC 10 µM, LPC + L-NAME, L-NAME. B: Resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina no controle, LPC 10µM e L-NAME.....	34
Figura 10: A: Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aorta de camundongo com endotélio funcional no controle e presença de LPC 10 µM, LPC + L-TRIM, TRIM. B: LPC+ Catalase, Catalase. C: Resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina no controle, LPC 10µM, LPC + TRIM, TRIM. D: LPC+ Catalase, Catalase.....	35
Figura 11: A: Resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina em aorta de camundongo com endotélio funcional no controle e presença de LPC, LPC + L-arginina, L-arginina. B: Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina sob as mesmas condições.....	36
Figura 12: Esquema contendo o sumário dos resultados obtidos na primeira parte dos experimentos.....	36
Figura 13: Resposta vasorrelaxante induzida por acetilcolina em aorta de camundongo contendo endotélio funcional na presença de atorvastatina 1 ou 10µM ou controle.....	37

Figura 14: Resposta contrátil induzida por fenilefrina em aorta de camundongo contendo endotélio funcional no controle e na presença de atorvastatina 1µM e 10.....	38
Figura 15: Resposta contrátil induzida por fenilefrina em aorta de camundongo sem endotélio funcional no controle e presença de atorvastatina 1 µM e 10 µM.....	38
Figura 16: Resposta contrátil induzida por fenilefrina em aorta de camundongo com endotélio funcional no controle e presença de A: atorvastatina 1µM, L-NAME e ator + L-NAME. B: ator 10µM. L-NAME e ator 1µM + L-NAME.....	39
Figura 17: Resposta contrátil induzida por fenilefrina em aorta de camundongo com endotélio funcional no controle e presença de A: ator 1µM. TRIM e ator 1µM + TRIM. B: ator 10µM. TRIM e atorvastatina 1µM + TRIM.....	40
Figura 18: Resposta contrátil induzida por fenilefrina em aorta de camundongo contendo endotélio funcional no controle e presença de A: ator 1. Catalase e ator 1 + catalase. B: ator, catalase e ator + catalase.....	41
Figura 19: Esquema contendo o sumário dos resultados obtidos na terceira parte dos experimentos.....	41
Figura 20: Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aorta de camundongo com endotélio funcional no controle e presença de LPC, A: LPC + ator 1µM, B: LPC + ator 10.....	42
Figura 21: Resposta contrátil induzida por fenilefrina em aorta de camundongo contendo endotélio funcional no controle, presença de LPC e LPC + atorvastatina 1µM.....	43
Figura 22: Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aorta de camundongo com endotélio funcional na presença de LPC, LPC + ator 1µM, LPC + L-NAME + ator 1µM.....	43
Figura 23: Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aorta de camundongo com endotélio funcional na presença de LPC, LPC + ator 1µM. A: LPC + TRIM + ator 1µM. B: LPC + Catalase + ator 1µM.....	44
Figura 24: Esquema contendo o sumário dos resultados obtidos na segunda parte dos experimentos de reatividade vascular.....	44
Figura 25: Resposta de citometria de fluxo demonstrando produção de óxido nítrico por células endoteliais no basal, basal com LPC, tratamento com Ach com e sem inibidores, e todos na presença de LPC.....	46
Figura 26: Resposta dos experimentos de citometria de fluxo demonstrando produção de óxido nítrico por células endoteliais no Basal, tratadas com atorvastatina 1µM, na presença de acetilcolina no controle e com inibidores, na ausência e presença de LPC.....	47
Figura 27: Resposta dos experimentos de citometria de fluxo demonstrando produção de óxido nítrico por células endoteliais no Basal, tratadas com atorvastatina 10µM, na presença de acetilcolina no Controle e com inibidores, na ausência e presença de LPC.....	47
Figura 28: Esquema contendo o sumário dos resultados obtidos na primeira parte dos experimentos de citometria de fluxo.....	49

Figura 29: Resposta de citometria de fluxo demonstrando produção de H ₂ O ₂ por células endoteliais no controle e tratadas com LPC, na presença e ausência dos inibidores e catalase.....	49
Figura 30: Resposta de citometria de fluxo demonstrando produção de H ₂ O ₂ por células endoteliais no controle e tratadas com LPC. Tratamento com atorvastatina 1µM na presença e ausência de LPC também pode ser observado, bem como na presença dos inibidores L-NAME, TRIM e Catalase.....	50
Figura 31: Resposta de citometria de fluxo demonstrando produção de H ₂ O ₂ por células endoteliais no controle e tratadas com LPC. Tratamento com atorvastatina 10µM na presença e ausência de LPC também pode ser observado, bem como com os inibidores L-NAME, TRIM e Catalase.....	50
Figura 32: Esquema contendo o sumário dos resultados obtidos na segunda parte dos experimentos de citometria de fluxo.....	51
Figura 33: Resposta de citometria de fluxo demonstrando produção de radicais superóxido por células endoteliais no controle e tratadas com LPC. Tratamento com atorvastatina 1µM na presença e ausência de LPC.....	52
Figura 34: Resposta de citometria de fluxo demonstrando produção de radicais superóxido por células endoteliais no controle e tratadas com LPC. Tratamento com atorvastatina 10µM na presença e ausência de LPC.....	53
Figura 35: Esquema contendo o sumário dos resultados obtidos na terceira parte dos experimentos de citometria de fluxo.....	53
Figura 36: Expressão proteica da nNOS fosforilada em Ser852 por células endoteliais EA.hy926 no controle e tratadas com LPC 10µM na presença e ausência de atorvastatina 1 µM e 10 µM. Gráfico representativo da expressão de nNOS fosforilada normalizada pelo conteúdo de nNOS total.....	54
Figura 37: Expressão proteica da nNOS por células endoteliais EA.hy926 no controle e tratadas com LPC 10µM na presença e ausência de atorvastatina 1 µM e 10 µM. Gráfico representativo da expressão de nNOS normalizada pelo conteúdo de GAPDH.....	55
Figura 38: Esquema contendo o sumário dos resultados obtidos com experimentos de western blot.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela demonstrando a divisão entre as técnicas experimentais empregadas e o que foi desenvolvido através de cada técnica.....	30
Tabela 2: Tabela demonstrando os valores de Emax dos resultados dos experimentos de relaxamento vascular.....	31
Tabela 3: Tabela demonstrando os valores de Emax dos resultados dos experimentos de contração vascular.....	31

RESUMO

A aterosclerose é uma doença crônica, iniciada com uma resposta inflamatória ao componente Lisofosfatidilcolina (LPC) presente na LDL oxidada (LDLox), sendo este o fator chave para geração de uma resposta inflamatória e desenvolvimento da disfunção endotelial no início e durante o desenvolvimento da doença. É reconhecido o papel das óxido nítrico sintases (NOS) na manutenção da homeostase vascular. Contudo, a participação da isoforma neuronal da NOS (nNOS) na disfunção endotelial relacionada à dislipidemia não é conhecido. Não se conhece também como a LPC presente na LDLox afeta a expressão e atividade da nNOS e nem as consequências diretas de sua modulação nas células endoteliais ativadas. Paralelo a isso, alguns trabalhos recentes na literatura sugerem efeitos benéficos das estatinas, inibidores da HMG-CoA redutase, sobre o sistema cardiovascular, independentes da redução dos níveis de colesterol. Há indícios de que algumas estatinas modulem positivamente a via das NOS, especificamente a nNOS. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a contribuição da nNOS na disfunção endotelial induzida pela LPC e o seu papel na proteção mediada pela atorvastatina em modelo de órgão isolados e em cultura de células endoteliais. A avaliação das NOS foi realizada em experimentos de reatividade vascular. A medida dos subprodutos das NOS (NO e H₂O₂) em células endoteliais foi medida por citometria de fluxo. O inibidor seletivo da nNOS, TRIM, foi utilizado para avaliar a participação dessa isoforma na disfunção endotelial induzida pela LPC e sua participação nos efeitos mediados pela atorvastatina. O presente trabalho mostrou pela primeira vez que o tratamento de forma aguda com LPC foi capaz de promover disfunção endotelial e que o tratamento com atorvastatina foi capaz de prevenir a disfunção causada pela LPC, através de ativação das NOS. Estas respostas foram também verificadas por citometria de fluxo, onde observamos aumento na produção de NO e H₂O₂, através do tratamento com atorvastatina e uma redução destes produtos com uso de LPC. Além disso, mostramos uma alteração dessas respostas quando a nNOS foi inibida, indicando que o comprometimento da nNOS está intimamente associado ao processo de disfunção endotelial, e que a atorvastatina apresenta efeito protetor endotelial por modular positivamente a via nNOS/H₂O₂ e impedir a resposta disfuncional mediada pela LPC.

ABSTRACT

Atherosclerosis is a chronic disease related to an inflammatory response caused by the increase of Lysophosphatidylcholine (LPC) - a component of oxidized LDL (oxLDL) - that is the key factor for the inflammatory response, endothelial dysfunction development and progression of atherosclerotic plaque. Nitric oxide synthases (NOS) present a well-established role in the maintenance of vascular homeostasis. NOS deficiency is commonly related to endothelial dysfunction that precedes plaque deposition. However, the contribution of neuronal NOS (nNOS) on endothelial dysfunction induced by dyslipidemia is not known. Moreover, the mechanisms involved in the modulation of nNOS expression and activity by oxLDL on endothelial cells are completely unknown. On the other hand, some works suggested that statins (HMG-CoA reductase inhibitors; inhibitors of endogenous cholesterol synthesis) present direct beneficial effects on cardiovascular system, independently of cholesterol reduction. Some statins could activate or increase the expression of NOS, specially nNOS. By these reasons, we aimed to evaluate the role of nNOS on endothelial dysfunction induced by LPC and its role on the protection mediated by atorvastatin in a model of organ bath and in cultures of immortalized human endothelial cells. Were evaluated NOS in experiments by vascular reactivity. NO and H₂O₂ production by endothelial cells were measured by flow cytometry. The contribution of nNOS was evaluated by the pharmacological nNOS inhibition by TRIM. Our results suggested by the first time that acute treatment with LPC was able to induce endothelial dysfunction that was prevented by the use of atorvastatin by NOS stimuli. These findings were confirmed by flow cytometry, that demonstrated an increase of NO and H₂O₂ by the treatment with atorvastatin and a reduction with LPC. Finally, we showed that atorvastatin presented a protective effect on endothelial cells by upregulate nNOS activity and, consequently, preventing endothelial dysfunction mediated by LPC.

INTRODUÇÃO

1 Introdução

Aterosclerose, coronariopatias, doença vascular cerebral isquêmica e doença vascular periférica são consideradas consequências de dislipidemias, sendo o conjunto destas responsável pela maior parte da morbidade e da mortalidade entre adultos no Brasil e no mundo. Estudos sugerem que a incidência destas doenças ainda pode aumentar devido à epidemia da obesidade e à maior expectativa de vida da população mundial (Alpert 2012).

Dentre as patologias citadas acima, a aterosclerose é descrita como um processo crônico e progressivo, classicamente caracterizado por uma resposta inflamatória e fibroproliferativa em artérias de média e larga condutância. Dentre os vários fatores de risco, sabe-se que a hipercolesterolemia, a hipertensão arterial, o diabetes, o tabagismo, além das reações imunológicas e a suscetibilidade genética individual, atuam isoladamente ou em conjunto para a manifestação do fenótipo patológico vascular na aterosclerose (Ludewig, Zinkernagel et al. 2002; Ballantyne 2007; Abd, Eapen et al. 2011).

A aterosclerose, como resultado de hipercolesterolemia, estresse oxidativo e oxidação lipídica, é uma doença da camada íntima vascular, no qual todo o sistema vascular pode estar envolvido (Rafieian-Kopaei, Setorki et al. 2014). O processo é iniciado por uma disfunção endotelial que é caracterizada, entre outros fatores, por uma redução na produção de óxido nítrico (NO) (Weber and Noels 2011). Desde que o NO foi descoberto nos anos 80 como um fator relaxante derivado do endotélio (Ignarro, Buga et al. 1987), tem se tornado evidente que o NO não é somente uma das principais moléculas sinalizadoras do sistema cardiovascular, mas que mudanças na sua biodisponibilidade são cruciais no desenvolvimento da disfunção endotelial e, assim, para o estabelecimento do quadro de aterosclerose (Mudau, Genis et al. 2012).

Uma classe de fármacos altamente indicada para o tratamento de dislipidemias bem como para a prevenção primária de doenças cardiovasculares é dos inibidores da hidroximetil glutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), também denominados estatinas. As estatinas são fármacos hipolipemiantes que atuam através de uma inibição competitiva da HMG-CoA redutase, levando à redução das concentrações plasmáticas de colesterol.

No ano de 2014, o American College of Cardiology e a American Heart Association publicaram uma nova diretriz para o controle do colesterol e redução de risco cardiovascular em adultos. Pela nova diretriz, presume-se que o número de pessoas com dislipidemia discreta a utilizar estatinas deverá aumentar em 70% nos Estados Unidos. Apesar de polêmica, a proposta baseia-se não só nos efeitos hipolipemiantes das estatinas mas em uma série de efeitos pleiotrópicos como a melhora na produção e biodisponibilidade de NO, por exemplo. Desta forma, o melhor entendimento destes efeitos pode auxiliar no tratamento não só das dislipidemias, mas de doenças cardiovasculares em geral.

REVISÃO DA LITERATURA

2 Revisão da Literatura

2.1 O endotélio

A camada de células endoteliais está localizada entre o sangue em circulação e a camada de células do músculo liso vascular (VSMC - *vascular smooth muscle cells*). O endotélio, antes considerado uma camada inerte e tendo como função apenas ser cobertura interna da parede dos vasos, é atualmente descrito como uma peça chave na regulação da dilatação e contração dos vasos sanguíneos seja em resposta a alterações do fluxo sanguíneo ou a agentes vasoativos. Também atua no controle da passagem de pequenas e grandes moléculas, ou células inteiras, mantendo também a estrutura da parede vascular, e outras funções fisiológicas (Ignarro, Buga et al. 1987; Vane, Anggard et al. 1990). Além disto, o endotélio saudável é responsável pela manutenção de um ambiente "ateroprotetor", caracterizado pela redução da agregação de plaquetas, da proliferação de VSMC, e de baixas taxas de adesão e diapedese de leucócitos através da parede vascular (Viridis, Ghiadoni et al. 2010).

Para controle do tônus vascular, o endotélio é capaz de produzir e liberar mediadores contráteis e relaxantes. Entre os fatores vasodilatadores produzidos encontra-se o NO (Furchgott and Zawadzki 1980; Ignarro, Buga et al. 1987), a prostaciclina (Hatano, Kohli et al. 1980) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Feletou and Vanhoutte 1996) de identidade ainda não completamente desvendada. Como fatores contráteis tem-se a prostaciclina e o tromboxano A₂ (Moncada and Vane 1978), espécies reativas de oxigênio (ROS) (Cosentino, Sill et al. 1994), endotelinas (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988) e angiotensina II (Kover, Harza et al. 1968). A produção destes fatores encontra-se em equilíbrio em condições fisiológicas. No entanto, em condições patológicas, este equilíbrio é alterado, havendo redução na produção dos fatores relaxantes e/ou aumento na produção dos fatores contráteis, levando a disfunção endotelial (Lerman and Burnett 1992).

Devido à sua localização na parede vascular, o endotélio está diretamente exposto a fatores prejudiciais, tais como oscilações da pressão arterial e níveis elevados de lipídios. As alterações metabólicas ocasionadas pela disfunção endotelial possuem estreita relação com a origem e a progressão de várias doenças cardiovasculares como a aterosclerose (Ludmer, Selwyn et al. 1986; Higashi, Noma et al. 2009; Kondo, Hirose et al. 2009). Vários trabalhos demonstram

de maneira consistente que um dos primeiros sinais endoteliais frente às diversas lesões é a alteração na produção e/ou biodisponibilidade do NO (Oemar, Tschudi et al. 1998; Hadi, Carr et al. 2005; Li and Forstermann 2013; Rajendran, Rengarajan et al. 2013). Contudo, o caráter crônico e progressivo destas doenças, principalmente a aterosclerose, dificulta o estabelecimento de uma relação causal entre as alterações na biodisponibilidade do NO e o estabelecimento da progressão da doença.

2.1.1 Óxido nítrico sintase (NOS): regulação e função

O NO, menor molécula sinalizadora conhecida, é considerado uma molécula-chave na manutenção da homeostase cardiovascular (Fleming and Busse 1999; Droge 2002). Além do seu papel como fator relaxante derivado do endotélio, o NO exerce importantes papéis na fisiologia cardiovascular, tais como inibição da agregação plaquetária (Freedman, Sauter et al. 1999), inibição da adesão leucocitária (Kubes, Suzuki et al. 1991; Lefer and Ma 1993), inibição da proliferação do músculo liso vascular (Garg and Hassid 1989) e modulação da contratilidade cardíaca (Massion, Feron et al. 2003; Ebermann, Spillmann et al. 2008).

O NO é gerado por três diferentes isoformas da enzima NOS (*nitric oxide synthase*), referidas como NOS neuronal (nNOS ou NOS1), NOS induzível (iNOS ou NOS2) e NOS endotelial (eNOS ou NOS3). A eNOS e a nNOS são isoformas constitutivas e a iNOS é induzida por estímulos inflamatórios. Esta nomenclatura foi determinada de acordo com local e condição onde cada uma foi primeiramente encontrada e estudada (Forstermann, Closs et al. 1994).

Todas as isoformas catalisam a produção de NO através da conversão da L-arginina e oxigênio molecular em L-citrulina e NO, utilizando NADPH como co-substrato. FAD, FMN e (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH₄) são cofatores para as três isoformas. Todas as NOS são funcionais na forma de dímeros, transferindo elétrons do NADPH, via FAD e FMN no domínio redutase carboxi-terminal, para o domínio heme oxigenase amino-terminal. O domínio oxigenase também se liga ao cofator essencial BH₄, oxigênio molecular e ao substrato L-arginina (Alderton, Cooper et al. 2001). (Figura 1).

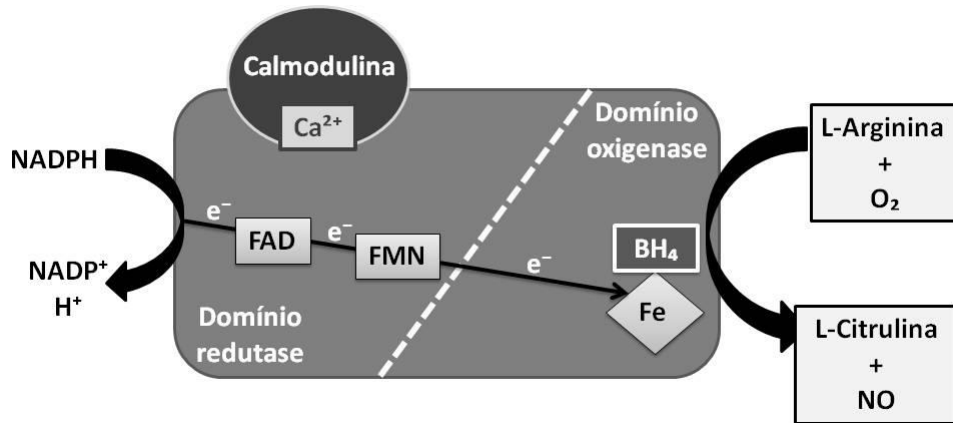


Figura 1: Representação esquemática da atividade da NOS ilustrando a formação de NO e L-citrulina a partir de L-arginina e O₂, utilizando como cofatores ferro (Fe), BH₄, íons Ca²⁺, além de transferência de elétrons em uma reação envolvendo NADPH, FAD e FMN entre os domínios redutase e oxigenase.

Todas as NOS apresentam sítio de ligação para a calmodulina (CaM). O aumento dos níveis intracelulares de Ca²⁺ leva a ligação do mesmo à CaM. Simultaneamente, há um aumento da afinidade pelo complexo Ca²⁺-CaM com ligação do mesmo aos respectivos sítios na nNOS e eNOS. Esta ligação facilita o fluxo de elétrons do NADPH no domínio redutase para o domínio oxidase. Na iNOS, a afinidade pela CaM já é alta mesmo em concentrações muito baixas de Ca²⁺ intracelular devido à diferença de estrutura de aminoácido no sítio ligante de CaM (Cho, Xie et al. 1992). Desta forma, a síntese de NO pela eNOS e nNOS é dependente de estímulos que aumentem o influxo de cálcio ao passo que a síntese de NO pela iNOS independe destes estímulos.

A nNOS, é constitutivamente expressa em neurônios específicos no cérebro, onde foi primeiramente descrita. Sua atividade enzimática é regulada por Ca²⁺ e calmodulina, como já exposto. Esta enzima tem sido relacionada à modulação de funções neurológicas como aprendizado, memória e neurogênese (Zhou and Zhu 2009). Mais recentemente, trabalhos demonstram que a isoforma neuronal também se encontra no endotélio vascular de camundongos, produzindo além de NO, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como fator capaz de causar relaxamento vascular (Capettini, Cortes et al. 2010). Sabe-se ainda que esta isoforma está presente em células epiteliais de vários órgãos, no rim e em células pancreáticas, por exemplo. O NO produzido pela nNOS, assim como pelas demais isoformas, estimula guanilato ciclase solúvel

em células efectoras, diminuindo o tônus de vários tipos de músculo liso, incluindo o de vasos sanguíneos (Forstermann, Closs et al. 1994).

A iNOS não é usualmente expressa na maioria das células, mas sua expressão pode ser induzida por lipopolissacarídeo bacteriano, citocinas e outros agentes pró-inflamatórios. Embora tenha sido primariamente identificada em macrófagos, a expressão desta enzima pode ser estimulada em qualquer célula ou tecido, onde os agentes indutores tem sido identificados. Uma vez expressa, a iNOS se torna constantemente ativa e não sofre regulação por concentrações de Ca^{2+} intracelular (Forstermann, Pollock et al. 1994). Esta isoforma gera NO em grandes quantidades e por prolongados períodos de tempo, limitado apenas pela acessibilidade ao substrato e concentração de O_2 (Xie, Cho et al. 1992). O NO então gerado é capaz de interferir com o DNA de células alvo e causar sua fragmentação (Wink, Kasprzak et al. 1991), sendo este um dos maiores efeitos citostáticos e citotóxicos do NO em parasitas, micro-organismos e certas células tumorais (Li, Kilbourn et al. 1991).

A terceira isoforma, eNOS, é principalmente expressa em células endoteliais. Entretanto, a enzima também foi detectada em cardiomiócitos, plaquetas, certos neurônios no cérebro, placenta humana e células epiteliais do rim (Forstermann, Closs et al. 1994). Similar à nNOS, a ligação de Ca^{2+} à calmodulina é importante para a regulação da atividade da eNOS, que tem sua produção de NO aumentada quando há aumento de Ca^{2+} intracelular, que induz a ligação da calmodulina à enzima (Hemmens and Mayer 1998). Entretanto, eNOS pode ser ativada por estímulo que não seja proveniente do aumento intracelular de Ca^{2+} mas que ainda induza uma duradoura liberação de NO. O que melhor define este estímulo é o estresse de cisalhamento, capaz de ativar cinases responsáveis pela fosforilação da NOS em sítios específicos de serina, treonina e tirosina. Entre as funções fisiológicas do NO proveniente da eNOS, destacam-se: inibição da agregação de plaquetas (Busse, Luckhoff et al. 1987) e inflamação vascular através da estimulação de guanilato ciclase solúvel e aumento de GMP cíclico nas células do músculo liso (Rapoport and Murad 1983); inibição da adesão de leucócitos, que é um evento primário no desenvolvimento de aterosclerose (Kubes, Suzuki et al. 1991); controle da proliferação de músculo liso vascular, prevenindo um posterior passo na aterogênese - a formação da placa fibrosa - levando o NO produzido pelas células endoteliais a ser considerado um princípio anti-aterosclerótico (Nakaki, Nakayama et al. 1990).

