UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PEDRO AFONSO BARRETO FERREIRA

O envolvimento de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas com fenótipo vulnerável em camundongos nocautes para apoliproteína E

RIBEIRÃO PRETO

2018

PEDRO AFONSO BARRETO FERREIRA

O envolvimento de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas com fenótipo vulnerável em camundongos nocautes para apoliproteína E

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

RIBEIRÃO PRETO

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Departamento Técnico do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP

Universidade de São Paulo

Ficha catalográfica

Barreto Ferreira, Pedro Afonso

O envolvimento de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas com fenótipo vulnerável em camundongos nocautes para apoliproteína E. Ribeirão Preto, 2018. 90 p., 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo - Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Tostes Passaglia, Rita de Cássia Aleixo

1. Aterosclerose. 2. vulnerabilidade da placa aterosclerótica. 3. Receptores de Hidrocarbonetos de Arila

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Pedro Afonso Barreto Ferreira

Título: O envolvimento de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas com fenótipo vulnerável em camundongos nocautes para apoliproteína E

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

Aprovado em: ____/____/2018

Banca Examinadora

Nome: _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

À minha avó, Noemia
Por sonhar meus sonhos e torná-los
realidade.

Aos meus pais, Helena e Geraldo
Pelo incentivo e apoio incondicional.

À minha tia, Glória, e meu irmão, Paulo
Pelo exemplo de perseverança e coragem.

Aos amigos, Edis, Ludmila, Nathanne e
Maira
Por me ensinarem a persistir e resistir.

Sem vocês essa caminhada não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Ha uma seleção natural, mas não me refiro àquela postulada pelo Darwinismo, e sim ao direito de escolha, que vigora entre o sim e não, ir e vir, que determina os caminhos pregressos e afirmarão os pósteros. É por esse direito, que hoje estou refletindo sobre o significado da palavra “gratidão” e me permitindo dissentir do grande escritor Machado de Assis, pois não creio que “a gratidão de quem recebe um benefício é sempre menor que o prazer daquele de quem o faz”. Sou tão grato à minha vida e as pessoas que dela escolheram fazer parte, que me permitirei ser informal e sentimental.

Ao amor, que tem nome, sobrenome, e uma forma “fofinha”, que me ensinou o que não está nos livros. Vozinha, sem você eu não seria... À minha família, pelo suporte, incentivo e confiança, por me fazerem presente, mesmo distante. Mãe, sem você eu não teria forças para seguir. Pai, o amor pela leitura, história e a retórica estão arraigados ao meu genoma. Mano, são tantas histórias e cumplicidade. Tios, Elias (dindo - dd), Glória, Carlos, Cleci, Marina, Walter e Cintia; Primos Gabriel, Laura, Alice, Carol, Marcos, João, Miguel e Juliana, sem vocês, os almoços de domingo seria só mais uma refeição, os natais, só mais uma festa, e meu/nosso lar, a casa da vó, não faltariam cadeiras. Obrigado por ser a família perfeita para mim!

Aos “EMES” da minha vida... Maira, por ser a melhor amiga e pessoa que conheço. Millena, por ser prima-mãe, cuidar de mim com tanto amor e zelo, por ter me dado o Ben, o presente mais lindo do universo, que “dindinho” tanto ama. Mirella, por ser prima-irmã, somos o exemplo que verdadeiros amigos não precisam se ver ou falar todos os dias, ou semana, uma vez por ano é suficiente. Obrigado pelas horas ao telefone, pela confidencialidade e cumplicidade.

Ao Edis, pela dedicação, carinho e companheirismo, nada do que escreva aqui é suficiente para expressar meu amor por ti, “te amarei de janeiro a janeiro, até o mundo acabar”.

Lud e Nath, meninas dos meus olhos, amigas das lutas diárias, meu lar e porto seguro em Ribeirão Preto, todo amor e gratidão que doar ao mundo será nada perto do bem que vocês fizeram a mim, sem vocês eu teria desistido.

Aos queridos amigos da vida, Rhéure, Karla, Camilinha, Camila Zanotto, Taíz Brasil, Brisa e Carla Pavan, pelos preciosos momentos de cumplicidade e leveza, por cada risada, por todo ensinamento, pelas constantes palavras de incentivo e carinho, e inestimável convívio.

Aos novos amigos, Nathalia, Emiliana e Allan, por cada conversa descontraída, pelo apoio e afago nos momentos de anseio, levo vocês para a vida.

Aos amigos da Fisiologia, Julio (filho), Júnia, Mateus, Nikollas (vizinho), Pri, Linete, Popo, Alê e Aldo (agregado), pelas conversas, risadas e por ser contra o golpe.

Aos amigos do programa de Farmacologia, Fran, Edu, Rafa, Mel, Gabriel, Jeimison e Ju, em especial ao Gobira e a Nayelle, pelos momentos de descontração e falatório.

Aos colegas de laboratório e companheiros de labuta, Allan Mendes, Aline Fedoce, Camila André, Camila Zanotto, Emiliana Abrão, Josiane Fernandes, Júlio Neto, Juliano Vilela, Nathanne Ferreira, Thiago Bruder, Thiago Dias, Rafael Fais, Rafael Menezes, Rheure Alves, Vânia Olivon, em especial ao professor Dr. Fernando (Fer), pela experiência de convívio diário e pelos ensinamentos científicos ao longo desse período.

À Fabiola (Fah) e a Carla Pavan, pelo suporte técnico e pronto atendimento nos momentos de necessidade, a vocês meu apreço e gratidão.

À Vânia, pela assistência científica, por todo apoio e confiança, mas principalmente pela luz, por emanar sabedoria e amor. À amizade!

À prof.^a Rita Tostes, pelo acolhimento, orientação, paciência, e principalmente pela compreensão e respeito em todas as circunstâncias. Minhas sinceras desculpas pelas minhas falhas, e eterna gratidão por todo aprendizado científico e político.

Ao professor Dr. Nikolaos Steriopoulos, Nikos, por me receber em vosso laboratório e ter permitido essa oportunidade ímpar.

Aos meus queridos amigos, Rodrigo, Fabi, Augusto e Kat, por me acolher na Suíça como alguém da família, e permitir que eu convivesse com a princesa Bela e o príncipe Lucca.

À École polytechnique fédérale de Lausanne (EPFL), pelo magnífico estágio e estrutura, que permitiu que eu cruzasse mais uma fronteira do conhecimento.

À Marilza, por cuidar de mim como um filho, com amor e afinho, e possibilitar um lar na Riviera do Lake Léman.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), em especial ao Programa de pós-graduação em Farmacologia, pelo acolhimento durante esse período.

Aos funcionários do departamento de Farmacologia da FMRP-USP, José Waldik Ramon, e Gislaine Pedroso de Moraes, e as ex-funcionárias Fátima Helena Pentean e Sonia Maria Stefanelli pela atenção, competência e paciência nesses anos.

Ao suporte financeiro do CNPQ, da CAPES e em especial à FAPESP (processo: 13/08216-2; 2015/11742-3; 2016/09830-4