As três isoformas da NOS estão envolvidas no processo do desenvolvimento da aterosclerose (Li and Forstermann 2013). Portanto, conhecer os mecanismos que desencadeiam este processo pode ser um fator inicial importante para prevenção de danos vasculares futuros.

2.1.2 Disfunção endotelial: um dos primeiros passos para aterosclerose

A aterosclerose é uma doença vascular progressiva e crônica, caracterizada pela formação da placa e subsequente fissura, erosão e ruptura culminando em trombose (Lahoz and Mostaza 2007). A exposição crônica a fatores de risco cardiovascular (tabagismo, dislipidemia, obesidade, por exemplo) e estímulos nocivos associados a estas condições alteram o sistema de defesa do endotélio vascular, prejudicando sua integridade e, finalmente, iniciando um processo de disfunção endotelial (Ross 1993) onde há a diminuição da formação de NO e, conseqüentemente, levando a uma inabilidade do endotélio em promover relaxamento vascular em resposta aos estímulos vasodilatadores como acetilcolina e estresse de cisalhamento. Este representa um dos passos iniciais e reversível no desenvolvimento da aterogênese (Vanhoutte 2009).

Danos ao endotélio levam a um desbalanço entre a produção de fatores relaxantes e contráteis que levam aos eventos que culminam em aterosclerose, incluindo aumento da permeabilidade endotelial, agregação plaquetária, adesão de leucócitos e produção de citocinas (Anderson 1999; Ross 1999). Contudo, a diminuição na produção de NO parece ser um dos primeiros sinais de aterosclerose (Davignon and Ganz 2004), onde já foi demonstrado que o NO previne a oxidação do LDL (low-density - lipoprotein ou lipoproteína de baixa densidade), que é um importante passo para o estabelecimento da doença (Rubbo, Trostchansky et al. 2002; Steinberg and Witztum 2002).

Níveis basais de NO são comumente produzidos pelas células endoteliais para a preservação da função e do tônus fisiológico vascular. Em resposta a estímulos que indicam o aumento da demanda do fluxo sanguíneo, por exemplo, o aumento da tensão de cisalhamento, a via fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) / proteína cinase-B (Akt) é ativada, levando à fosforilação da eNOS com conseqüente produção de NO e relaxamento do músculo liso vascular (Furchgott and Zawadzki 1980; Dimmeler, Fleming et al. 1999). Além disso, vários agonistas como a

bradicinina e serotonina podem levar a um aumento nas concentrações citoplasmáticas de cálcio nas células endoteliais, com ativação da produção de NO (Govers and Rabelink 2001).

Entretanto, para que o NO seja produzido, as NOS requerem cofatores como BH₄, FAD e FMN. A ausência de algum destes cofatores não permitirá com que a enzima se torne um dímero - forma na qual está ativa e produz NO - levando ao processo denominado desacoplamento. Em seu estado desacoplado, ou seja, na forma de dímero, a enzima produz NO e pequenas quantidades de radical superóxido, como produto intermediário da reação. No estado acoplado, há redução na produção de NO e/ou aumento na produção de superóxido (Alderton, Cooper et al. 2001; Anderson 2003). Em modelos animais e humanos de dislipidemia, associados ou não à formação de placa aterosclerótica, é observado uma acentuada redução na biodisponibilidade de NO e H₂O₂, como consequência do desacoplamento da eNOS e nNOS (Fleming, Mohamed et al. 2005; Capettini, Cortes et al. 2011).

A redução destes produtos por conta do desacoplamento das NOS pode levar a uma redução da resposta vasodilatadora, a qual foi descrita pela primeira vez em 1986 através de um estudo realizado por Ludmer e colaboradores. Neste estudo, a administração intravenosa de acetilcolina foi ineficaz em produzir vasodilatação. Pelo contrário, os vasos com aterosclerose apresentaram vasoconstrição após a administração de acetilcolina (Ludmer, Selwyn et al. 1986). Posteriormente, Reddy e colaboradores (1994) e Celermajer e colaboradores (1994), usando o mesmo teste da acetilcolina, demonstraram que pacientes com fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose, mas sem indícios ultrassonográficos ou angiográficos de placa aterosclerótica, também apresentaram disfunção endotelial. Tais dados confirmaram a hipótese de que a disfunção endotelial parece preceder a deposição de placa (Celermajer, Dollery et al. 1994; Reddy, Nair et al. 1994).

Além da redução de NO, a hiperlipidemia que consiste em aumento de lipídeos circulantes incluindo colesterol e triglicérides, também é considerada um estado que predispõe à disfunção endotelial. Possíveis mecanismos que explicam a disfunção endotelial mediada por hiperlipidemia incluem: (1) aumento da regulação de NADPH oxidase, aumentando a produção de O₂⁻ e estresse oxidativo (Rajagopalan, Kurz et al. 1996); (2) aumento dos níveis plasmáticos de dimetilarginina assimétrica (ADMA) (Boger, Bode-Boger et al. 1998) e (3) oxidação de LDL (Imanishi, Hano et al. 2004). ADMA é um inibidor endógeno da eNOS e compete com L-

arginina pelo mesmo sítio de ligação na eNOS, resultando em desacoplamento com aumento da produção de O_2^- e diminuição da produção de NO. Além disto, com o aumento da produção de ânions O_2^- , pode ocorrer a reação deste com o NO produzindo peroxinitrito ($ONOO^-$), que é responsável por oxidar o cofator essencial das NOS, o BH_4 , o que também leva ao desacoplamento da eNOS (Katusic 2001). Altos níveis de TNF- α na aterosclerose também tem sido associado à *downregulation* da eNOS por acelerar a degradação do RNAm da eNOS e também por aumentar a atividade de NADPH oxidase (Zhang, Park et al. 2009).

Todos os processos descritos levam a formação de ânions O_2^- , o que leva à oxidação do colesterol LDL, que tem um papel principal na aterogênese (Zeibig, Li et al. 2011). O LDL oxidado (LDLox) promove a produção de endotelina 1 (ET-1) (Boulangier, Tanner et al. 1992), expressão de moléculas de adesão, migração e proliferação de VSMC (Lahteenmaki, Korpela et al. 1998). Além disto, o LDLox é internalizado por macrófagos que se transformam em células espumosas no espaço subendotelial e contribuem para o início da formação da placa aterosclerótica (Yokode, Kita et al. 1988). O LDLox ainda aumenta a síntese de dimetil-arginina assimétrica (ADMA) (Boger, Sydow et al. 2000) e de caveolina-1 (Davignon and Ganz 2004), responsáveis por inibir a atividade da eNOS.

Apesar de já conhecida a existência da nNOS nas células endoteliais e em músculo liso vascular, pouco se sabe sobre o papel desta enzima na formação da placa aterosclerótica. Wilcox e colaboradores (1997) demonstraram o aumento da expressão do RNAm da nNOS em células endoteliais em associação com aterosclerose, e que a geração de NO na célula muscular lisa na lesão aterosclerótica se dá pela nNOS (Wilcox, Subramanian et al. 1997). Estudos ainda sugerem que a nNOS atua como agente vaso-protetor na aterosclerose, uma vez que sua deleção gênica acelera a formação de placa em animais com deleção gênica para apolipoproteína E ($apoE^{-/-}$) (Kuhlencordt, Hotten et al. 2006; Schodel, Padmapriya et al. 2009). Em recente trabalho do nosso grupo de pesquisa foi demonstrado que a função endotelial da nNOS em aorta de camundongo $apoE^{-/-}$ é diminuída, levando a uma deficiência na produção de H_2O_2 , o que contribui para a disfunção endotelial nestes camundongos (Capettini, Cortes et al. 2011).

2.2 Lisofosfatidilcolina

O LDLox é considerado um importante fator causal da disfunção endotelial e da formação de células espumosas (via captação por macrófagos) no processo de instalação e progressão da placa aterosclerótica (Steinberg, Parthasarathy et al. 1989). Quando o LDL é oxidado, aproximadamente 60% da fosfatidilcolina (PC) presente no LDL é hidrolisada e convertida a lisofosfatidilcolina (LPC) (Figura 2). Acredita-se que a atividades aterogênica do LDLox, incluindo a indução de moléculas de adesão, como molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule*) e molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1, *intracellular adhesion molecule*) em células endoteliais, atraindo monócitos e leucócitos que contribuirão para formação da placa aterosclerótica (Kume, Cybulsky et al. 1992). A LPC também aumenta a concentração de Ca^{2+} no músculo liso pela liberação dos estoques intracelulares e aumento do influxo de Ca^{2+} do meio extracelular através da membrana plasmática por mecanismo ainda não elucidado (Inoue, Hirata et al. 1992).

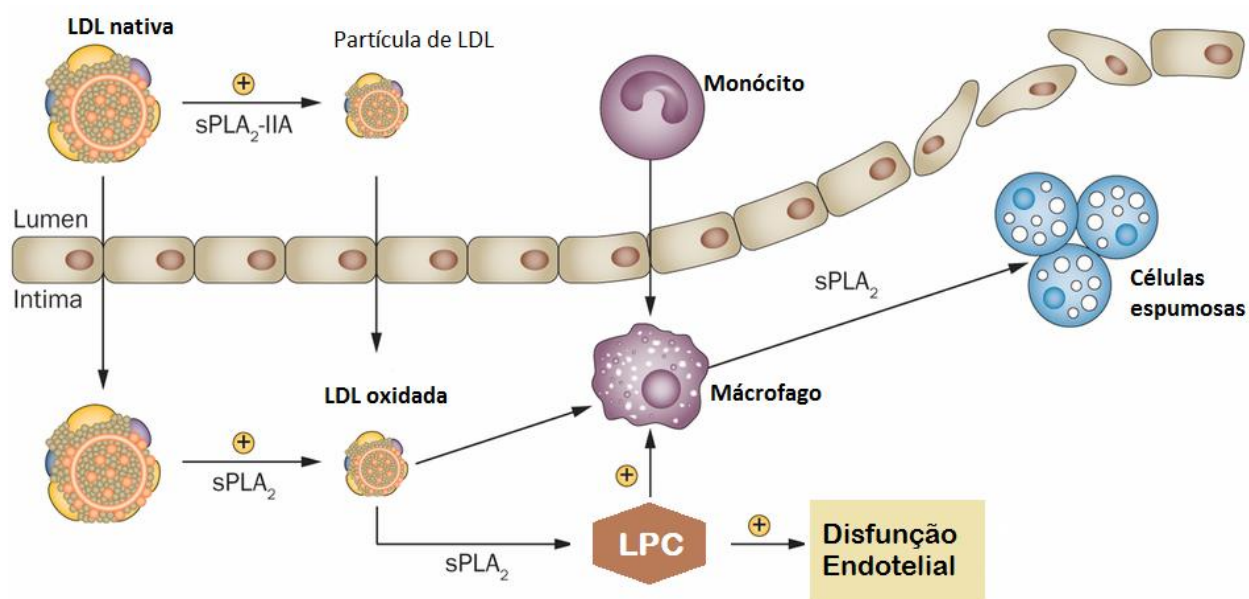


Figura 2: Representação esquemática demonstrando a formação de uma partícula densa de LDL facilitada pela fosfolipase A₂ (sPLA₂) a partir do LDL nativo, que migra mais facilmente para a camada íntima, sendo oxidada e posteriormente hidrolisada, levando à formação de LPC. Estes compostos são conhecidos por promover disfunção endotelial. (adaptado de (O'Donoghue 2014)).

Enquanto o LDL nativo parece não afetar o relaxamento vascular dependente de endotélio, a LPC demonstrou causar prejuízo ao endotélio vascular levando à uma redução do relaxamento induzido por acetilcolina (Kugiyama, Kerns et al. 1990; Yokoyama, Hirata et al. 1990; Miwa, Hirata et al. 1997). Mangin e colaboradores (1993) ao incubar artérias isoladas de coelho com LDL-ox observaram que estas se tornavam insensíveis a agentes vasorrelaxantes e, além disto, adquiriram propriedades vasomotoras semelhantes a artérias com aterosclerose (Mangin, Kugiyama et al. 1993). Também já foi demonstrado que a LPC inibe o relaxamento de aorta abdominal de coelhos por reduzir o NO derivado do endotélio (Cowan and Steffen 1995), enquanto Eizawa e col. (1995) demonstrou que a LPC atenua o relaxamento mediado por NO e EDHF em artérias coronárias de porco de uma maneira dose-dependente (Eizawa, Yui et al. 1995). Em outro estudo, efeito semelhante foi observado em aorta de rato (Froese, McMaster et al. 1999). Também em aorta de ratos, foi demonstrado um prejuízo no relaxamento vascular promovido pela acetilcolina na presença de LPC (Deng and Xiong 2005).

Em estudo realizado com células endoteliais da linhagem EA.hy926 e anéis de aorta de camundongo expostos a LPC foi observado desacoplamento da eNOS e aumento da produção de ROS com concomitante redução de NO (Kozina, Opresnik et al. 2014). Outro estudo utilizando células endoteliais e células musculares lisas demonstrou aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} ao incubar ambas as células com LPC, o que em parte pode explicar o prejuízo no relaxamento em anéis de aorta (Leung, Xion et al. 1998). Contudo, não existem trabalhos avaliando o papel da LDLox ou LPC sobre a expressão e/ou atividade da nNOS. Estes estudos tornam-se essenciais tendo em vista a importância da nNOS no processo aterosclerótico.

2.3 Estatinas

As estatinas são uma classe de fármacos que atuam na diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol, efeito resultante da inibição da síntese deste no fígado, através da inibição da conversão da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) a mevalonato, etapa limitante da síntese de colesterol (Goldstein and Brown 1990).

Entretanto, têm sido propostos vários efeitos benéficos das estatinas por vias independentes da redução da síntese do colesterol que são observados no decurso da terapia de diminuição de lipídios (Bonetti, Lerman et al. 2003). Estes efeitos denominados pleiotrópicos incluem, no sistema cardiovascular, um aumento na expressão de eNOS que é mediado através de aumento da estabilidade de seu RNAm (Laufs, Wassmann et al. 2001). Como consequência, as estatinas aumentam a produção de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais, levando a uma melhora na função vasodilatadora (Lefer, Scalia et al. 2001). Contudo, como a maioria dos estudos, principalmente clínicos, envolvem o tratamento da dislipidemia, fica difícil avaliar se tais efeito sobre o sistema cardiovascular são decorrentes da redução do colesterol ou são efeitos diretos das estatinas sobre o sistema cardiovascular.

2.3.1 Efeitos pleiotrópicos

A hipercolesterolemia afeta diretamente os processos pelos quais o endotélio modula o tônus vascular. Neste âmbito, já é bem estabelecido que a terapia com estatinas pode aumentar a produção endotelial de NO, resultando em melhora da função endotelial (Laufs, La Fata et al. 1998). Além disso, ao atuar inibindo a biossíntese hepática do colesterol, as estatinas podem levar a uma redução plasmática dos níveis de LDL, o qual é essencial para o surgimento da disfunção endotelial (Mauro and MacDonald 1991).

A enzima HMG-CoA redutase também está envolvida na via da biossíntese de isoprenóides (por exemplo colesterol) a partir do mevalonato (Goldstein and Brown 1990). Aos isoprenóides têm sido dado um papel central nos mecanismos de proliferação celular e migração de células do músculo liso vascular, o que também explica os efeitos anti-ateroscleróticos das estatinas além de suas propriedades hipocolesterolêmicas (Raiteri, Arnaboldi et al. 1997).

Alguns estudos demonstram que, tanto a sinvastatina quanto a atorvastatina, podem diretamente promover relaxamento vascular no músculo liso através da inibição do influxo de Ca^{2+} , pelo bloqueio de canais para cálcio operados por voltagem, e da liberação de cálcio do meio intracelular. Entretanto, os possíveis mecanismos envolvidos neste efeito vasodilatador ainda precisam ser elucidados (Tesfamariam, Frohlich et al. 1999; Mukai, Shimokawa et al. 2003).

Os resultados clínicos do uso crônico das estatinas na terapêutica cardiovascular associada à dislipidemia são consistentes e indiscutíveis. Entretanto, vários trabalhos sugerem efeitos benéficos que independem da redução dos níveis do colesterol e também incluem: ação antineoplásica (Jakobisiak and Golab 2003), inibição da reabsorção óssea (Staal, Frith et al. 2003), aumento da disponibilidade de NO endotelial (Kalinowski, Dobrucki et al. 2002), inibição da proliferação de células endoteliais induzidas por fatores angiogênicos (Vincent, Soria et al. 2002), diminuição dos níveis de citocina pró-inflamatória IL-6 no tecido adiposo (van Harmelen, Skurk et al. 2003; Liao and Laufs 2005), ação reguladora na função endotelial (Zhou and Liao 2010), aumento da estabilidade de placas ateroscleróticas (Girotra, Murarka et al. 2012), diminuição do estresse oxidativo vascular (Mahfouz and Kummerow 2005), redução na inflamação vascular (Laufs, La Fata et al. 1998) e diminuição da resposta trombogênica (Kaneider, Egger et al. 2002).

Os inibidores da HMG-CoA redutase também tem se demonstrado úteis na prevenção da *downregulation* exercida pela LDLox sobre a expressão e atividade da NOS endotelial (Hernandez-Perera, Perez-Sala et al. 1998). Acredita-se que parte dos efeitos das estatinas sobre o aumento da biodisponibilidade de NO envolva a ativação de serina/treonina cinases Akt que por sua vez fosforila a eNOS no resíduo de serina 1177, resultando na ativação da enzima com consequente aumento na produção de NO (Feron, Dessy et al. 2001; Morrow, Fougelle et al. 2003; Sugawara, Jadhav et al. 2008). Rossoni e colaboradores (2011) demonstraram que a sinvastatina atua agudamente reduzindo a resposta contrátil de artérias de resistência por um mecanismo envolvendo uma via dependente de AMPK (Rossoni, Wareing et al. 2011). Estas observações proveem fortes evidências que estatinas podem aumentar a produção do NO vascular e aumentar significativamente a função vasodilatadora não só durante a dislipidemia mas também em outras patologias vasculares associadas à redução da biodisponibilidade de NO.

Os resultados acima citados em associação a numerosos estudos que demonstram que o tratamento com estatinas significativamente reduz a morbidade e mortalidade cardiovascular em pacientes com ou sem doença arterial coronariana tem levado a considerações recentes da comunidade médica sobre a possível utilização de estatinas na prevenção de algumas complicações de doenças cardiovasculares em pacientes hipercolesterolêmicos ou não (Mora and Ridker 2006; Tziomalos, Athyros et al. 2009). Alguns estudos ainda demonstram que indivíduos expostos a fatores de risco cardiovascular tratados com estatinas apresentaram significativa redução dos níveis plasmáticos de proteína C reativa e de citocinas pró-inflamatórias (Ridker, Rifai et al. 1999). Em vasos humanos, as estatinas atuam no reequilíbrio do estado redox, reduzindo o estresse oxidativo, evento-chave na fisiopatologia vascular (Briones, Rodriguez-Criado et al. 2009; Lee, Channon et al. 2012). Além disso, acredita-se que a melhora da função endotelial esteja relacionada também a uma redução da ativação de linfócitos T, migração de macrófagos e consequente estabilização da placa aterosclerótica (Croons, Martinet et al. 2010). Contudo, os mecanismos envolvidos neste efeito ainda não foram elucidados justificando estudos mais aprofundados sobre os efeitos pleiotrópicos das estatinas.

JUSTIFICATIVA

3 Justificativa

Em estágios que precedem a formação da placa aterosclerótica, pode-se evidenciar uma acentuada disfunção endotelial associada a uma diminuição de função não só da eNOS - como já se conhecia classicamente - mas também da nNOS. No entanto, apesar das várias evidências do papel vaso-protetor da nNOS na aterosclerose em modelos animais, o papel da mesma no desenvolvimento da aterosclerose humana permanece completamente desconhecido.

Os crescentes dados da literatura que suportam a teoria de que a disfunção endotelial é um primeiro passo necessário para o desenvolvimento da aterosclerose e de outras patologias vasculares fomentam atualmente um enorme interesse da comunidade científica em tentar desvendar os mecanismos fisiopatológicos subjacentes (Deanfield, Donald et al. 2005; Vanhoutte 2009).

Além dos efeitos hipocolesterolemiantes, as estatinas apresentam importantes efeitos pleiotrópicos cardiovasculares. Estes efeitos pleiotrópicos podem ser os responsáveis, em grande parte, pela indiscutível melhora cardiovascular apresentada por pacientes dislipidêmicos em terapia com estatinas. Especificamente, não são conhecidos os efeitos pleiotrópicos vasculares da atorvastatina, umas das drogas mais vendidas e utilizadas no mundo. Desta forma, o presente estudo tem a proposta de contribuir para a elucidação dos mecanismos envolvidos no efeito vaso-protetor direto e agudo da atorvastatina, independentemente da redução dos níveis de colesterol e ainda os efeitos da atorvastatina sobre um modelo de disfunção endotelial induzido por LPC, um dos componentes ativos da LDLox.

OBJETIVOS

4 Objetivos

O objetivo geral deste estudo é investigar o efeito direto da atorvastatina sobre a função vascular em aortas de camundongos normolipidêmicos bem como sobre a disfunção endotelial induzida por LPC.

Os objetivos específicos incluem:

- Caracterizar o modelo de disfunção endotelial *ex vivo* induzido pela LPC;
- Avaliar se o tratamento *in vitro* com atorvastatina melhora a disfunção endotelial causada pela LPC;
- Avaliar se o tratamento *in vitro* com a atorvastatina modula a função contrátil da musculatura lisa vascular;
- Avaliar o efeito *in vitro* da atorvastatina e da LPC sobre a síntese endotelial de NO, radicais superóxido e H₂O₂ por citometria de fluxo;
- Avaliar o efeito da LPC sobre os níveis de fosforilação da nNOS por Western blot, bem como o papel da atorvastatina sobre este efeito.

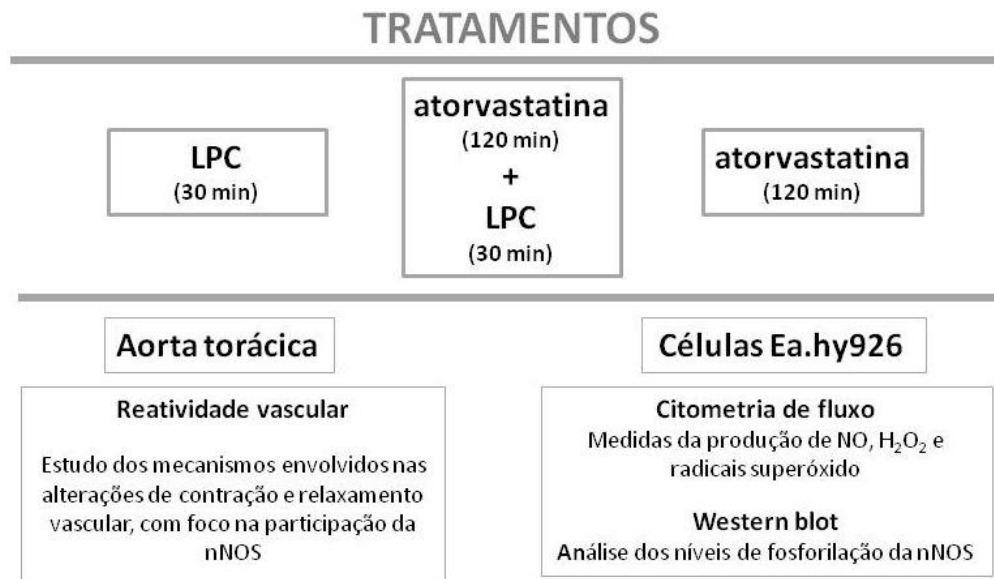


Figura 3: Esquema demonstrando os tratamentos e análises que serão desenvolvidos neste trabalho.

METODOLOGIA

5 Metodologia

5.1 Modelo animal

Neste estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL6J, com idade entre 10 a 12 semanas, obtidos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas - CEBIO - ICB - UFMG. Os animais utilizados tiveram livre acesso à água e ração e foram mantidos em gaiolas coletivas, em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas e temperatura controlada. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (Protocolo n° 0076/2012).

5.2 Reatividade Vascular

Para os experimentos de reatividade vascular, foram utilizados anéis de aorta torácica de camundongos. Após a decapitação do animal, a aorta foi cuidadosamente dissecada, livre de tecido adiposo perivascular e assim colocada em placa de Petri contendo solução nutriente de Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; CaCl₂.2H₂O 2,5; glicose 11; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,2; pH 7.4). A artéria foi cortada em anéis de aproximadamente 3mm de comprimento. Nestes anéis foram transpassadas duas hastes metálicas triangulares através do lúmen do vaso. Um dos triângulos metálicos foi afixado a uma haste metálica acoplada a um transdutor de tensão isométrica. Para obtenção do registro de tensão, estes anéis foram acondicionados em cubas contendo 10mL da solução nutriente, constantemente aerada com mistura carbogênica, sendo 95% O₂ e 5% CO₂, mantida a temperatura de 37°C e pH de 7,4.

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

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

5.2.1 Avaliação da Integridade Endotelial

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

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

5.2.2 Efeito da LPC sobre a reposta vascular

Para se avaliar o efeito da LPC nas preparações de aorta, foram realizadas curvas concentração-resposta de acetilcolina (0,001 a 100 μ M) ou fenilefrina (0,001 a 100 μ M) antes e após incubação com LPC, por 30 minutos, em 3 diferentes concentrações: 10, 30 e 50 μ M.

Após serem comparadas as curvas antes e após o tratamento com LPC, foi escolhida a concentração de 10 μ M para os estudos subsequentes.

5.2.3 Avaliação dos mecanismos envolvidos no efeito modulatório da LPC sobre a função vascular

Para a avaliação da participação da via do NO nas alterações vasculares induzidas por LPC, as preparações de aorta foram pré-incubadas por 30 minutos com L-NAME (L-N^G-Nitroarginine methyl ester) inibidor não seletivo das NOS (300μM). Para avaliar a participação da isoforma nNOS foi utilizado o inibidor seletivo TRIM (1-(2-Trifluoromethylphenyl)imidazole, 100μM, 30 minutos). Não foi utilizado inibidor seletivo para eNOS tendo em vista a baixa seletividade de todos os inibidores comercialmente disponíveis.

Foi avaliada a participação do substrato L-arginina na concentração de 10mM, durante período de 30 minutos.

Para avaliar a participação do H₂O₂ foi utilizada a enzima catalase (2400U/mL), que degrada o H₂O₂ em H₂O e O₂, 30 minutos antes da realização das curvas.

Curvas concentração-resposta cumulativas com fenilefrina ou acetilcolina foram construídas antes e após o período de incubação com as drogas mencionadas e os resultados obtidos na ausência e presença das drogas foram comparados.

Os protocolos acima foram também realizados na presença de LPC para se avaliar o papel das NOS, especificamente da nNOS, nas alterações induzidas pela LPC.

Novas curvas concentração-resposta com os inibidores foram também realizadas na presença de ator (1 e 10μM) e LPC (10μM) para se avaliar os mecanismos envolvidos sobre a via das NOS na presença de uma ou ambas as drogas nas mesmas condições já descritas.

5.2.4 Avaliação do efeito modulatório da atorvastatina sobre a resposta vascular

Para avaliar o efeito direto da atorvastatina sobre a função vascular, bem como sobre as alterações induzidas por LPC, as preparações de aorta foram pré-incubadas por 120 minutos com duas diferentes concentrações de atorvastatina (ator 1 e 10 μM), com trocas regulares da solução fisiológica contendo atorvastatina a cada 15 minutos. Foram então realizadas novas curvas de

fenilefrina ou acetilcolina. As respostas obtidas nas preparações tratadas com atorvastatina, na presença ou ausência de LPC, foram comparadas com as respostas antes do tratamento.

Resumindo, temos o seguinte esquema referente aos procedimentos envolvidos no protocolo de reatividade vascular:

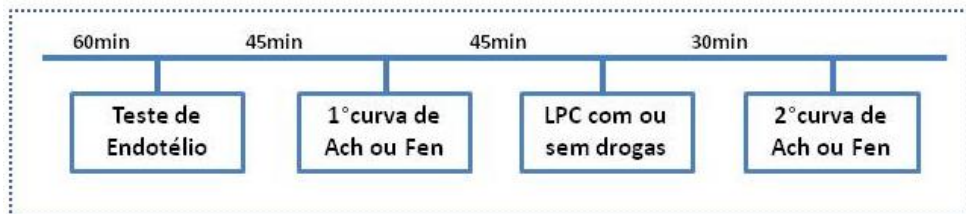


Figura 4: Figura esquemática da metodologia empregada no experimento de reatividade vascular demonstrando tempo de exposição do vaso à LPC, bem como às drogas L-NAME, TRIM, Catalase, L-arginina.

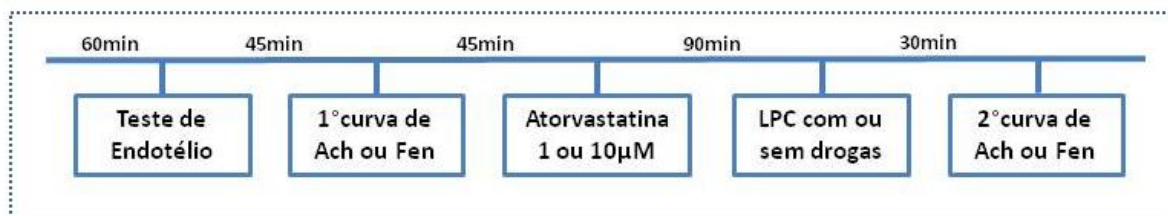


Figura 5: Figura esquemática da metodologia empregada no experimento de reatividade vascular demonstrando tempo de exposição do vaso à atorvastatina com ou sem LPC, e às drogas L-NAME, TRIM, Catalase.

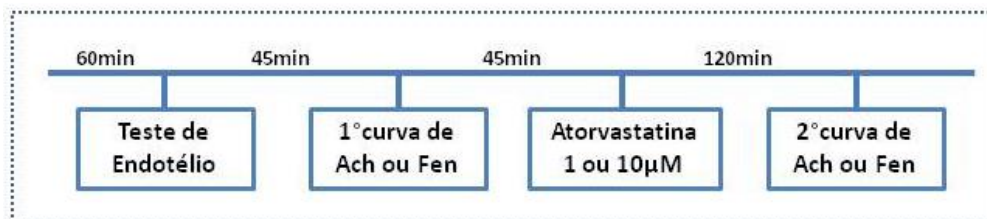


Figura 6: Figura esquemática da metodologia empregada no experimento de reatividade vascular demonstrando tempo de exposição do vaso à atorvastatina.

5.3 Medidas de NO, H₂O₂ e O₂⁻

Para as dosagens de NO, H₂O₂ e O₂⁻, foi utilizada citometria de fluxo da linhagem de células endoteliais humanas (EA.hy926) comercialmente disponíveis (ATCC, USA). As células foram mantidas em meio apropriado (Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM) enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina.

Para as células utilizadas nos experimentos, o soro fetal bovino do meio de cultura foi reduzido a 0,5% por pelo menos 24h de antecedência para evitar que as células se encontrassem em processo de divisão na ocasião do experimento. Após este período, as células foram desprendidas da placa com tripsina 0,5% e colocadas em placa de 96 poços tratadas com atorvastatina por diferentes tempo e nas concentrações já descritas de 1 e 10µM (120min) e/ou LPC 10µM (30min), sendo expostas também a estímulo com acetilcolina 10µM (30 minutos) . Após centrifugação por 10 minutos a 1500rpm, o sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas com sonda fluorescente intracelular para o NO (4-Amino-5-methylamino-2', 7'-difluorofluorescein, DAF-FM, 2,5µM; Invitrogen, USA), H₂O₂ (dihydrodichlorofluorescein diacetate, H₂-DCF-DA, 2,5µM; Invitrogen, USA) ou para os radicais superóxido (dihydroethidium, DHE, 2,5µM; Invitrogen, USA), por 30 minutos a 37°C em incubadora de CO₂.

Após fixação com paraformaldeído (4% em PBS), as células foram levadas para análise no citômetro (Becton Dickinson FACScan flow cytometer), sendo aceita a contagem de 15000 eventos. Os resultados foram analisados no programa FlowJo (v10.0.6) e expressos como intensidade de fluorescência média através do programa FlowJo.

5.4 Western blot

Células endoteliais da linhagem EA.hy926 foram plaqueadas em placas de petri de 9 cm diâmetro até subconfluência (≈90%) e foram expostas aos mesmos tratamentos que os anéis de aorta, porém em DMEM contendo 0,5% de soro fetal bovino, sendo divididas em 4 grupos: A) Controle; B) expostas aos estímulos com atorvastatina (1 e 10µM por 120min), C) LPC (10µM

por 30min) e D) atorvastatina com LPC; sendo que estes grupos foram divididos em: expostos ou não a acetilcolina, 10 μ M por 30min.

Após os tratamentos, as células foram lisadas em tampão de lise RIPA (Tris HCl 50mmol/L; NaCl 180mmol/L; EDTA 0,5mmol/L; DTT 1mmol/L, Nonidet P-40 0,2%) acrescido de Triton X-100 0,3%, SDS 0,5% e de *cocktail* de inibidores de proteases (SigmaFast®, Sigma), NaF 20mM e PMSF 20mM. As amostras permaneceram no gelo por 30 minutos, foram agitadas no vortex e sonicadas por 120 segundos. Este processo foi repetido 2 vezes e depois as amostras foram centrifugadas por 15 minutos na velocidade de 8000rpm, sendo o sobrenadante aliqotado e congelado para posterior utilização. A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método descrito por Lowry e colaboradores (Lowry, Rosebrough et al. 1951).

Para separação foram aplicados 40 μ g de proteína em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (sodium dodecyl (lauryl) sulfate-poliacrilamida) a 7,5% utilizando-se o sistema Mini-Protean tetra cell (Biorad®). Após serem separadas no gel (100V; 90 minutos), as proteínas foram transferidas (100V; 120 minutos) para uma membrana de PVDF (Millipore®) com poro de 0,45 μ M. A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. A membrana foi então lavada em água destilada e colocada por 1 hora em solução de bloqueio TBS-Tween (Tris-base, NaCl e tween 0,1%) mais 3% de albumina. Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* com anticorpo primário específico diluído em 1% de albumina em TBS-Tween a 4°C. Foram utilizados os anticorpos primários: anti-NOS1 (nNOS) (1:1000; monoclonal feito em coelho; Santa Cruz), anti-phospho-NOS1^{Ser852} (p-nNOS^{Ser852}) (1:1000; monoclonal feito em cabra; Santa Cruz), e anti-GAPDH (GAPDH) (1:1000; monoclonal feito em cabra; Santa Cruz).

Em seguida a membrana foi lavada em TBS-Tween durante 5 minutos, por 4 vezes, e incubada por 2 horas com o anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase (HRP) (1:5000, IgG-HRP; Sigma, St. Louis, MO) diluído em 1% de albumina em TBS-Tween. Após o período de incubação, a membrana foi novamente lavada em TBS-T durante 5 minutos (4 vezes) e as bandas proteicas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência (Luminata Forte, Millipore) em câmara escura e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageJ® 1.40g. O grau de fosforilação foi avaliado pela razão entre a

intensidade das bandas da NOS1^{Ser852} pela NOS1 total. A homogeneidade das quantidades de proteínas aplicadas foi confirmada pela análise da razão entre a NOS1 total e o conteúdo de GAPDH.

5.5 Análises estatísticas e expressão dos resultados

Os cálculos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0. Os dados de relaxamento vascular foram representados como o percentual de redução de contração em resposta a fenilefrina. Os dados de contração, por sua vez, foram expressos em mN/mm, considerando a força desenvolvida pelo vaso e o comprimento do anel. As curvas concentração-resposta cumulativas foram analisadas ponto-a-ponto através do método *two-way* ANOVA para medidas repetidas, seguidas de testes de comparação do tipo *BONFERRONI*. Os valores de Emax foram determinados através de regressão não linear das curvas obtidas nos experimentos, representando o ponto onde foi obtido o efeito máximo da droga utilizada. Os dados de citometria de fluxo e western blot foram expressos como média \pm EPM dos valores obtidos para cada amostra. Os resultados expressos por gráficos de barras foram comparados pelos testes t de *Student* ou pelo método *one-way* ANOVA. Para os experimentos realizados foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

6 Resultados

Os resultados serão demonstrados conforme a sequência em que foram realizados de acordo com o seguinte esquema:

Resultados		
Reatividade vascular	Citometria de Fluxo	Western Blot
Efeito da LPC sobre a função vascular	Medida de NO	Efeito da atorvastatina sobre a fosforilação da nNOS
Efeito da atorvastatina sobre a função vascular	Medida de H ₂ O ₂	
Efeito da atorvastatina sobre a disfunção induzida pela LPC	Medida de O ₂ ⁻	

Tabela 1: Técnicas experimentais empregadas e o que foi desenvolvido através de cada técnica.

6.1 Reatividade vascular

Para facilitar a consulta dos valores de Emax dos resultados de reatividade vascular serão apresentados abaixo alguns dos valores divididos em duas tabelas, sendo a primeira com os valores de Emax dos tratamentos utilizados nos experimentos de relaxamento e a segunda contendo os valores de Emax dos resultados de contração vascular.

	Controle	LPC	LPC + Ator 1
ACh	95,62 ± 2,44%	57,80 ± 2,95%	85,57 ± 3,05%
ACh + L-NAME	0,09 ± 2,03%	0,60 ± 0,79%	0,11 ± 1,07%
ACh + TRIM	43,48 ± 3,31%	66,86 ± 2,67%	65,12 ± 3,19%
ACh + Catalase	46,22 ± 3,14%	60,50 ± 4,75%	64,05 ± 4,67%

Tabela 2: Valores de Emax dos resultados dos experimentos de relaxamento vascular.

	Controle	LPC	Ator 1	Ator 10
Fenil	4,34 ± 0,07 mN/mm	6,05 ± 0,08 mN/mm	3,84 ± 0,82 mN/mm	3,25 ± 0,83 mN/mm
Fenil + L-NAME	7,75 ± 0,17mN/mm	6,76 ± 0,14mN/mm	7,12 ± 0,70 mN/mm	6,70 ± 0,58 mN/mm
Fenil + TRIM	5,25 ± 0,13mN/mm	4,72 ± 0,14mN/mm	4,75 ± 1,00mN/mm	4,68 ± 0,64mN/mm
Fenil + Catalase	5,50 ± 0,11mN/mm	6,61 ± 0,08mN/mm	4,81 ± 0,60 mN/mm	4,95 ± 1,20 mN/mm

Tabela 3: Valores de Emax dos resultados dos experimentos de contração vascular.

6.1.1 Efeito do tratamento com LPC sobre a função vascular

Para avaliar o efeito da LPC sobre a função vascular e qual concentração seria utilizada, foram testadas três diferentes concentrações: 10, 30 e 50 μ M por um período de incubação de 30 minutos.

Curvas concentração-resposta de acetilcolina e fenilefrina foram construídas após 30 minutos de incubação com LPC. Observou-se que a LPC, nas três concentrações utilizadas, foi capaz de promover disfunção endotelial caracterizada por uma redução no relaxamento induzido pela ACh (Fig. 7A) e também aumento significativo na contração (Fig. 7B).

Como as 3 concentrações de LPC induziram o mesmo nível de redução na resposta à ACh (Fig. 7A), a concentração de 10 μ M foi escolhida para os demais experimentos. Além disso, esta concentração foi capaz de induzir aumento na resposta à fenilefrina (Fig. 7B). (**A:** Emax LPC 30 μ M= 68,07 \pm 5,02%. Emax LPC 50 μ M= 45,07 \pm 7,59%. **B:** Emax LPC 30 μ M= 7,17 \pm 0,09mN/mm. Emax LPC 50 μ M= 7,09 \pm 0,09mN/mm). Demais Emax vide Tabelas 2 e 3.

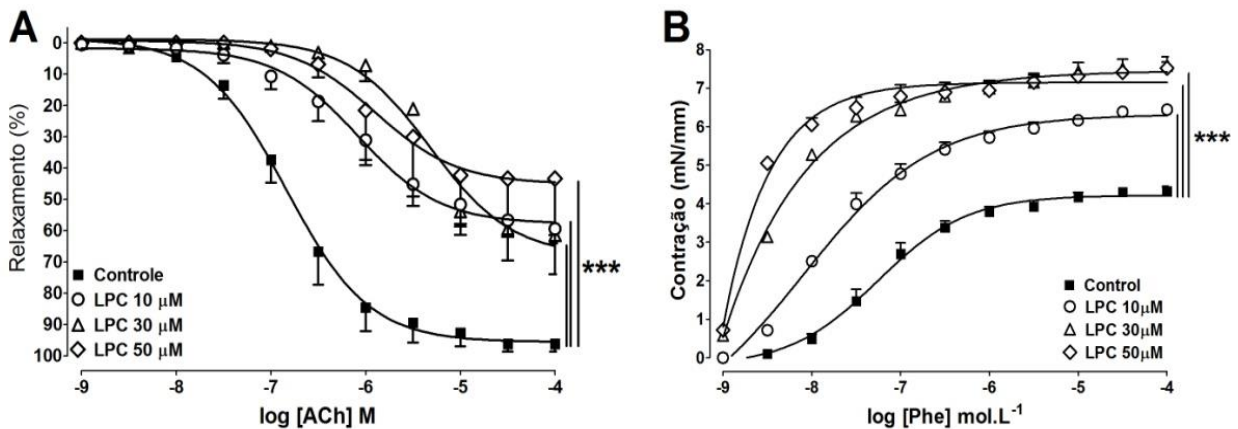


Figura 7: **A:** Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aorta de camundongo com endotélio funcional. Controle (n= 5), LPC 10 μ M (n= 4), LPC 30 μ M (n= 4), LPC 50 μ M (n= 4). **B:** Resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina no controle (n=6), LPC 10 μ M (n= 4), LPC 30 μ M (n= 4), LPC 50 μ M (n= 4). Two-way ANOVA. ***p<0,001.

Conforme demonstrado, a LPC na concentração de 10 μ M durante um período de incubação de 30 minutos foi capaz de promover disfunção endotelial, fato observado através da

redução na resposta relaxante e aumento na resposta contrátil. Para investigar se realmente esta resposta seria dependente de endotélio, curvas concentração-resposta de acetilcolina e fenilefrina foram construídas na ausência de endotélio funcional. Na ausência de endotélio, a LPC não foi capaz de reduzir o relaxamento (Fig. 8A), bem como de causar o aumento na contração vascular (Fig. 8B).

A inibição do relaxamento pela remoção do endotélio funcional foi significativamente maior nos vasos controle do que nos tratados com LPC (Fig. 8A). Este resultado indica um comprometimento da função endotelial na presença de LPC. Além disso, a remoção do endotélio aumenta a contração induzida por fenilefrina nos vasos controle, mas não nos vasos com LPC (Fig. 8B). (A: $E_{max} E^- = 9,81 \pm 1,56\%$. $E_{max} LPC E^- = 7,23 \pm 1,24\%$. B: $E_{max} E^- = 76,61 \pm 0,08$ mN/mm. $E_{max} LPC E^- = 3,54 \pm 0,08$ mN/mm). Demais E_{max} vide Tabelas 2 e 3.

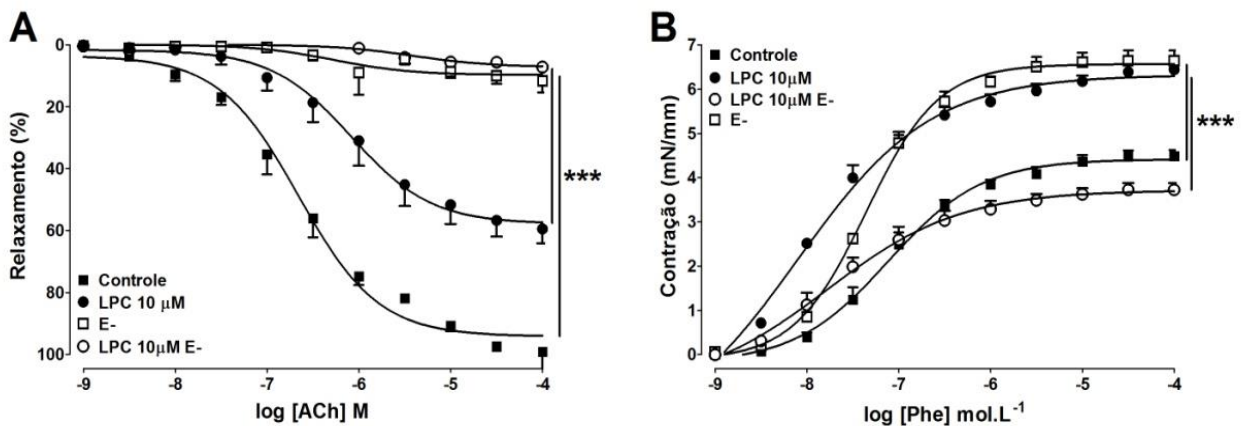


Figura 8: A: Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aorta de camundongo na presença (n= 5) e ausência de endotélio (n= 4); LPC 10μM na presença (n= 6) e na ausência de endotélio (n=4). B: Resposta contrátil induzida por fenilefrina na presença (n= 7) e ausência de endotélio (n= 4) e LPC na presença (n= 6) e ausência de endotélio (n= 5). Two-way ANOVA. ***p<0,001.

Conforme observado na figura anterior, a disfunção vascular induzida pela LPC é dependente do endotélio. Desta forma, fez-se necessário estabelecer se as NOS estariam envolvidas no processo de disfunção causado pela LPC. Curvas concentração-resposta de acetilcolina e fenilefrina foram construídas na ausência e presença de LPC e do inibidor não seletivo das NOS, L-NAME (300μM). Para valores de E_{max} , vide Tabelas 2 e 3.

O L-NAME aboliu o relaxamento nos vasos controle ou tratados com LPC (Fig.9A). Entretanto, a inibição do relaxamento provocada pelo L-NAME foi de maior magnitude no controle do que nos vasos tratados com LPC (Fig. 9A). Além disso, o L-NAME aumentou a contração induzida por Phe no controle, mas não alterou a contração nos vasos tratados com LPC (Fig. 9B). Estes dados sugerem que a LPC provoca disfunção endotelial por comprometer a atividade das NOS.

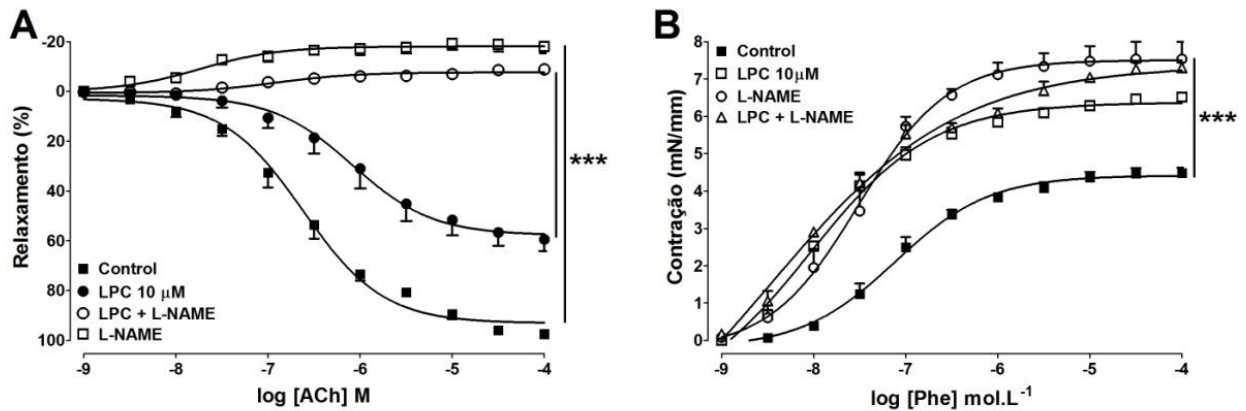


Figura 9: **A:** Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aorta de camundongo com endotélio funcional no controle (n= 5) e presença de LPC 10 μM (n= 4), LPC + L-NAME (n= 4), L-NAME (n= 4). **B:** Resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina no controle (n=6), LPC 10μM (n= 4), LPC +L-NAME (n= 4), L-NAME (n= 4). Two-way ANOVA. ***p<0,001.

Conforme observado, os resultados sugerem que o LPC desencadeia comprometimento da via das NOS. Para verificarmos se haveria efeito sobre a nNOS, curvas concentração-resposta foram construídas na presença do inibidor seletivo TRIM (100μM). Também com a enzima Catalase (24000UI), sabendo que esta degrada o H₂O₂, um dos produtos da nNOS.

O TRIM reduziu em aproximadamente 50% o relaxamento induzido pela ACh no controle, mas não alterou o relaxamento na presença da LPC (Fig. 10A). Contudo, a inibição da nNOS aumentou a contração no controle e reduziu a contração na presença da LPC (Fig. 10C). Como a literatura sugere que o H₂O₂ é um fator relaxante produzido pela nNOS, foi utilizada a enzima Catalase, que degrada o H₂O₂. Assim como o TRIM, a Catalase reduziu o relaxamento apenas no controle mas não nos vasos tratados com LPC (Fig. 10B). A Catalase não alterou a

resposta contrátil no controle mas reduziu a resposta nos vasos tratados com LPC (Fig. 10D). Para valores de E_{max} vide Tabelas 2 e 3.

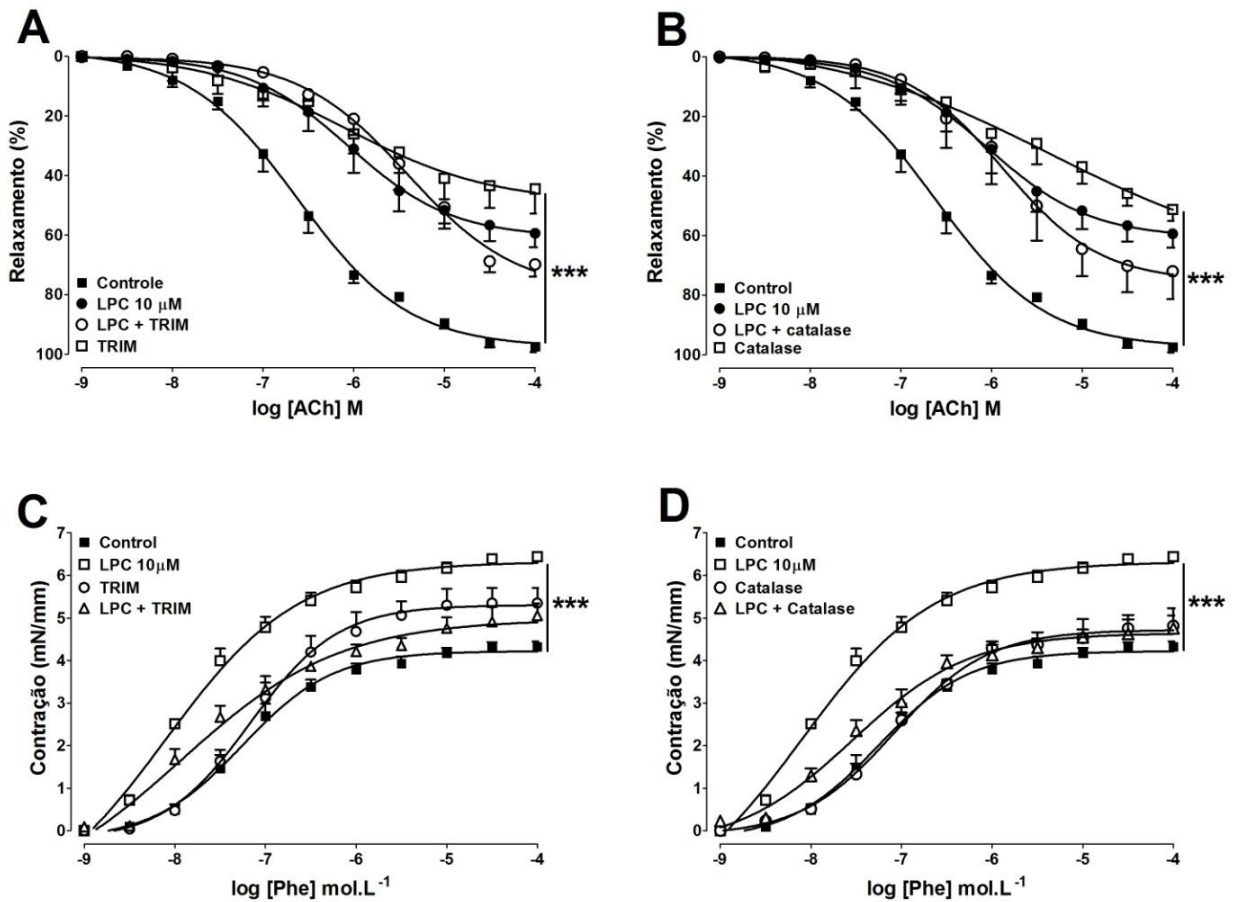


Figura 10: **A:** Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aorta de camundongo com endotélio funcional no controle (n= 5) e presença de LPC 10 μM (n= 5), LPC + L-TRIM (n= 4), TRIM (n= 4). **B:** LPC+ Catalase (n= 4), Catalase (n= 4). **C:** Resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina no controle (n=6), LPC 10μM (n= 4), LPC + TRIM (n= 4), TRIM (n= 4). **D:** LPC+ Catalase (n= 4), Catalase (n= 4). Two-way ANOVA. ***p<0,001.

Ainda a respeito do efeito da LPC sobre a resposta vascular, incubamos as preparações de aorta com L-arginina 10mM por 30 minutos na presença e ausência de LPC. Curvas concentração-resposta a fenilefrina e acetilcolina foram construídas. Os resultados mostram que a suplementação com L-arginina não altera a resposta relaxante ou contrátil no controle mas restaura completamente, a níveis de controle, a contração e o relaxamento nos vasos tratados com LPC (Fig. 11A e 11B). (**A:** E_{max} L-arginina= $3,82 \pm 0,11\%$. E_{max} L-arginina + LPC= $3,40 \pm$

0,07%. **B:** Emax L-arginina= 94,42 ± 4,69%. Emax L-arginina + LPC= 87,24 ± 2,45%). Para os demais valores de Emax, vide Tabelas 2 e 3.

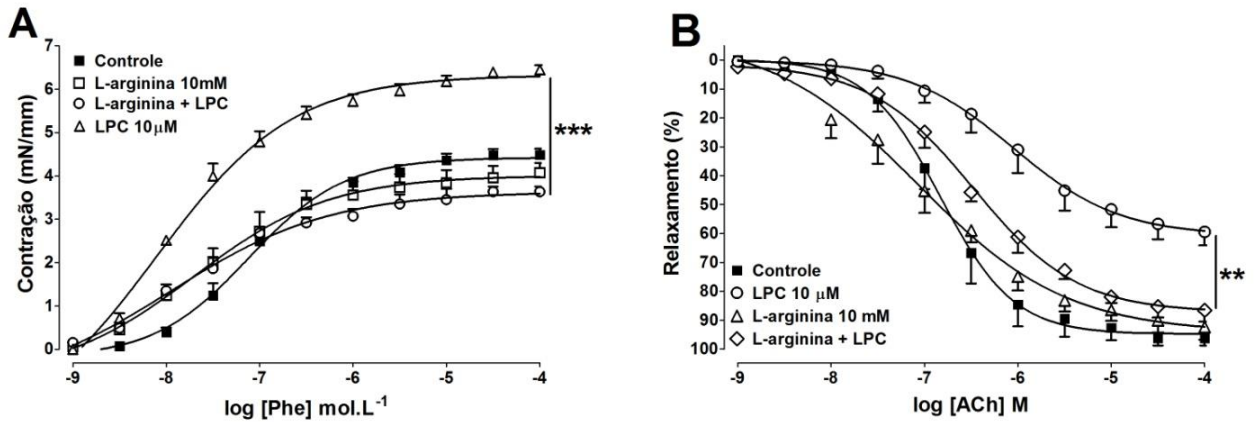


Figura 11: **A:** Resposta vasoconstrictora induzida por fenilefrina em aorta de camundongo com endotélio funcional no controle (n= 6) e presença de LPC 10 µM (n= 4), LPC + L-arginina (n= 4), L-arginina (n= 4). **B:** Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina no controle (n=5), LPC 10µM (n= 4), LPC +L-arginina (n= 4), L-arginina (n= 4). Two-way ANOVA. ** p<0,01. ***p<0,001.

Sumariando os resultados que temos até aqui, sabemos que:

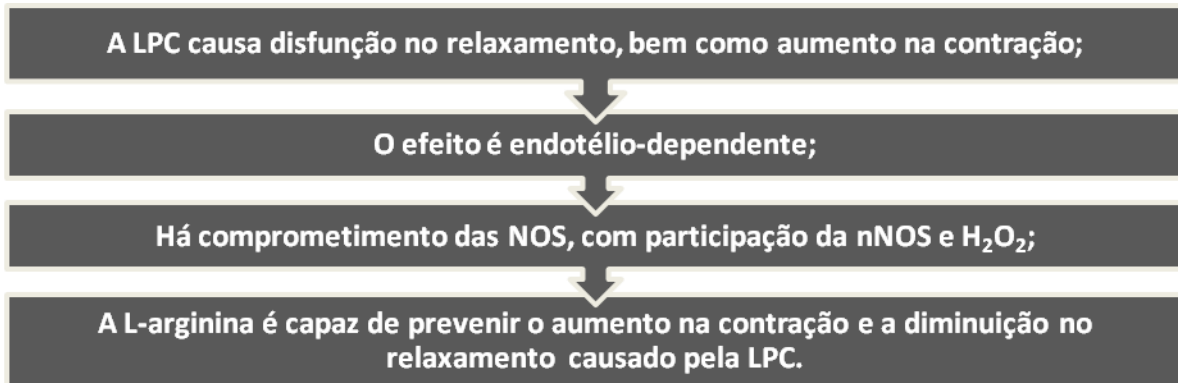


Figura 12: Esquema contendo o sumário dos resultados obtidos na primeira parte dos experimentos.

6.1.2 Efeito da incubação aguda com atorvastatina sobre a resposta vascular

Uma vez que os dados obtidos até agora apontaram para um efeito da atorvastatina modulando positivamente a via nNOS/H₂O₂, resolvemos investigar tais mecanismos em condições fisiológicas. Não há dados na literatura sobre o papel da atorvastatina no controle e tônus vascular por modulação da nNOS. Avaliou-se então o efeito da atorvastatina direto sobre o vaso, nas concentrações de 1 e 10 μM por 120 minutos. Os resultados de reatividade da figura abaixo demonstram o efeito da atorvastatina sobre o relaxamento induzido pela ACh. Conforme pode se observar, não houve alteração na resposta relaxante induzida por ACh na presença de Ator em qualquer uma das duas concentrações (Fig. 18). Para valores de E_{max} vide Tabela 2.

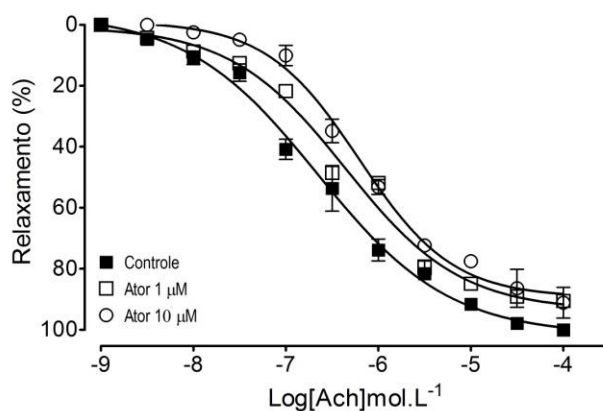


Figura 13: Resposta vasorrelaxante induzida por acetilcolina em aorta de camundongo contendo endotélio funcional na presença de atorvastatina 1 ou 10 μM (n=4) ou controle (n=7).

Contudo ao avaliarmos o efeito da atorvastatina sobre a contração, é possível observar uma redução na resposta contrátil induzida por fenilefrina (Phe) nas preparações com as duas concentrações de Ator utilizadas (Fig. 19). Para valores de E_{max} vide Tabela 3.

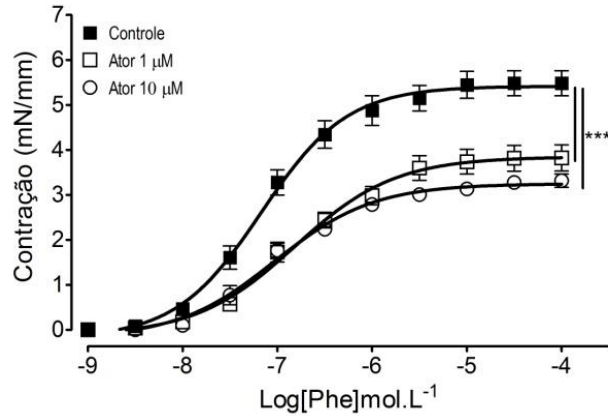


Figura 14: Resposta contrátil induzida por fenilefrina em aorta de camundongo contendo endotélio funcional no controle (n= 4) e presença de atorvastatina 1μM (n= 5) e 10 μM (n= 4). Two-way ANOVA. ***p<0,001.

Para observar se a resposta na redução da contração observada na presença de atorvastatina era dependente do endotélio, foram construídas curvas concentração-resposta de fenilefrina nas mesmas condições anteriores, contudo na ausência de endotélio funcional, e pôde-se observar que a atorvastatina teve seu efeito abolido pela remoção do endotélio, sugerindo que seu efeito seja endotélio-dependente (Fig. 20). (Emax Controle= 6,21 ± 1,09 mN/mm. Emax Ator 1μM= 6,28 ± 0,65 mN/mm. Emax Ator 10 μM= 6,10 ± 0,82 mN/mm).

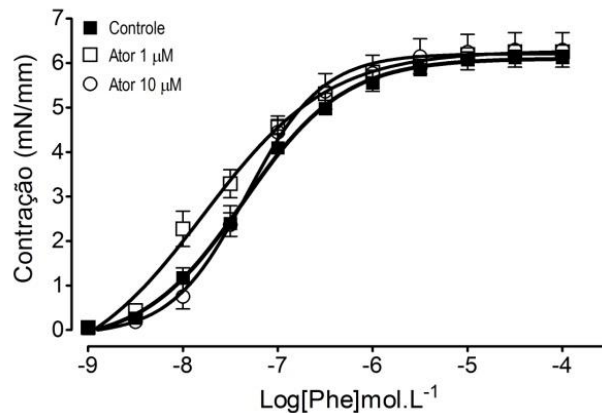


Figura 15: Resposta contrátil induzida por fenilefrina em aorta de camundongo sem endotélio funcional no controle (n= 5) e presença de atorvastatina 1 μM (n= 5) e 10 μM (n= 5).

Para avaliar a participação das NOS sobre a redução da contração mediada pela atorvastatina demonstrado nas preparações contendo endotélio funcional, curvas concentração-resposta foram construídas na presença de L-NAME (300 μ M). O L-NAME iguala os níveis de contração nos vasos tratados ou não com atorvastatina. Contudo, o aumento da contração nos vasos incubados com atorvastatina é maior que o aumento no controle. Estes dados sugerem que a redução da contração induzida pela atorvastatina se dá por ativação da NOS (Fig. 21 A e 21 B). Para valores de Emax vide Tabela 3.

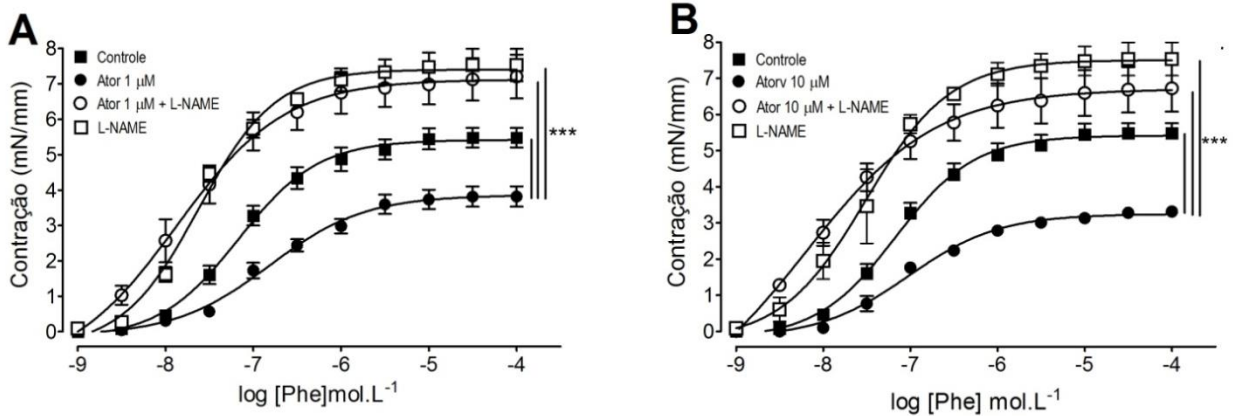


Figura 16: Resposta contrátil induzida por fenilefrina em aorta de camundongo com endotélio funcional no controle (n= 4) e presença de **A:** atorvastatina 1 μ M (n= 5) L-NAME 300 μ M (n=4) e atorvastatina 1 μ M + L-NAME 300 μ M (n= 4). **B:** atorvastatina 10 μ M (n= 4) L-NAME 300 μ M (n=4) e atorvastatina 1 μ M + L-NAME 300 μ M (n= 4). Two-way ANOVA. ***p<0,001.

Para investigar se a nNOS estaria envolvida na redução da resposta contrátil à fenilefrina induzida pela atorvastatina foi utilizado TRIM (100 μ M). Comparando os resultados na presença e ausência de atorvastatina, foi observado que há participação da nNOS no efeito causado pelo uso da atorvastatina, visto que o inibidor foi capaz de abolir o efeito de redução na contração causado pela atorvastatina (Fig. 22). Para valores de Emax vide Tabela 3.

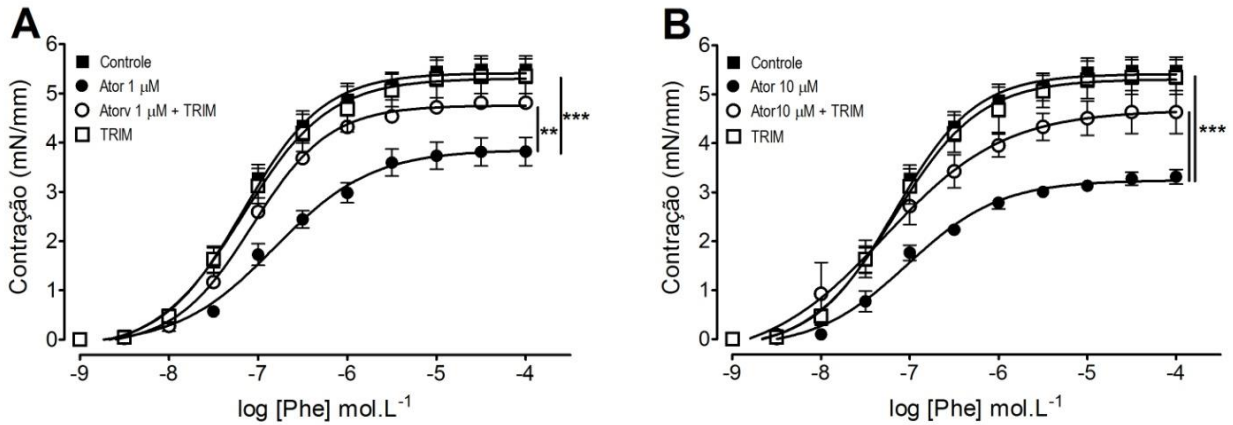


Figura 17: Resposta contrátil induzida por fenilefrina em aorta de camundongo com endotélio funcional no controle (n= 4) e presença de A: atorvastatina 1μM (n= 6). TRIM 100μM (n=4) e atorvastatina 1μM + TRIM 100μM (n= 5). B: atorvastatina 10μM (n= 4). TRIM 100μM (n=4) e atorvastatina 1μM + TRIM 100μM (n= 4). Two-way ANOVA. ***p<0,001; *p<0,01.

Para confirmar a participação da nNOS foi ainda utilizada a enzima Catalase (2400U/mL), responsável pela degradação do H₂O₂, outro subproduto desta isoforma. É possível observar que a enzima foi capaz de abolir o efeito de redução na contração ocasionado pelo tratamento com atorvastatina, sendo mais pronunciado o efeito quando utilizada a concentração de 10 μM (Fig. 23). Para valores de E_{max} vide Tabela 3.

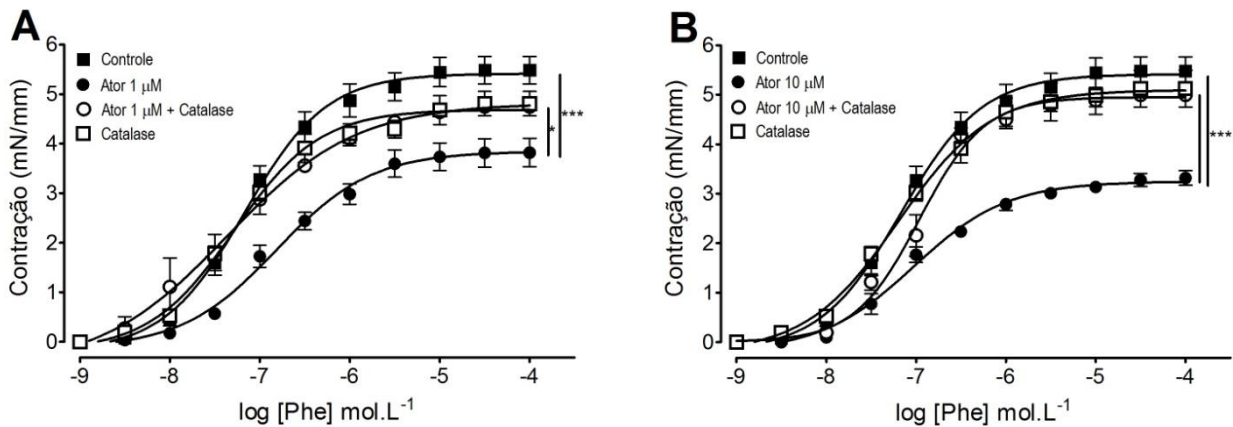


Figura 18: Resposta contrátil induzida por fenilefrina em aorta de camundongo com endotélio funcional no controle (n= 4) e presença de A: atorvastatina 1 μ M (n= 6). Catalase (n=4) e atorvastatina 1 μ M + Catalase (n= 5). B: atorvastatina 10 μ M (n= 4). Catalase 100 μ M (n=4) e atorvastatina 1 μ M + Catalase (n= 4). Two-way ANOVA. ***p<0,001; *p<0,05.

Assim, sumariando os resultados obtidos com uso da atorvastatina sobre preparações de aorta sem qualquer outro estímulo, temos:



Figura 19: Esquema contendo o sumário dos resultados obtidos na terceira parte dos experimentos.

6.1.3 Efeito do tratamento com atorvastatina sobre a disfunção vascular causada pela LPC

A fim de verificar se o tratamento com atorvastatina preveniria a disfunção endotelial causada pela LPC, foram construídas curvas concentração-resposta de acetilcolina na presença de atorvastatina 1 (Fig. 13A) e 10 μM (Fig. 13B). Foi demonstrado que as duas concentrações utilizadas são capazes de prevenir a disfunção causada por LPC, restaurando o relaxamento a níveis de controle. (**A:** $E_{\text{max}} \text{ Ator } 1\mu\text{M} = 93,73 \pm 0,69\%$. **B:** $E_{\text{max}} \text{ Ator } 10\mu\text{M} = 89,38 \pm 0,86\%$. $E_{\text{max}} \text{ LPC} + \text{Ator } 10\mu\text{M} = 86,71 \pm 3,15\%$). Para demais valores de E_{max} vide Tabela 2.

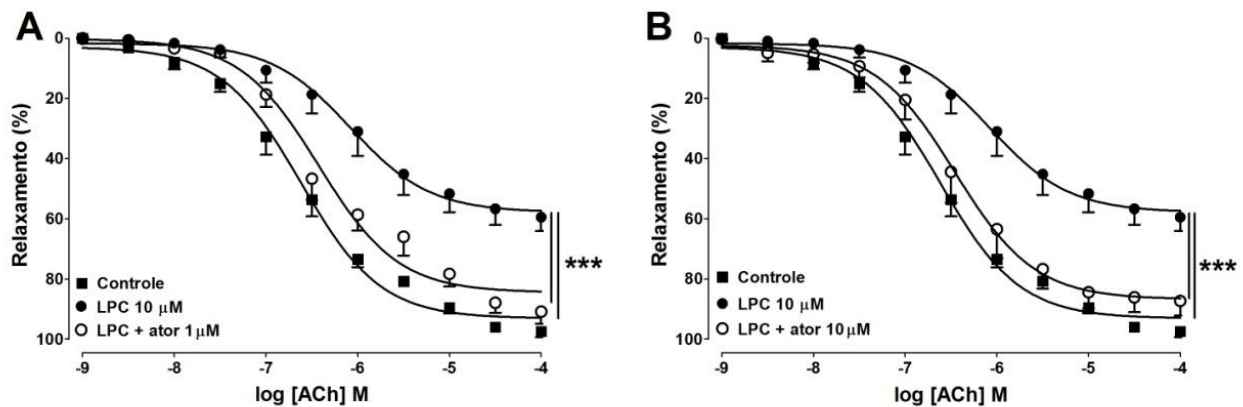


Figura 20: Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aorta de camundongo com endotélio funcional no controle ($n = 6$) e presença de LPC 10 μM ($n = 6$), **A:** LPC + ator 1 μM ($n = 6$), **B:** LPC + ator 10 μM ($n = 7$). Two-way ANOVA. *** $p < 0,001$.

Como ambas as concentrações de atorvastatina foram capazes de prevenir a disfunção endotelial causada pela LPC de modo semelhante, estabeleceu-se que a concentração a ser utilizada para os experimentos seguintes seria a de 1 μM . Assim, foi construída curva concentração-resposta de fenilefrina na presença de atorvastatina 1 μM . A atorvastatina reverte parcialmente o aumento de contração induzido pela LPC (Fig. 14). ($E_{\text{max}} \text{ LPC} + \text{Ator } 1 = 4,98 \pm 0,12 \text{ mN/mm}$). Para demais valores de E_{max} vide Tabela 3.

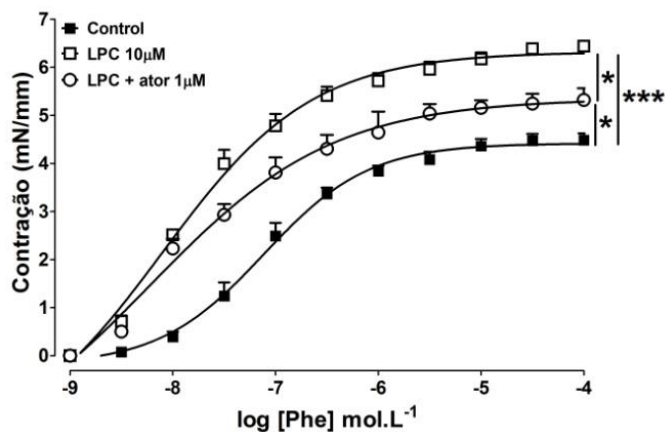


Figura 21: Resposta contrátil induzida por fenilefrina em aorta de camundongo contendo endotélio funcional no controle (n= 4), presença de LPC 10µM (n= 5) e LPC + atorvastatina1µM (n= 4). Two-way ANOVA. ***p<0,001, *p<0,05.

Para investigar os mecanismos envolvidos no efeito da atorvastatina sobre a disfunção endotelial causada pela LPC, foi utilizado L-NAME, sendo observado que o efeito da atorvastatina sobre o relaxamento é abolido na presença do inibidor (Fig. 15). Para valores de Emax vide Tabela 2.

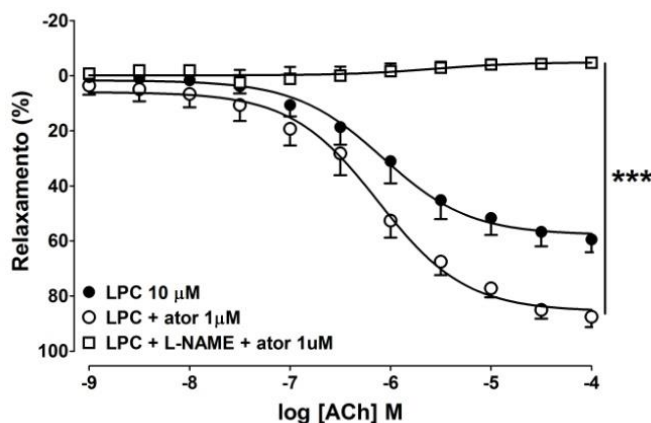


Figura 22: Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aorta de camundongo com endotélio funcional na presença de LPC 10 µM (n= 5), LPC + ator 1µM (n= 5), LPC + L-NAME + ator 1µM (n= 4). Two-way ANOVA. ***p<0,001.

A fim de investigar a participação da nNOS na resposta mediada por atorvastatina, curvas foram construídas na presença de TRIM (Fig. 16A) e Catalase (Fig. 16B). Os achados sugerem a participação da nNOS no efeito da atorvastatina sobre o relaxamento vascular na presença de LPC, visto que tal efeito foi abolido na presença dos inibidor e enzima utilizados. Para valores de Emax vide Tabela 2.

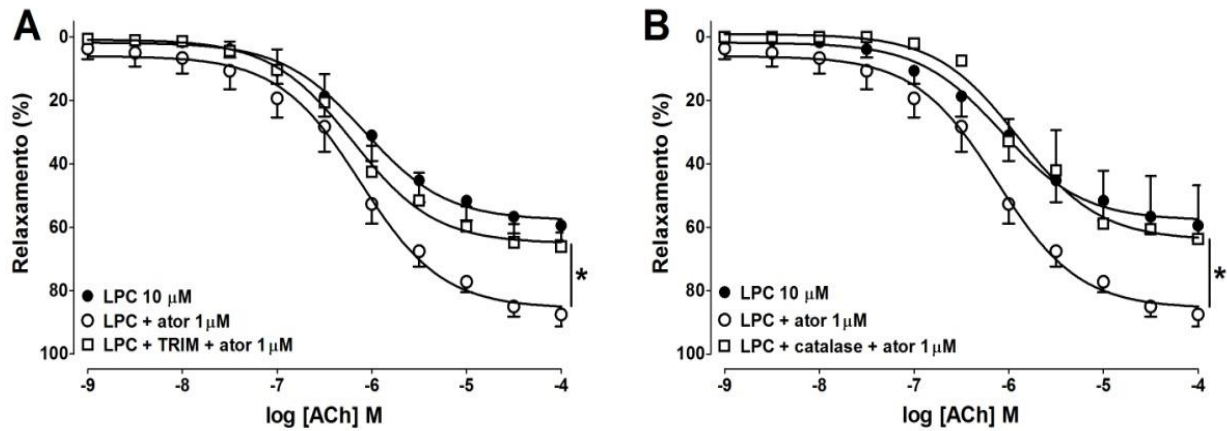


Figura 23: Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em aorta de camundongo com endotélio funcional na presença de LPC 10 μM (n= 5), LPC + ator 1μM (n= 5). A: LPC + TRIM + ator 1μM (n= 4). B: LPC + Catalase + ator 1μM (n= 4). Two-way ANOVA. ***p<0,001.

Sumariando os resultados desta segunda parte dos experimentos de reatividade vascular, temos que:

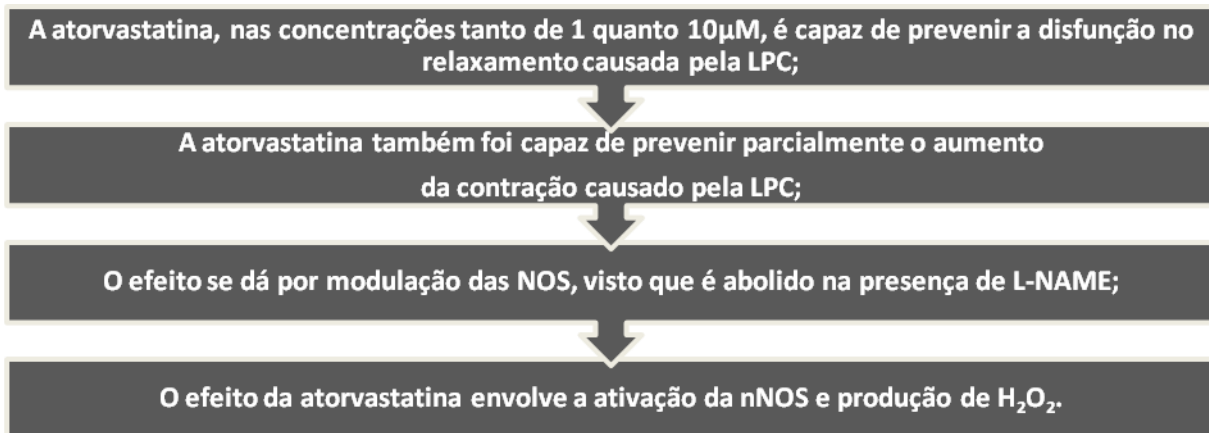


Figura 24: Esquema contendo o sumário dos resultados obtidos na segunda parte dos experimentos de reatividade vascular.

6.2 Medidas de NO, H₂O₂ e O₂⁻

Além dos resultados de reatividade vascular demonstrados, foram avaliadas também a produção de NO, H₂O₂ e radicais superóxido em células endoteliais por citometria de fluxo, a fim de avaliar se haveria uma redução ou aumento destes produtos derivados das NOS através dos tratamentos com atorvastatina e LPC.

Na sequência serão demonstrados os resultados obtidos com a marcação para NO, H₂O₂ e radicais superóxido.

6.2.1 Produção de NO

Para avaliar a produção de NO pelas células endoteliais, foi utilizada a sonda DAF-FM nos experimentos de citometria de fluxo. A medida de NO foi realizada em situação controle e tratamento com LPC. A inibição não seletiva das NOS (L-NAME) ou da nNOS (TRIM) reduz a produção de NO estimulada pela ACh no controle. O tratamento com LPC reduz significativamente a produção basal ou estimulada de NO (Fig. 25).

O L-NAME e o TRIM não alteram a produção de NO nas células tratadas com LPC, provavelmente por causa da já reduzida produção de NO nessa situação.

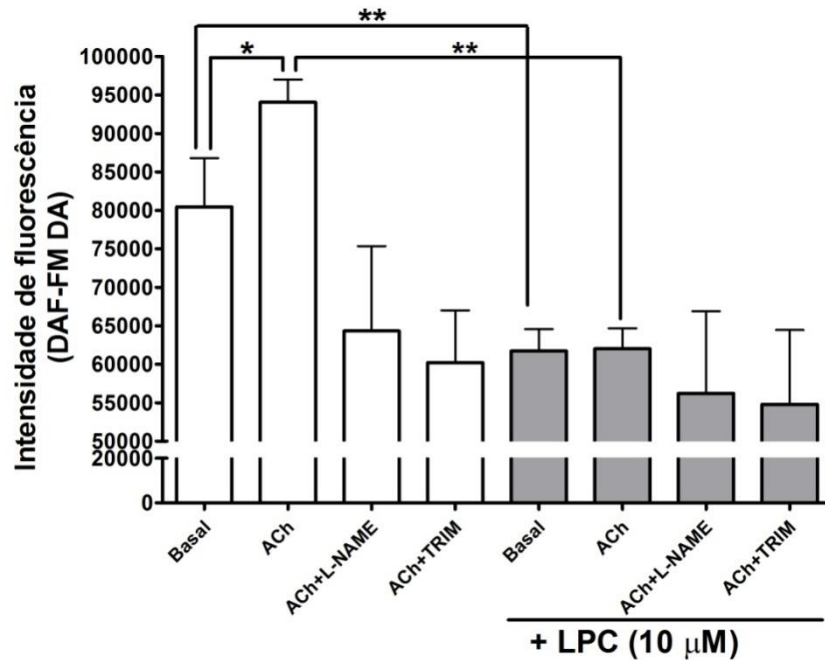


Figura 25: Produção de óxido nítrico por células endoteliais no basal, basal com LPC, tratamento com ACh com e sem inibidores, e todos na presença de LPC. Análise de fluorescência média \pm EPM. (n=15000 eventos). *p<0,05. **p<0,01.

Contudo, ao avaliarmos a participação da atorvastatina nas concentrações de 1 e 10 μ M, observamos que ambas levam a um aumento na produção de NO Basal a qual foi reduzida pelo L-NAME e TRIM (Fig. 26 e 27). Também se observa aumento na produção de NO no tratamento com atorvastatina mesmo na presença de LPC, sendo abolido na presença dos inibidores, conforme vemos nos dois gráficos, que serão divididos em tratamento com atorvastatina 1 μ M (Fig. 26) e tratadas com atorvastatina 10 μ M (Fig. 27).

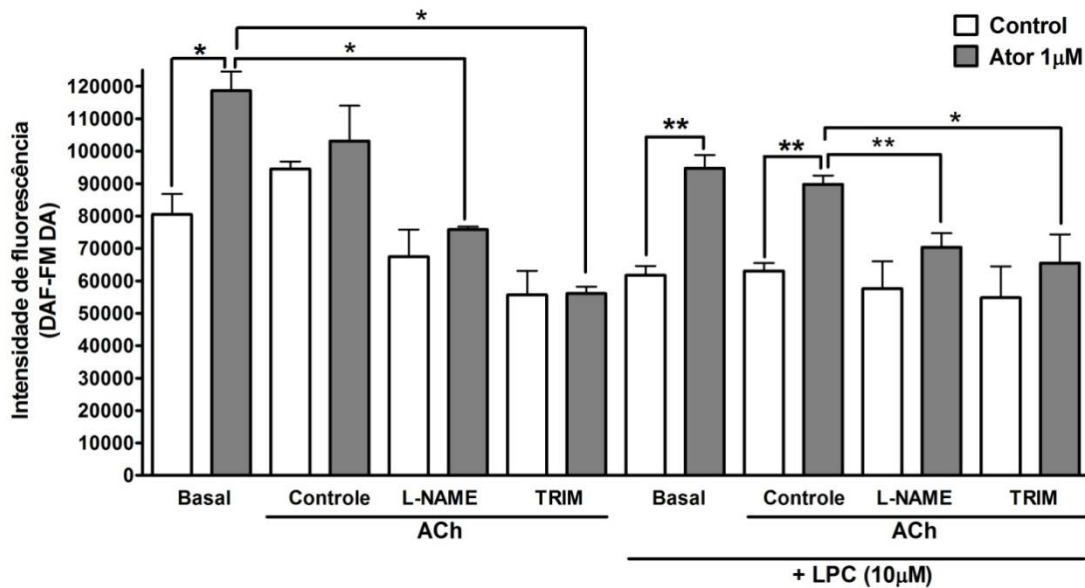


Figura 26: Produção de óxido nítrico por células endoteliais no Basal, tratadas com atorvastatina 1µM, na presença de acetilcolina no controle e com inibidores, na ausência e presença de LPC. Análise de fluorescência média ±EPM. (n=15000 eventos). *p<0,05. **p<0,01.

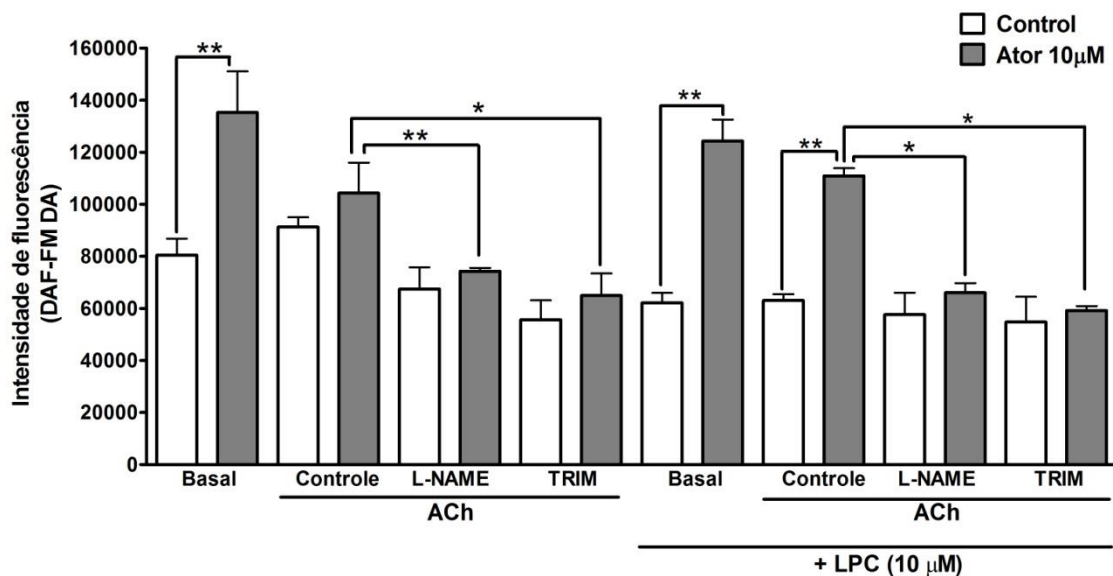


Figura 27: Produção de óxido nítrico por células endoteliais no Basal, tratadas com atorvastatina 10µM, na presença de acetilcolina no Controle e com inibidores, na ausência e presença de LPC. Análise de fluorescência média ±EPM. (n=15000 eventos). *p<0,05. **p<0,01.

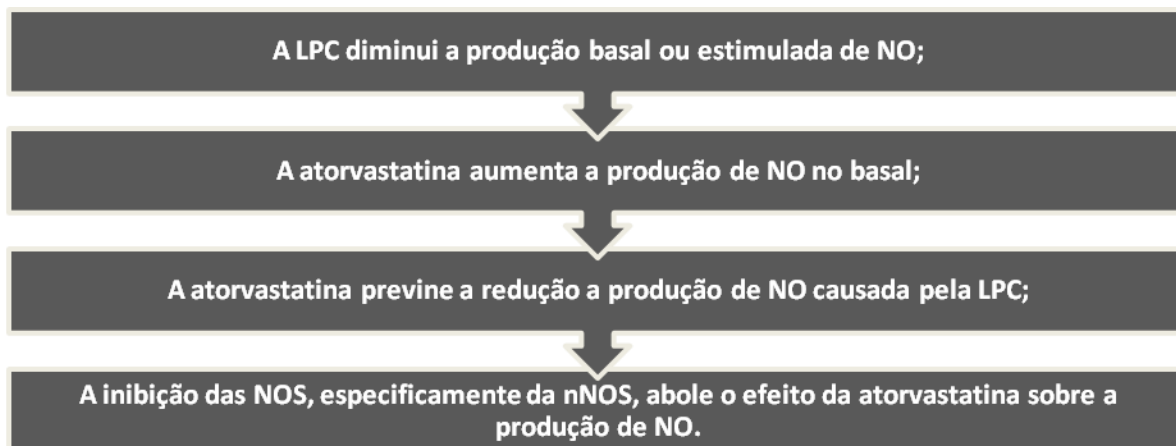


Figura 28: Esquema contendo o sumário dos resultados obtidos na primeira parte dos experimentos de citometria de fluxo.

6.2.2 Produção de H₂O₂

Seguindo o propósito deste trabalho, o próximo passo foi investigar a participação da nNOS sobre a disfunção causada pela LPC, bem como no tratamento com atorvastatina. Assim, foi investigada a produção do H₂O₂ (Fig. 29, 30 e 31).

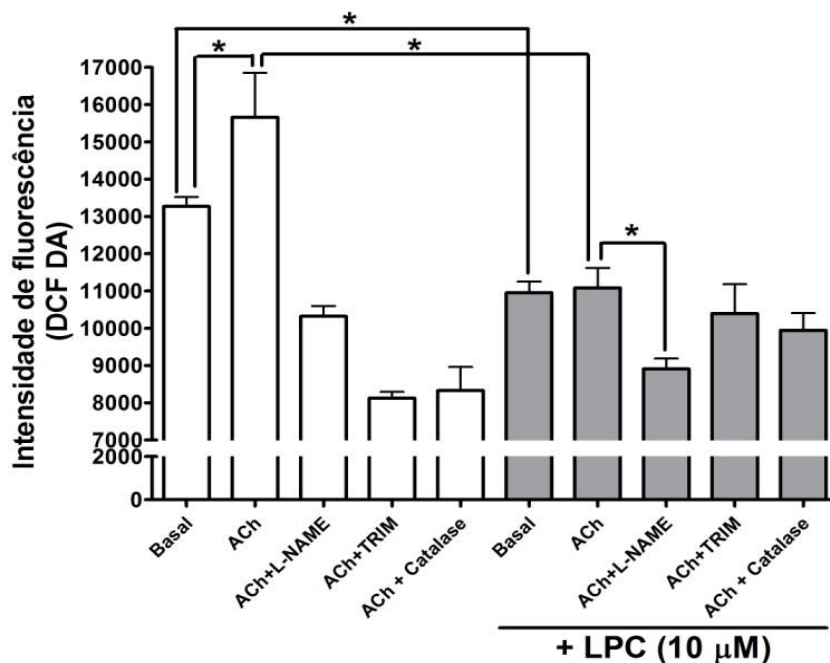


Figura 29: Resposta de citometria de fluxo demonstrando produção de H₂O₂ por células endoteliais no controle e tratadas com LPC, na presença e ausência dos inibidores e catalase. Análise de fluorescência média \pm EPM. (n=15000 eventos). *p<0,05.

Na situação controle, a ACh induz aumento na produção do H₂O₂, o qual é reduzida pelo L-NAME, TRIM e Catalase (Fig. 29). O tratamento com a LPC reduz a produção basal e estimulada de H₂O₂ (Fig. 29). O tratamento com atorvastatina aumenta a produção basal de H₂O₂ mas não potencializa a produção de H₂O₂ induzida pela ACh na situação controle (Fig. 30 e 31). Contudo, a atorvastatina aumenta a produção basal e estimulada de H₂O₂ nas células tratadas com LPC (Fig. 30 e 31). L-NAME, TRIM e Catalase reduzem a produção de H₂O₂ na presença ou ausência de atorvastatina ou LPC. Estes dados sugerem que a restauração da função endotelial promovida pela atorvastatina se deve, pelo menos em parte, por um aumento na produção de H₂O₂ pela nNOS.

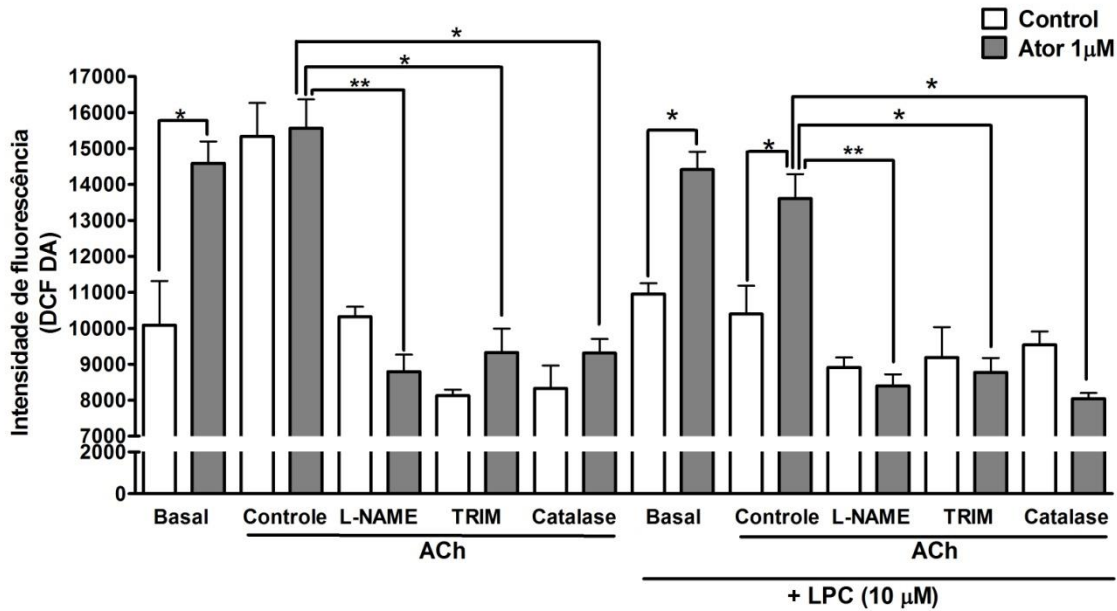


Figura 30: Resposta de citometria de fluxo demonstrando produção de H_2O_2 por células endoteliais no controle e tratadas com LPC. Tratamento com atorvastatina $1\mu M$ na presença e ausência de LPC também pode ser observado, bem como na presença dos inibidores L-NAME, TRIM e Catalase. Análise de fluorescência média \pm EPM. (n=15000 eventos). * $p<0,05$. ** $p<0,01$.

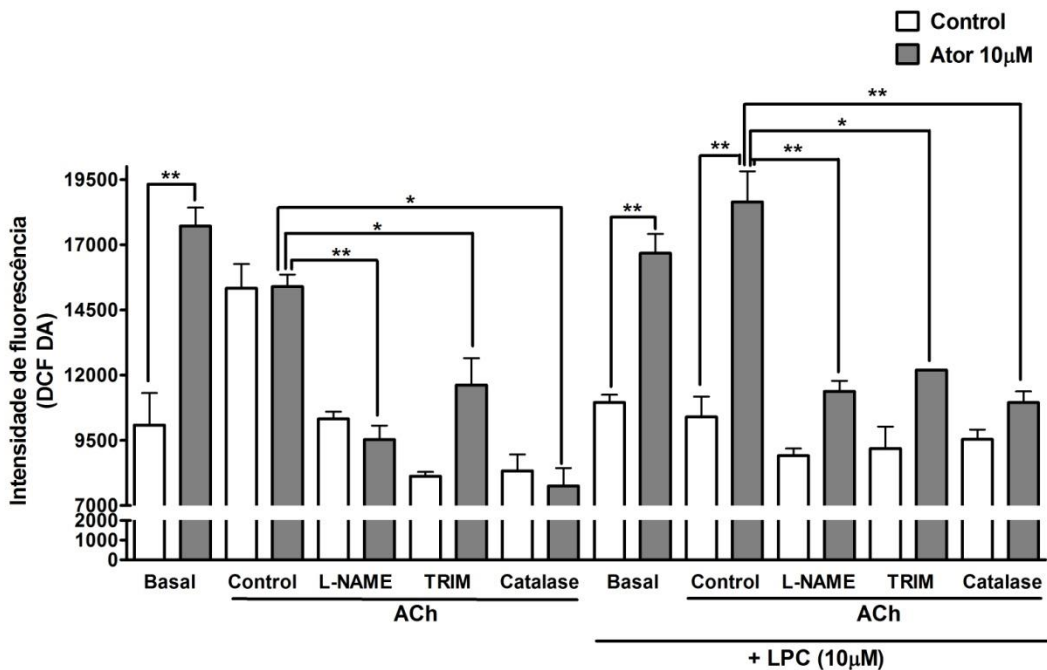


Figura 31: Resposta de citometria de fluxo demonstrando produção de H_2O_2 por células endoteliais no controle e tratadas com LPC. Tratamento com atorvastatina $10\mu M$ na presença e ausência de LPC também pode ser observado, bem como com os inibidores L-NAME, TRIM e Catalase. Análise de fluorescência média \pm EPM. (n=15000 eventos). * $p<0,05$. ** $p<0,01$.

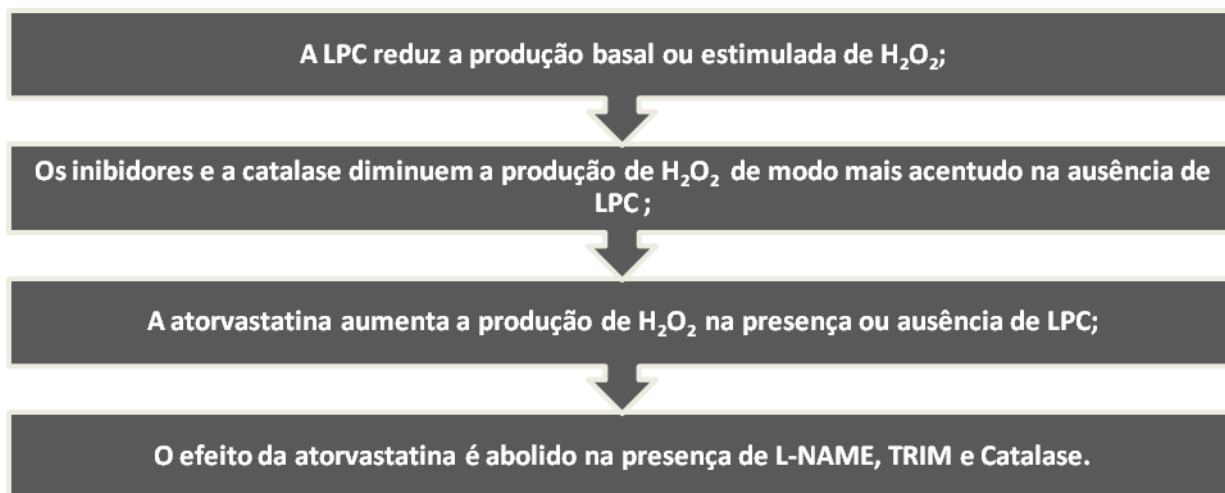


Figura 32: Esquema contendo o sumário dos resultados obtidos na segunda parte dos experimentos de citometria de fluxo.

6.2.3 Produção de superóxido

Tendo em vista investigar qual seria o papel da LPC sobre o aumento da resposta contrátil, foi também avaliada a produção de radicais superóxido através da marcação com sonda DHE, demonstrada nos gráficos que se seguem, sendo o primeiro contendo resultados com atorvastatina na concentração de 1 μ M (Fig. 33) e o segundo na concentração de 10 μ M (Fig. 34). Os dados sugerem que a LPC aumenta a produção basal de O₂⁻, o que é revertido apenas pela atorvastatina na concentração de 10 μ M (Fig. 34). Em condições basais a atorvastatina na concentração de 1 μ M não é capaz de reduzir a produção de O₂⁻. Os dados apontam para um ligeiro aumento na produção de O₂⁻ após tratamento com 1 μ M de atorvastatina em situação controle (Fig. 33)

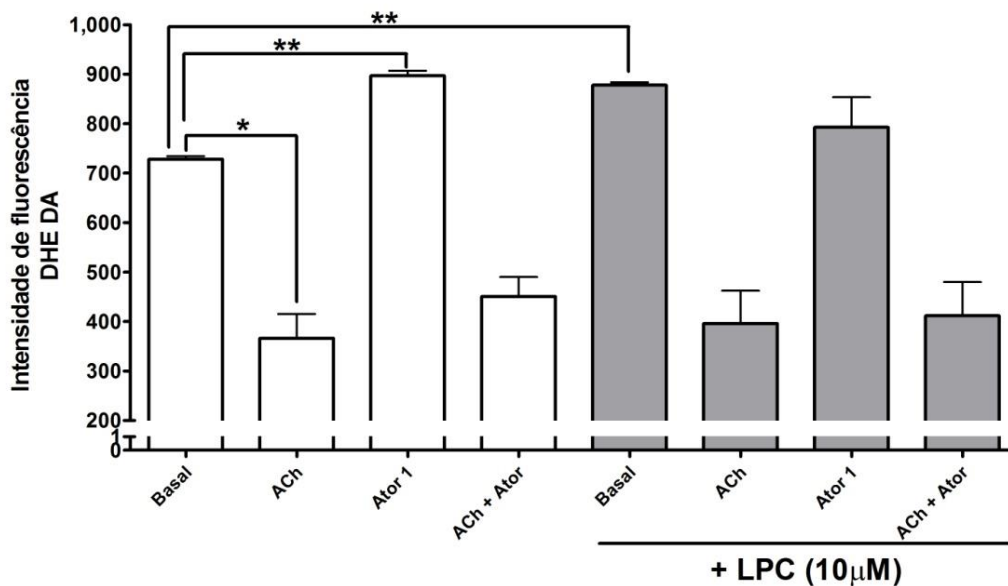


Figura 33: Resposta de citometria de fluxo demonstrando produção de radicais superóxido por células endoteliais no controle e tratadas com LPC. Tratamento com atorvastatina 1 μ M na presença e ausência de LPC. Análise de fluorescência média \pm EPM. (n=15000 eventos). *p<0,05. **p<0,01.

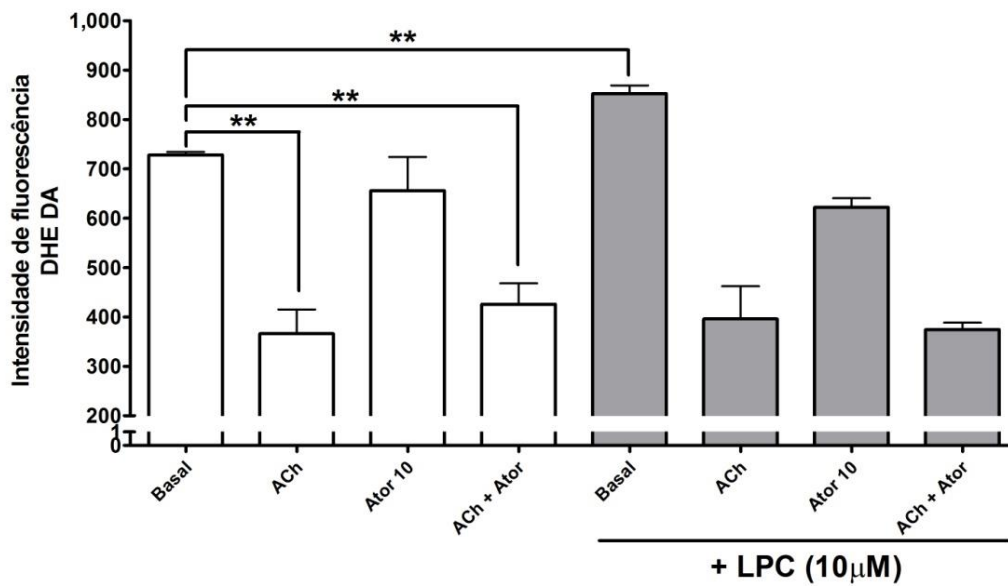


Figura 34: Resposta de citometria de fluxo demonstrando produção de radicais superóxido por células endoteliais no controle e tratadas com LPC. Tratamento com atorvastatina 10µM na presença e ausência de LPC. Análise de fluorescência média ±EPM. (n=15000 eventos).**p<0,01.

Sendo assim, podemos resumir os principais achados nos resultados envolvendo radicais superóxido no seguinte esquema:

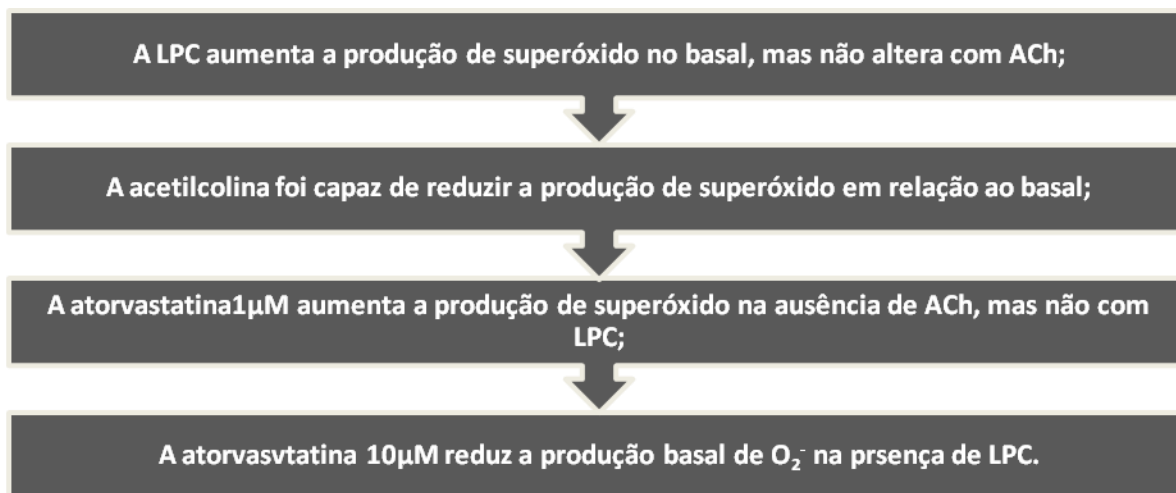


Figura 35: Esquema contendo o sumário dos resultados obtidos na terceira parte dos experimentos de citometria de fluxo

6.3 Western blot

A fim de avaliar se o efeito da LPC, da atorvastatina ou de ambos poderia alterar o nível de fosforilação da nNOS em seu sítio de inativação (Ser852), foram realizados experimentos de Western blot e marcação para enzima total e fosforilada em Ser852, usando os mesmos tratamentos previamente demonstrados nos outros experimentos em células endoteliais seguindo o mesmo protocolo já descrito.

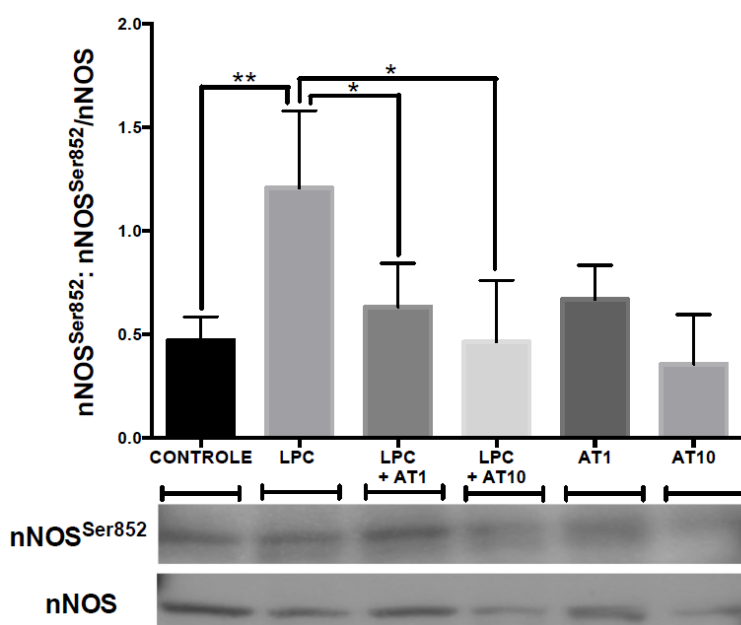


Figura 36: Expressão proteica da nNOS fosforilada em Ser852 por células endoteliais EA.hy926 no controle e tratadas com LPC 10 μ M (30min) na presença e ausência de atorvastatina 1 μ M e 10 μ M (120min). Gráfico representativo da expressão de nNOS fosforilada normalizada pelo conteúdo de nNOS total. (n=4). Valores apresentados como média \pm EPM. *p<0,05. **p<0,01.

Os resultados sugerem que o estímulo com ACh (10 μ M por 30min - controle) reduz a fosforilação em nNOS^{Ser852}, sugerindo aumento de atividade da nNOS (Fig. 36). Contudo, pôde-se observar que a incubação com a LPC aumentou significativamente o nível de fosforilação, sugerindo inibição da nNOS (Fig. 36). Tal efeito foi revertido pelo tratamento com atorvastatina nas duas concentrações utilizadas. O tratamento somente com atorvastatina não alterou significativamente os níveis de fosforilação em Ser852.

Como forma de se garantir a homogeneidade dos resultados, foram avaliadas as expressões da nNOS total e o normalizador endógeno GAPDH (Fig. 37). Os dados mostram não haver diferença de expressão da nNOS após os tratamentos utilizados (Fig. 37).

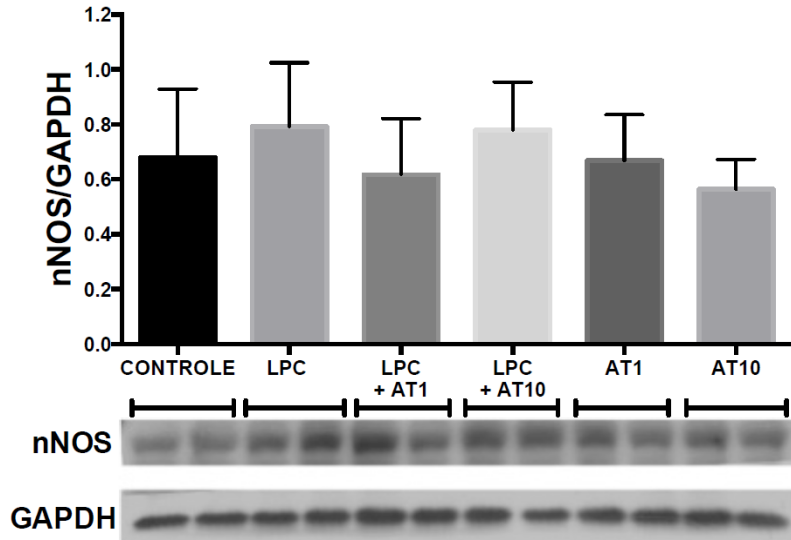


Figura 37: Expressão proteica da nNOS por células endoteliais EA.hy926 no controle e tratadas com LPC 10 μ M (30min) na presença e ausência de atorvastatina 1 μ M e 10 μ M (120min). Gráfico representativo da expressão de nNOS normalizada pelo conteúdo de GAPDH. (n=4). Valores apresentados como média \pm EPM.



Figura 38: Esquema contendo o sumário dos resultados obtidos com experimentos de western blot.

DISCUSSÃO

7 Discussão

O presente trabalho apresenta três aspectos inovadores principais: 1) demonstra que a disfunção endotelial induzida agudamente pela LPC envolve inicialmente uma disfunção da via nNOS/H₂O₂; 2) demonstra que o tratamento in vitro com a atorvastatina é capaz de prevenir tal disfunção por modulação positiva da via nNOS/H₂O₂; 3) sugere que, independentemente da presença da disfunção endotelial, a atorvastatina reduz o tônus vascular por ativar a nNOS e, conseqüentemente, a produção de NO e H₂O₂.

7.1 A LPC como fator causal da disfunção endotelial

A aterosclerose é um processo que se inicia na infância, progride silenciosamente por um estágio pré-clínico e eventualmente se manifesta clinicamente na idade adulta. Pelos últimos 30 anos tem se tornado claro que o início e progressão da doença depende de mudanças na biologia vascular (Herrera, Mingorance et al. 2010). O endotélio se tornou a peça chave na manutenção e regulação da homeostase vascular, não apenas servindo como barreira, mas atuando como um transdutor ativo de sinais capazes de mudar o fenótipo da parede vascular. Alterações na função endotelial precedem o desenvolvimento de mudanças que contribuem para o desenvolvimento da lesão aterosclerótica e suas complicações clínicas (Vanhoutte 1997).

Sabendo que a LPC desempenha um importante papel na aterosclerose por alterar a função da célula endotelial, este estudo teve como um de seus objetivos, demonstrar o impacto do tratamento agudo com LPC sobre anéis de aorta torácica de camundongos e células endoteliais humanas. Além disso, o estudo objetivou caracterizar a participação da nNOS na disfunção endotelial induzida pela LPC. Para indução da disfunção endotelial, os anéis de aorta ou as células endoteliais foram tratados com 10µM de LPC, sendo que, sob condições fisiológicas, é encontrada uma concentração aproximada de 25µM de LPC no plasma humano. Assim, a concentração de LPC utilizada neste estudo está abaixo das condições patofisiológicas (1,2mM) descritas na literatura (Ojala, Hirvonen et al. 2007). Existem estudos demonstrando que a concentração de 10µM não foi tóxica para cultura de células endoteliais ou anéis de aorta (Rao, Riederer et al. 2013), conforme também observados nos nossos experimentos.

Considerando o curto tempo de exposição da aorta ou das células endoteliais à LPC (30 minutos), foi descartada a participação da enzima ciclooxigenase 2 (COX2), visto que estudos demonstraram que a ativação desta enzima nas células endoteliais apenas ocorreria com períodos maiores de incubação com LPC, sendo superiores a 3 horas (Brkic, Riederer et al. 2012). Embora o acúmulo do inibidor endógeno da eNOS, ADMA, tenha sido observado em células endoteliais expostas a LPC por 24 horas (Jia, Jiang et al. 2006), é pouco provável que em nosso modelo de exposição com LPC por 30 minutos seja suficiente para permitir aumento significativo de ADMA.

Já foi demonstrado que um pequeno tempo de incubação com LPC resulta em significativo aumento dos níveis de LPC nas células endoteliais, havendo uma rápida incorporação da mesma pela membrana plasmática (Stoll, Oskarsson et al. 1992; Croset, Brossard et al. 2000; Riederer, Kofeler et al. 2012). Estes dados sugerem que o endotélio pode facilitar a captação de LPC circulante, podendo interagir com as enzimas formadoras de NO, mudando sua integridade estrutural e funcional e, assim, diminuindo a formação de NO. Como este processo parece ocorrer de forma rápida, podemos sugerir que o mesmo esteja ocorrendo em nossos experimentos envolvendo tanto as preparações de aorta quanto as células endoteliais isoladas. Desta forma, a incorporação de LPC pela membrana endotelial poderia alterar a fluidez da membrana e a regulação da atividade das enzimas ligadas à mesma como as NOS, por exemplo.

Alguns estudos demonstraram uma diminuição na expressão de eNOS, com conseqüente redução na biodisponibilidade de NO após exposição à LPC. Contudo, o tempo de exposição empregado à LPC em tais estudos foi maior, havendo estudos demonstrando tratamento variando de 2 horas (Choi, Park et al. 2010) até 24 horas (Tardivel, Gousset-Dupont et al. 2009). Entretanto, ao tratar as células com LPC por um período de 15 minutos, Kozina e colaboradores não observaram nenhuma alteração na expressão proteica da eNOS (Kozina, Opresnik et al. 2014). De modo semelhante, ao avaliarmos a expressão proteica da nNOS por Western blot, observamos que 30 minutos de incubação com LPC não foram suficientes para alterar a expressão da mesma.

Durante os experimentos de reatividade vascular, após a incubação das preparações de aorta com LPC e realização de curvas-concentração resposta à fenilefrina ou acetilcolina,

verificamos que, ao lavar as preparações com solução nutritora de Krebs, o relaxamento derivado do endotélio não foi prejudicado. Este fato também foi verificado em um estudo no qual a utilização de 30 μ M LPC não alterou o relaxamento derivado do endotélio após sucessivas lavagens (Cowan and Steffen 1995).

Foi demonstrado através dos nossos resultados que a LPC é capaz de promover significativa redução do relaxamento vascular mediado por acetilcolina, bem como aumento da contração mediada por fenilefrina. Tais achados não se repetem na ausência de endotélio, provando que os efeitos observados se restringem à disfunção endotelial. Nossos dados estão em concordância com alguns estudos que também demonstraram disfunção endotelial na presença de LPC (Froese, McMaster et al. 1999; Leung, Huang et al. 2003; Deng and Xiong 2005; Lucas, Grynberg et al. 2008; Kozina, Opresnik et al. 2014). A LPC não produziu contração por si só, fato também observado em estudo utilizando aorta de rato (Suenaga and Kamata 1998). Contudo, foi observado aumento significativo da contração vascular mediada por fenilefrina. Outros trabalhos utilizando como modelo aorta de rato (Murohara, Kugiyama et al. 1994; Suenaga and Kamata 1998; Suenaga and Kamata 2002; Suenaga and Kamata 2003) e artéria coronária de porco (Murohara, Kugiyama et al. 1994) também demonstram aumento na contração em presença de LPC, tais trabalhos sugerem que o mecanismo envolve aumento de Ca²⁺ citosólico, levando a uma resposta contrátil potencializada nos segmentos testados (Suenaga and Kamata 1998). No nosso trabalho, não há alteração da contração em preparações desprovidas de endotélio na presença de LPC, sugerindo mais uma vez que tal aumento deve-se à disfunção endotelial.

Neste ínterim, ao testarmos a via das NOS através do uso do inibidor não seletivo L-NAME, pudemos observar que, apesar de o L-NAME abolir a resposta vasodilatadora em aortas tratadas ou não com LPC, a inibição do relaxamento é maior nos vasos controle do que nos vasos tratados com LPC. Desta forma, pode-se inferir que há comprometimento da via das NOS após exposição à LPC. Nosso grupo de pesquisa previamente demonstrou que a isoforma nNOS contribui de forma importante para o relaxamento vascular dependente de endotélio (Capettini, Cortes et al. 2010) através da produção de H₂O₂ além de NO (Capettini, Cortes et al. 2008). Como os trabalhos na literatura avaliam somente o comprometimento da eNOS após exposição à LPC, nosso trabalho foi focado em avaliar a via nNOS/H₂O₂ neste efeito. Desta forma, ao

utilizar o inibidor da nNOS TRIM e a enzima catalase, observamos que há uma redução da resposta vasorrelaxante no controle, o que não acontece nos vasos tratados com LPC. Juntos estes dados sugerem que, nesta concentração e tempo de exposição, a LPC tem efeito de aumento na contração e redução no relaxamento devido a uma redução da liberação de NO e H₂O₂ pela nNOS.

Outra provável explicação para a disfunção endotelial causada pela LPC envolve a ruptura no dímero da eNOS ativa, levando ao desacoplamento da eNOS, diminuindo sua atividade e produção de NO. Além disso, o desacoplamento da eNOS pode levar a aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, que poderia explicar um aumento na contração e diminuição no relaxamento. O desacoplamento da eNOS pode ocorrer em parte por uma depleção de L-arginina por si, causada pelo fato de a LPC prejudicar o transporte de arginina para a célula endotelial, diminuindo assim a captação de L-arginina (Kikuta, Sawamura et al. 1998). A LPC pode ainda atuar na indução de arginases, o que leva ao desacoplamento da eNOS (Forstermann and Sessa 2012). De fato, quando observamos nossos resultados de reatividade vascular onde utilizamos a L-arginina, vimos que esta é capaz de prevenir completamente a disfunção endotelial causada pela LPC. Estes dados apontam para uma provável depleção de NO causada pela LPC, a qual é restaurada na presença de L-arginina. Podemos então especular que a LPC estaria desacoplando a eNOS ou nNOS por uma provável redução nos níveis de L-arginina. Contudo, não se pode afirmar até o momento que uma exposição tão aguda (30 minutos) de LPC seriam suficientes para causar desacoplamento visto que não há dados na literatura sobre estes aspectos.

Uma consequência do desacoplamento da eNOS é um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio. No presente estudo, demonstramos aumento da produção de radicais superóxido no basal na presença de LPC através dos resultados de citometria de fluxo. Muitos estudos demonstram indução de espécies reativas na exposição a LPC (Kugiyama, Sugiyama et al. 1999; Takeshita, Inoue et al. 2000; Deng and Xiong 2005; Jia, Jiang et al. 2006; Ojala, Hirvonen et al. 2007). Este aumento em parte pode também explicar o aumento na contração, bem como a diminuição no relaxamento vascular observados.

A LPC também é capaz de afetar a função endotelial através da ativação da proteína cinase C (PKC) nas células endoteliais. A ativação da PKC endotelial pode aumentar a produção

de radicais livres, o que reduz a biodisponibilidade de NO e, conseqüentemente, o relaxamento vascular dependente de endotélio (Lewis and Henderson 1987). Além disso, a ativação da PKC no músculo liso vascular poderia induzir contração vascular (Gupte, Kaminski et al. 2009) por aumentar a sensibilidade ao Ca^{2+} além de estimular a produção muscular de superóxido (Ohara, Peterson et al. 1994). Tem sido demonstrado que a LPC altera a atividade de muitas enzimas sinalizadoras de membrana, incluindo ativação de PKC, fato já demonstrado utilizando aorta torácica de ratos (Ohgushi, Kugiyama et al. 1993; Ohara, Peterson et al. 1994). Tais dados podem também explicar os efeitos da LPC sobre a função vascular encontrados neste trabalho. Ainda sobre vias de transdução de sinais, a LPC pode atuar bloqueando vias de sinalização dependente de proteína G, através de desacoplamento entre a proteína G e o receptor (Freeman, Kuo et al. 1996). A LPC também estimula a atividade de fosfolipase D (PLD) em cultura de células endoteliais humanas e pode inibir o relaxamento derivado do endotélio pela mesma via (Cox and Cohen 1996).

É sabido que proteína tirosina kinase (PTK) e/ou ERK são vias que atuam em muitas funções celulares, incluindo crescimento celular, diferenciação, proliferação e contração vascular. Já foi demonstrado que a LPC ativa uma cascata de sinais através da PTK que culmina em ativação de ERK, levando a aumento de influxo de Ca^{2+} e, por sua vez, contração vascular (Suenaga and Kamata 2002; Matsumoto, Kobayashi et al. 2006). Estudos demonstram ainda efeito da LPC sobre a via RhoA, resultando em potencialização do efeito vasoconstritor da angiotensina II (Galle, Mameghani et al. 2003)

No presente estudo nós examinamos o efeito agudo da LPC sobre a biodisponibilidade de NO endotelial, sendo este considerado um importante marcador da saúde endotelial. As células EA.hy926 expostas a $10\mu M$ de LPC (30min) apresentaram redução na produção de NO, com ou sem exposição a acetilcolina. Os experimentos utilizando a técnica de citometria de fluxo corroboraram os resultados de reatividade vascular ao demonstrarem uma menor produção de NO e de H_2O_2 nas células tratadas com LPC. A redução na produção de NO já havia sido demonstrada em outros trabalhos (Matsumoto, Kobayashi et al. 2007; Rao, Riederer et al. 2013; Kozina, Opresnik et al. 2014). O aumento basal na produção de superóxido, como encontrado neste trabalho, também já havia sido demonstrado por Kozina e colaboradores (Kozina, Opresnik

et al. 2014). Contudo, é a primeira vez que se correlaciona a redução na produção de H_2O_2 à disfunção endotelial induzida pela LPC.

Sobre os resultados demonstrando a análise da fosforilação no sítio de inativação da $nNOS^{Ser852}$, observamos que a incubação com LPC aumenta consideravelmente a fosforilação mesmo com 30 minutos de incubação. Estes dados corroboram com os dados de reatividade vascular e de medidas de NO e H_2O_2 , que sugerem que há uma redução da atividade da $nNOS$ após o tratamento com a LPC.

7.2 Efeitos da atorvastatina sobre a função endotelial

Um dos principais efeitos pleiotrópicos das estatinas é a melhora da função endotelial de pacientes hipercolesterolêmicos por via independente da redução do colesterol (Liu, Liu et al. 2009). Com isto, mecanismos têm sido propostos para demonstrar o papel das estatinas sobre a NOS, já que tem sido demonstrado o aumento na produção de NO mediante tratamento com estatinas (Laufs, La Fata et al. 1998; Lefer, Scalia et al. 2001; Kalinowski, Dobrucki et al. 2002; Rikitake and Liao 2005; Sugawara, Ayer et al. 2008). Contudo, os diferentes perfis de pacientes, bem como as diferentes metodologias empregadas nos estudos, dificultam uma análise mais precisa sobre o real papel das estatinas sobre a função vascular.

A disfunção endotelial presente em várias doenças como aterosclerose, diabetes e hipertensão, por exemplo, tem sido alvo de constantes pesquisas que buscam o desenvolvimento de fármacos para prevenir ou atenuar esta disfunção e, conseqüentemente, reduzir a morbidade e mortalidade relacionada com doenças cardiovasculares. Dentre as atuais propostas de fármacos, figura a crescente sugestão do uso de estatinas que, além de melhorar o perfil lipídico, aumentam a biodisponibilidade de NO (Cau, Carneiro et al. 2012). Neste trabalho foi proposto um modelo de disfunção endotelial induzido por LPC, principal fosfolípide componente da LDLox, onde observou-se que a atorvastatina exerceu considerável melhora sobre a disfunção causada pela LPC.

Vários trabalhos demonstram que a atorvastatina pode aumentar a expressão de eNOS tanto por ativar fatores de transcrição, quanto por aumentar a estabilidade do mRNA. Além disso, é proposto que a atorvastatina pode promover o re-acoplamento da enzima e reduzir a inativação do NO pelas ROS (Laufs, La Fata et al. 1998). Desta forma, a atorvastatina seria útil tanto na redução direta dos níveis de colesterol total e LDL quanto na melhora da função vascular diretamente pelo aumento na biodisponibilidade de NO, sendo potencialmente útil para tratamento de outras patologias vasculares associadas à disfunção endotelial.

Quando os anéis de aorta foram expostos à LPC, foi observado redução no relaxamento vascular bem como aumento na contração. Contudo, quando com atorvastatina foi observado que a mesma foi capaz de prevenir a disfunção vascular causada pela LPC. Ao se constatar que a

disfunção causada pela LPC foi essencialmente endotelial, passamos a investigar os efeitos da atorvastatina sobre a melhora da função endotelial neste modelo. Experimentos de citometria de fluxo utilizando células endoteliais humanas demonstraram que a LPC foi capaz de reduzir sensivelmente a produção de NO e H₂O₂, bem como aumentar discretamente a produção de radicais superóxido. Contudo, o tratamento simultâneo das células com atorvastatina e LPC mostrou que a atorvastatina foi capaz de prevenir a redução na produção de NO e H₂O₂ causada pela LPC. No mesmo sentido, os resultados de Western blot demonstraram que a atorvastatina foi capaz de reduzir a fosforilação nos sítios de inativação da nNOS (nNOS^{ser852}) na presença de LPC, sugerindo que a atorvastatina atuaria reativando a nNOS e, conseqüentemente, a produção de NO e H₂O₂. Tal efeito nunca foi descrito para uma estatina.

Os resultados obtidos com a atorvastatina na disfunção endotelial levaram-nos a um novo questionamento: em condições fisiológicas, ou na ausência de um estímulo lesivo, a atorvastatina apresentaria algum efeito modulatório sobre a função vascular? A atorvastatina poderia ativar a nNOS independentemente de um quadro de disfunção endotelial? Para responder a estas perguntas, realizamos experimentos de reatividade vascular e cultura celular na ausência da LPC. Quando investigamos o efeito da atorvastatina sobre a resposta vascular, independente da disfunção, observamos que o pré-tratamento com as duas concentrações de atorvastatina utilizadas (1 e 10 µM) não altera o relaxamento vascular induzido por acetilcolina. Tal fato poderia ser explicado, visto que se trata de um modelo isento de disfunção, onde a resposta vasodilatadora já seria ideal, próximo a 100% de relaxamento. Alguns trabalhos sugerem que as estatinas atuam como antioxidante e, desta forma, poderiam aumentar a biodisponibilidade de NO, melhorando o relaxamento vascular. Tal fato talvez tenha sido visualizado somente nos nossos experimentos com disfunção endotelial devido ao aumento de radicais superóxido encontrado no nosso modelo. Fisiologicamente, as defesas antioxidantes poderiam controlar o excesso de ROS, dificultando a identificação do efeito antioxidante das estatinas nestas condições.

Quando foi realizado experimento de reatividade vascular para análise da resposta contrátil à fenilefrina os anéis pré-incubados com 1 ou 10µM de atorvastatina apresentaram significativa redução na contração em relação ao controle. Além disso, quando houve a remoção do endotélio funcional, o efeito da atorvastatina sobre a redução da contração foi abolido,

demonstrando que este efeito seria dependente de endotélio. O passo seguinte foi investigar o envolvimento das NOS através do L-NAME. O uso do inibidor aboliu a redução na contração causado pelo tratamento com atorvastatina, indicando que um provável mecanismo de ação seria o aumento da produção de NO pelas NOS, o que estaria levando à redução na contração.

Como os resultados com disfunção endotelial apontaram para uma ativação da nNOS pela atorvastatina, utilizamos o inibidor seletivo da nNOS TRIM. O TRIM inibiu a resposta mediada pela estatina, ou seja, aumentou a contração induzida pela fenilefrina, principalmente na concentração de 10 μ M. Estes resultados indicaram que o modo de atuação da estatina em promover redução na contração possivelmente seja modulando positivamente a via da nNOS. Tal fato foi corroborado ao utilizarmos catalase que, ao degradar o H₂O₂, observamos um perfil de resposta semelhante à inibição da nNOS. O próximo passo foi então avaliar se a atorvastatina aumentaria a produção de NO e H₂O₂ em células endoteliais. Os dados de citometria de fluxo mostraram que a atorvastatina induziu aumento na produção de NO e H₂O₂ o que foi inibido pela inibição da nNOS com o TRIM.

Vários trabalhos sugerem que os efeitos das estatinas são, em parte, mediados pela eNOS. Contudo, esta conclusão é baseada em grande parte a partir do uso de inibidores não seletivos das NOS como o L-NAME e o L-NMMA (John, Schlaich et al. 1998). Um trabalho de Landmesser e colaboradores sugere que a resposta da atorvastatina na ativação de células progenitoras endoteliais é ausentes em camundongos deficientes para a eNOS (Landmesser, Engberding et al. 2004). Algumas estatinas podem aumentar a expressão de eNOS (Laufs and Liao 1998) e também aumentar a atividade da eNOS através de diminuição na expressão de caveolina-1 (Feron, Dessy et al. 2001), além de ativar a via PI3kinase-AKT, responsável por fosforilar sítios de ativação da eNOS (Kureishi, Luo et al. 2000). Foi demonstrado que fluvastatina e cerivastatina aumentam a biossíntese do importante cofator para produção de NO - a tetrahydrobiopterina (BH₄) em cultura de células endoteliais (Hattori, Nakanishi et al. 2003; Aoki, Nakano et al. 2012) e em ratos (Wenzel, Daiber et al. 2008). Além disto, a atorvastatina pode ainda aumentar a expressão de GTP ciclohidrolase-1 (GTPCH-1), enzima responsável por pela síntese de BH₄, em artérias mamária humanas (Antoniades, Bakogiannis et al. 2011). Por outro lado, acredita-se que muitas estatinas possam inibir a formação de superóxido endotelial por redução da expressão e atividade de NADPH oxidase (Wagner, Kohler et al. 2000).

Apesar de muitos trabalhos apontarem a ativação da produção de NO pela eNOS como o principal mecanismo envolvido nos efeitos vasculares diretos das estatinas, a literatura ainda é deficiente no que diz respeito aos efeitos das estatinas sobre a nNOS. Já foi demonstrado que a atorvastatina aumenta a expressão da nNOS em células musculares lisas, e também aumenta a produção de NO em aorta de rato, através de inibição de Rho kinase e ativação de Akt (Nakata, Tsutsui et al. 2007). Contudo, é sabido na literatura que a participação da nNOS no controle da função vascular em aortas de ratos não é significativo em condições fisiológicas. Os modelos utilizados neste trabalho, aortas de camundongos C57BL/6J e células endoteliais da linhagem EA.hy926, apresentam expressão constitutiva da nNOS e a mesma contribui com aproximadamente 50% da resposta vascular à acetilcolina. Desta forma, nosso modelo pode fornecer uma real ideia do papel modulatório da atorvastatina sobre a nNOS. O conhecimento do papel da atorvastatina sobre a nNOS pode ser particularmente importante tendo em vista que crescentes achados na literatura sugerem que a nNOS pode ser uma enzima-chave na fisiopatologia de várias doenças vasculares como a aterosclerose, as estenoses pós-angioplastias, hipertensão e diabetes (Kuhlencordt, Hotten et al. 2006; Capettini, Cortes et al. 2011).

No nosso modelo de disfunção endotelial causada pela LPC, a atorvastatina foi capaz de reduzir a contração vascular, melhorar o relaxamento, além de aumentar a produção de NO e H_2O_2 e diminuir a produção de superóxido. Além disso, a atorvastatina preveniu o aumento de fosforilação nos sítios de inativação da nNOS causado pela LPC.

CONCLUSÃO

8 Conclusão

Os resultados apresentados neste trabalho nos permitem concluir que:

A. LPC, um componente da LDLox oxidada, utilizado de forma aguda nos experimentos realizados foi capaz de promover dano ao endotélio vascular, levando ao processo de disfunção através de redução na produção de NO e H₂O₂, além do aumento da produção de superóxido;

B. O uso agudo de atorvastatina foi capaz de impedir ou prevenir a disfunção endotelial causada pela LPC;

C. A atorvastatina modula a função contrátil endotelial em animais saudáveis, via mecanismos dependente das NOS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 Referências Bibliográficas

- Abd, T. T., D. J. Eapen, et al. (2011). "The role of C-reactive protein as a risk predictor of coronary atherosclerosis: implications from the JUPITER trial." Curr Atheroscler Rep **13**(2): 154-161.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper, et al. (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." Biochem J **357**(Pt 3): 593-615.
- Alpert, J. S. (2012). "A few unpleasant facts about atherosclerotic arterial disease in the United States and the world." Am J Med **125**(9): 839-840.
- Anderson, T. J. (1999). "Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans." J Am Coll Cardiol **34**(3): 631-638.
- Anderson, T. J. (2003). "Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction." Heart Fail Rev **8**(1): 71-86.
- Antoniades, C., C. Bakogiannis, et al. (2011). "Rapid, direct effects of statin treatment on arterial redox state and nitric oxide bioavailability in human atherosclerosis via tetrahydrobiopterin-mediated endothelial nitric oxide synthase coupling." Circulation **124**(3): 335-345.
- Aoki, C., A. Nakano, et al. (2012). "Fluvastatin upregulates endothelial nitric oxide synthase activity via enhancement of its phosphorylation and expression and via an increase in tetrahydrobiopterin in vascular endothelial cells." Int J Cardiol **156**(1): 55-61.
- Ballantyne, C. M. (2007). "Treatment of dyslipidemia to reduce cardiovascular risk in patients with multiple risk factors." Clin Cornerstone **8 Suppl 6**: S6-13.
- Boger, R. H., S. M. Bode-Boger, et al. (1998). "Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia." Circulation **98**(18): 1842-1847.
- Boger, R. H., K. Sydow, et al. (2000). "LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases." Circ Res **87**(2): 99-105.
- Bonetti, P. O., L. O. Lerman, et al. (2003). "Statin effects beyond lipid lowering--are they clinically relevant?" Eur Heart J **24**(3): 225-248.

- Boulanger, C. M., F. C. Tanner, et al. (1992). "Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium." Circ Res **70**(6): 1191-1197.
- Briones, A. M., N. Rodriguez-Criado, et al. (2009). "Atorvastatin prevents angiotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stress." Hypertension **54**(1): 142-149.
- Brkic, L., M. Riederer, et al. (2012). "Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on cyclooxygenase (COX)-2 expression in endothelial cells." Atherosclerosis **224**(2): 348-354.
- Busse, R., A. Luckhoff, et al. (1987). "Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **336**(5): 566-571.
- Capettini, L. S., S. F. Cortes, et al. (2008). "Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(6): H2503-2511.
- Capettini, L. S., S. F. Cortes, et al. (2010). "Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta." Eur J Pharmacol **643**(2-3): 260-266.
- Capettini, L. S., S. F. Cortes, et al. (2011). "Decreased production of neuronal NOS-derived hydrogen peroxide contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis." Br J Pharmacol **164**(6): 1738-1748.
- Cau, S. B., F. S. Carneiro, et al. (2012). "Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: therapeutic opportunities." Front Physiol **3**: 218.
- Celermajer, D. S., C. Dollery, et al. (1994). "Role of endothelium in the maintenance of low pulmonary vascular tone in normal children." Circulation **89**(5): 2041-2044.
- Cho, H. J., Q. W. Xie, et al. (1992). "Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages." J Exp Med **176**(2): 599-604.
- Choi, S., S. Park, et al. (2010). "Superoxide generated by lysophosphatidylcholine induces endothelial nitric oxide synthase downregulation in human endothelial cells." Cell Physiol Biochem **25**(2-3): 233-240.
- Cosentino, F., J. C. Sill, et al. (1994). "Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions." Hypertension **23**(2): 229-235.

- Cowan, C. L. and R. P. Steffen (1995). "Lysophosphatidylcholine inhibits relaxation of rabbit abdominal aorta mediated by endothelium-derived nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor independent of protein kinase C activation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(12): 2290-2297.
- Cox, D. A. and M. L. Cohen (1996). "Lysophosphatidylcholine stimulates phospholipase D in human coronary endothelial cells: role of PKC." Am J Physiol **271**(4 Pt 2): H1706-1710.
- Croons, V., W. Martinet, et al. (2010). "Selective removal of macrophages in atherosclerotic plaques as a pharmacological approach for plaque stabilization: benefits versus potential complications." Curr Vasc Pharmacol **8**(4): 495-508.
- Croset, M., N. Brossard, et al. (2000). "Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat." Biochem J **345 Pt 1**: 61-67.
- Davignon, J. and P. Ganz (2004). "Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis." Circulation **109**(23 Suppl 1): III27-32.
- Deanfield, J., A. Donald, et al. (2005). "Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension." J Hypertens **23**(1): 7-17.
- Deng, H. F. and Y. Xiong (2005). "Effect of pravastatin on impaired endothelium-dependent relaxation induced by lysophosphatidylcholine in rat aorta." Acta Pharmacol Sin **26**(1): 92-98.
- Dimmeler, S., I. Fleming, et al. (1999). "Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation." Nature **399**(6736): 601-605.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev **82**(1): 47-95.
- Ebermann, L., F. Spillmann, et al. (2008). "The angiotensin-(1-7) receptor agonist AVE0991 is cardioprotective in diabetic rats." Eur J Pharmacol **590**(1-3): 276-280.
- Eizawa, H., Y. Yui, et al. (1995). "Lysophosphatidylcholine inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and N omega-nitro-L-arginine/indomethacin-resistant endothelium-dependent relaxation in the porcine coronary artery." Circulation **92**(12): 3520-3526.
- Feletou, M. and P. M. Vanhoutte (1996). "Endothelium-derived hyperpolarizing factor." Clin Exp Pharmacol Physiol **23**(12): 1082-1090.

- Feron, O., C. Dessy, et al. (2001). "Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance." Circulation **103**(1): 113-118.
- Fleming, I. and R. Busse (1999). "NO: the primary EDRF." J Mol Cell Cardiol **31**(1): 5-14.
- Fleming, I., A. Mohamed, et al. (2005). "Oxidized low-density lipoprotein increases superoxide production by endothelial nitric oxide synthase by inhibiting PKC α ." Cardiovasc Res **65**(4): 897-906.
- Forstermann, U., E. I. Closs, et al. (1994). "Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions." Hypertension **23**(6 Pt 2): 1121-1131.
- Forstermann, U., J. S. Pollock, et al. (1994). "Isoforms of nitric-oxide synthase: purification and regulation." Methods Enzymol **233**: 258-264.
- Forstermann, U. and W. C. Sessa (2012). "Nitric oxide synthases: regulation and function." Eur Heart J **33**(7): 829-837, 837a-837d.
- Freedman, J. E., R. Sauter, et al. (1999). "Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene." Circ Res **84**(12): 1416-1421.
- Freeman, J. E., W. Y. Kuo, et al. (1996). "Analysis of lysophosphatidylcholine-induced endothelial dysfunction." J Cardiovasc Pharmacol **28**(3): 345-352.
- Froese, D. E., J. McMaster, et al. (1999). "Inhibition of endothelium-dependent vascular relaxation by lysophosphatidylcholine: impact of lysophosphatidylcholine on mechanisms involving endothelium-derived nitric oxide and endothelium derived hyperpolarizing factor." Mol Cell Biochem **197**(1-2): 1-6.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-376.
- Galle, J., A. Mameghani, et al. (2003). "Oxidized LDL and its compound lysophosphatidylcholine potentiate AngII-induced vasoconstriction by stimulation of RhoA." J Am Soc Nephrol **14**(6): 1471-1479.
- Garg, U. C. and A. Hassid (1989). "Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells." J Clin Invest **83**(5): 1774-1777.
- Girotra, S., S. Murarka, et al. (2012). "Plaque regression and improved clinical outcomes following statin treatment in atherosclerosis." Panminerva Med **54**(2): 71-81.

- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1990). "Regulation of the mevalonate pathway." Nature **343**(6257): 425-430.
- Govers, R. and T. J. Rabelink (2001). "Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase." Am J Physiol Renal Physiol **280**(2): F193-206.
- Gupte, S. A., P. M. Kaminski, et al. (2009). "Peroxide generation by p47phox-Src activation of Nox2 has a key role in protein kinase C-induced arterial smooth muscle contraction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **296**(4): H1048-1057.
- Hadi, H. A., C. S. Carr, et al. (2005). "Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome." Vasc Health Risk Manag **1**(3): 183-198.
- Hatano, Y., J. D. Kohli, et al. (1980). "Vascular relaxing activity and stability studies of 10,10-difluoro-13,14-dehydroprostacyclin." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(11): 6846-6850.
- Hattori, Y., N. Nakanishi, et al. (2003). "HMG-CoA reductase inhibitor increases GTP cyclohydrolase I mRNA and tetrahydrobiopterin in vascular endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(2): 176-182.
- Hemmens, B. and B. Mayer (1998). "Enzymology of nitric oxide synthases." Methods Mol Biol **100**: 1-32.
- Hernandez-Perera, O., D. Perez-Sala, et al. (1998). "Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells." J Clin Invest **101**(12): 2711-2719.
- Herrera, M. D., C. Mingorance, et al. (2010). "Endothelial dysfunction and aging: an update." Ageing Res Rev **9**(2): 142-152.
- Higashi, Y., K. Noma, et al. (2009). "Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases." Circ J **73**(3): 411-418.
- Ignarro, L. J., G. M. Buga, et al. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9265-9269.
- Imanishi, T., T. Hano, et al. (2004). "Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction." Clin Exp Pharmacol Physiol **31**(7): 407-413.

- Inoue, N., K. Hirata, et al. (1992). "Lysophosphatidylcholine inhibits bradykinin-induced phosphoinositide hydrolysis and calcium transients in cultured bovine aortic endothelial cells." Circ Res **71**(6): 1410-1421.
- Jakobisiak, M. and J. Golab (2003). "Potential antitumor effects of statins (Review)." Int J Oncol **23**(4): 1055-1069.
- Jia, S. J., D. J. Jiang, et al. (2006). "Lysophosphatidylcholine-induced elevation of asymmetric dimethylarginine level by the NADPH oxidase pathway in endothelial cells." Vascul Pharmacol **44**(3): 143-148.
- John, S., M. Schlaich, et al. (1998). "Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients: a randomized, placebo-controlled, double-blind study." Circulation **98**(3): 211-216.
- Kalinowski, L., L. W. Dobrucki, et al. (2002). "Increased nitric oxide bioavailability in endothelial cells contributes to the pleiotropic effect of cerivastatin." Circulation **105**(8): 933-938.
- Kaneider, N. C., P. Egger, et al. (2002). "Reversal of thrombin-induced deactivation of CD39/ATPase in endothelial cells by HMG-CoA reductase inhibition: effects on Rho-GTPase and adenosine nucleotide metabolism." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(6): 894-900.
- Katusic, Z. S. (2001). "Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role?" Am J Physiol Heart Circ Physiol **281**(3): H981-986.
- Kikuta, K., T. Sawamura, et al. (1998). "High-affinity arginine transport of bovine aortic endothelial cells is impaired by lysophosphatidylcholine." Circ Res **83**(11): 1088-1096.
- Kondo, T., M. Hirose, et al. (2009). "Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis." J Atheroscler Thromb **16**(5): 532-538.
- Kover, G., T. Harza, et al. (1968). "Protective effect of sucrose and mannitol against vasoconstriction induced by angiotensin II in the kidney." Acta Physiol Acad Sci Hung **33**(1): 19-26.
- Kozina, A., S. Opresnik, et al. (2014). "Oleoyl-lysophosphatidylcholine limits endothelial nitric oxide bioavailability by induction of reactive oxygen species." PLoS One **9**(11): e113443.
- Kubes, P., M. Suzuki, et al. (1991). "Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(11): 4651-4655.

- Kugiyama, K., S. A. Kerns, et al. (1990). "Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins." Nature **344**(6262): 160-162.
- Kugiyama, K., S. Sugiyama, et al. (1999). "Burst production of superoxide anion in human endothelial cells by lysophosphatidylcholine." Atherosclerosis **143**(1): 201-204.
- Kuhlencordt, P. J., S. Hotten, et al. (2006). "Atheroprotective effects of neuronal nitric oxide synthase in apolipoprotein e knockout mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(7): 1539-1544.
- Kume, N., M. I. Cybulsky, et al. (1992). "Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells." J Clin Invest **90**(3): 1138-1144.
- Kureishi, Y., Z. Luo, et al. (2000). "The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals." Nat Med **6**(9): 1004-1010.
- Lahoz, C. and J. M. Mostaza (2007). "[Atherosclerosis as a systemic disease]." Rev Esp Cardiol **60**(2): 184-195.
- Lahteenmaki, T. A., R. Korpela, et al. (1998). "Proliferative effects of oxidized low-density lipoprotein on vascular smooth muscle cells: role of dietary habits." Life Sci **63**(12): 995-1003.
- Landmesser, U., N. Engberding, et al. (2004). "Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase." Circulation **110**(14): 1933-1939.
- Laufs, U., V. La Fata, et al. (1998). "Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors." Circulation **97**(12): 1129-1135.
- Laufs, U. and J. K. Liao (1998). "Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase." J Biol Chem **273**(37): 24266-24271.
- Laufs, U., S. Wassmann, et al. (2001). "Rapid effects on vascular function after initiation and withdrawal of atorvastatin in healthy, normocholesterolemic men." Am J Cardiol **88**(11): 1306-1307.
- Lee, R., K. M. Channon, et al. (2012). "Therapeutic strategies targeting endothelial function in humans: clinical implications." Curr Vasc Pharmacol **10**(1): 77-93.

- Lefer, A. M. and X. L. Ma (1993). "Decreased basal nitric oxide release in hypercholesterolemia increases neutrophil adherence to rabbit coronary artery endothelium." Arterioscler Thromb **13**(6): 771-776.
- Lefer, A. M., R. Scalia, et al. (2001). "Vascular effects of HMG CoA-reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular disease." Cardiovasc Res **49**(2): 281-287.
- Lerman, A. and J. C. Burnett, Jr. (1992). "Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion." Circulation **86**(6 Suppl): III12-19.
- Leung, S. W., M. Huang, et al. (2003). "Detrimental vascular effects of lysophosphatidylcholine is limited by other phospholipid components of low-density lipoprotein." Mol Cell Biochem **250**(1-2): 159-166.
- Leung, Y. M., Y. Xion, et al. (1998). "Perturbation by lysophosphatidylcholine of membrane permeability in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells." Life Sci **63**(11): 965-973.
- Lewis, M. J. and A. H. Henderson (1987). "A phorbol ester inhibits the release of endothelium-derived relaxing factor." Eur J Pharmacol **137**(2-3): 167-171.
- Li, H. and U. Forstermann (2013). "Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease." Curr Opin Pharmacol **13**(2): 161-167.
- Li, L. M., R. G. Kilbourn, et al. (1991). "Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells." Cancer Res **51**(10): 2531-2535.
- Liao, J. K. and U. Laufs (2005). "Pleiotropic effects of statins." Annu Rev Pharmacol Toxicol **45**: 89-118.
- Liu, P. Y., Y. W. Liu, et al. (2009). "Evidence for statin pleiotropy in humans: differential effects of statins and ezetimibe on rho-associated coiled-coil containing protein kinase activity, endothelial function, and inflammation." Circulation **119**(1): 131-138.
- Lucas, A., A. Grynberg, et al. (2008). "Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and endothelium dysfunction induced by lysophosphatidylcholine in Syrian hamster aorta." Metabolism **57**(2): 233-240.
- Ludewig, B., R. M. Zinkernagel, et al. (2002). "Arterial inflammation and atherosclerosis." Trends Cardiovasc Med **12**(4): 154-159.

- Ludmer, P. L., A. P. Selwyn, et al. (1986). "Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries." N Engl J Med **315**(17): 1046-1051.
- Mahfouz, M. M. and F. A. Kummerow (2005). "Atorvastatin reduces the plasma lipids and oxidative stress but did not reverse the inhibition of prostacyclin generation by aortas in streptozotocin diabetic rats." Prostaglandins Other Lipid Mediat **76**(1-4): 59-73.
- Mangin, E. L., Jr., K. Kugiyama, et al. (1993). "Effects of lysolipids and oxidatively modified low density lipoprotein on endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta." Circ Res **72**(1): 161-166.
- Massion, P. B., O. Feron, et al. (2003). "Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing." Circ Res **93**(5): 388-398.
- Matsumoto, T., T. Kobayashi, et al. (2006). "Mechanisms underlying lysophosphatidylcholine-induced potentiation of vascular contractions in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat aorta." Br J Pharmacol **149**(7): 931-941.
- Matsumoto, T., T. Kobayashi, et al. (2007). "Role of lysophosphatidylcholine (LPC) in atherosclerosis." Curr Med Chem **14**(30): 3209-3220.
- Mauro, V. F. and J. L. MacDonald (1991). "Simvastatin: a review of its pharmacology and clinical use." DICP **25**(3): 257-264.
- Miwa, Y., K. Hirata, et al. (1997). "Lysophosphatidylcholine inhibits receptor-mediated Ca²⁺ mobilization in intact endothelial cells of rabbit aorta." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(8): 1561-1567.
- Moncada, S. and J. R. Vane (1978). "Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin." Pharmacol Rev **30**(3): 293-331.
- Mora, S. and P. M. Ridker (2006). "Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER)--can C-reactive protein be used to target statin therapy in primary prevention?" Am J Cardiol **97**(2A): 33A-41A.
- Morrow, V. A., F. Foughle, et al. (2003). "Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells." J Biol Chem **278**(34): 31629-31639.
- Mudau, M., A. Genis, et al. (2012). "Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis." Cardiovasc J Afr **23**(4): 222-231.

- Mukai, Y., H. Shimokawa, et al. (2003). "Acute vasodilator effects of HMG-CoA reductase inhibitors: involvement of PI3-kinase/Akt pathway and Kv channels." J Cardiovasc Pharmacol **42**(1): 118-124.
- Murohara, T., K. Kugiyama, et al. (1994). "LPC in oxidized LDL elicits vasocontraction and inhibits endothelium- dependent relaxation." Am J Physiol **267**(6 Pt 2): H2441-2449.
- Nakaki, T., M. Nakayama, et al. (1990). "Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells." Eur J Pharmacol **189**(6): 347-353.
- Nakata, S., M. Tsutsui, et al. (2007). "Statin treatment upregulates vascular neuronal nitric oxide synthase through Akt/NF-kappaB pathway." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(1): 92-98.
- O'Donoghue, M. L. (2014). "Acute coronary syndromes: targeting inflammation-what has the VISTA-16 trial taught us?" Nat Rev Cardiol **11**(3): 130-132.
- Oemar, B. S., M. R. Tschudi, et al. (1998). "Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis." Circulation **97**(25): 2494-2498.
- Ohara, Y., T. E. Peterson, et al. (1994). "Lysophosphatidylcholine increases vascular superoxide anion production via protein kinase C activation." Arterioscler Thromb **14**(6): 1007-1013.
- Ohgushi, M., K. Kugiyama, et al. (1993). "Protein kinase C inhibitors prevent impairment of endothelium-dependent relaxation by oxidatively modified LDL." Arterioscler Thromb **13**(10): 1525-1532.
- Ojala, P. J., T. E. Hirvonen, et al. (2007). "Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on human neutrophils." J Leukoc Biol **82**(6): 1501-1509.
- Rafieian-Kopaei, M., M. Setorki, et al. (2014). "Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes." Int J Prev Med **5**(8): 927-946.
- Raiteri, M., L. Arnaboldi, et al. (1997). "Pharmacological control of the mevalonate pathway: effect on arterial smooth muscle cell proliferation." J Pharmacol Exp Ther **281**(3): 1144-1153.
- Rajagopalan, S., S. Kurz, et al. (1996). "Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone." J Clin Invest **97**(8): 1916-1923.

- Rajendran, P., T. Rengarajan, et al. (2013). "The vascular endothelium and human diseases." Int J Biol Sci **9**(10): 1057-1069.
- Rao, S. P., M. Riederer, et al. (2013). "Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on endothelium-dependent vasorelaxation." PLoS One **8**(5): e65155.
- Rapoport, R. M. and F. Murad (1983). "Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP." J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res **9**(4-5): 281-296.
- Reddy, K. G., R. N. Nair, et al. (1994). "Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis." J Am Coll Cardiol **23**(4): 833-843.
- Ridker, P. M., N. Rifai, et al. (1999). "Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators." Circulation **100**(3): 230-235.
- Riederer, M., H. Kofeler, et al. (2012). "Impact of endothelial lipase on cellular lipid composition." Biochim Biophys Acta **1821**(7): 1003-1011.
- Rikitake, Y. and J. K. Liao (2005). "Rho GTPases, statins, and nitric oxide." Circ Res **97**(12): 1232-1235.
- Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." Nature **362**(6423): 801-809.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis is an inflammatory disease." Am Heart J **138**(5 Pt 2): S419-420.
- Rossoni, L. V., M. Wareing, et al. (2011). "Acute simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via AMP-activated protein kinase and reduces contractility of isolated rat mesenteric resistance arteries." Clin Sci (Lond) **121**(10): 449-458.
- Rubbo, H., A. Trostchansky, et al. (2002). "Interactions of nitric oxide and peroxynitrite with low-density lipoprotein." Biol Chem **383**(3-4): 547-552.
- Schodel, J., P. Padmapriya, et al. (2009). "Expression of neuronal nitric oxide synthase splice variants in atherosclerotic plaques of apoE knockout mice." Atherosclerosis **206**(2): 383-389.

- Staal, A., J. C. Frith, et al. (2003). "The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity." J Bone Miner Res **18**(1): 88-96.
- Steinberg, D., S. Parthasarathy, et al. (1989). "Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity." N Engl J Med **320**(14): 915-924.
- Steinberg, D. and J. L. Witztum (2002). "Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis?" Circulation **105**(17): 2107-2111.
- Stoll, L. L., H. J. Oskarsson, et al. (1992). "Interaction of lysophosphatidylcholine with aortic endothelial cells." Am J Physiol **262**(6 Pt 2): H1853-1860.
- Suenaga, H. and K. Kamata (1998). "Lysophosphatidylcholine potentiates vascular contractile responses by enhancing vasoconstrictor-induced increase in cytosolic free Ca²⁺ in rat aorta." Eur J Pharmacol **361**(2-3): 217-226.
- Suenaga, H. and K. Kamata (2002). "Lysophosphatidylcholine potentiates vascular contractile responses in rat aorta via activation of tyrosine kinase." Br J Pharmacol **135**(3): 789-799.
- Suenaga, H. and K. Kamata (2003). "Lysophosphatidylcholine activates extracellular-signal-regulated protein kinase and potentiates vascular contractile responses in rat aorta." J Pharmacol Sci **92**(4): 348-358.
- Sugawara, T., R. Ayer, et al. (2008). "Simvastatin attenuation of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats via increased phosphorylation of Akt and endothelial nitric oxide synthase." J Neurosci Res **86**(16): 3635-3643.
- Sugawara, T., V. Jadhav, et al. (2008). "Simvastatin attenuates cerebral vasospasm and improves outcomes by upregulation of PI3K/Akt pathway in a rat model of subarachnoid hemorrhage." Acta Neurochir Suppl **102**: 391-394.
- Takeshita, S., N. Inoue, et al. (2000). "Lysophosphatidylcholine enhances superoxide anions production via endothelial NADH/NADPH oxidase." J Atheroscler Thromb **7**(4): 238-246.
- Tardivel, S., A. Gousset-Dupont, et al. (2009). "Protective effects of EPA and deleterious effects of DHA on eNOS activity in Ea hy 926 cultured with lysophosphatidylcholine." Lipids **44**(3): 225-235.

- Tesfamariam, B., B. H. Frohlich, et al. (1999). "Differential effects of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin on Ca²⁺ release and vascular reactivity." J Cardiovasc Pharmacol **34**(1): 95-101.
- Tziomalos, K., V. G. Athyros, et al. (2009). "JUPITER: major implications for vascular risk assessment." Curr Med Res Opin **25**(1): 133-137.
- van Harmelen, V., T. Skurk, et al. (2003). "HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin inhibits interleukin-6 expression and secretion in human adipocytes." Horm Metab Res **35**(8): 466-470.
- Vane, J. R., E. E. Anggard, et al. (1990). "Regulatory functions of the vascular endothelium." N Engl J Med **323**(1): 27-36.
- Vanhoutte, P. M. (1997). "Endothelial dysfunction and atherosclerosis." Eur Heart J **18 Suppl E**: E19-29.
- Vanhoutte, P. M. (2009). "Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis." Circ J **73**(4): 595-601.
- Vincent, L., C. Soria, et al. (2002). "Cerivastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase, inhibits endothelial cell proliferation induced by angiogenic factors in vitro and angiogenesis in in vivo models." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(4): 623-629.
- Viridis, A., L. Ghiadoni, et al. (2010). "Human endothelial dysfunction: EDCFs." Pflugers Arch **459**(6): 1015-1023.
- Wagner, A. H., T. Kohler, et al. (2000). "Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(1): 61-69.
- Weber, C. and H. Noels (2011). "Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options." Nat Med **17**(11): 1410-1422.
- Wenzel, P., A. Daiber, et al. (2008). "Mechanisms underlying recoupling of eNOS by HMG-CoA reductase inhibition in a rat model of streptozotocin-induced diabetes mellitus." Atherosclerosis **198**(1): 65-76.
- Wilcox, J. N., R. R. Subramanian, et al. (1997). "Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(11): 2479-2488.

- Wink, D. A., K. S. Kasprzak, et al. (1991). "DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors." Science **254**(5034): 1001-1003.
- Xie, Q. W., H. J. Cho, et al. (1992). "Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages." Science **256**(5054): 225-228.
- Yanagisawa, M., H. Kurihara, et al. (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." Nature **332**(6163): 411-415.
- Yokode, M., T. Kita, et al. (1988). "Stimulated arachidonate metabolism during foam cell transformation of mouse peritoneal macrophages with oxidized low density lipoprotein." J Clin Invest **81**(3): 720-729.
- Yokoyama, M., K. Hirata, et al. (1990). "Lysophosphatidylcholine: essential role in the inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by oxidized low density lipoprotein." Biochem Biophys Res Commun **168**(1): 301-308.
- Zeibig, S., Z. Li, et al. (2011). "Effect of the oxLDL binding protein Fc-CD68 on plaque extension and vulnerability in atherosclerosis." Circ Res **108**(6): 695-703.
- Zhang, H., Y. Park, et al. (2009). "Role of TNF-alpha in vascular dysfunction." Clin Sci (Lond) **116**(3): 219-230.
- Zhou, L. and D. Y. Zhu (2009). "Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications." Nitric Oxide **20**(4): 223-230.
- Zhou, Q. and J. K. Liao (2010). "Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives." Circ J **74**(5): 818-826.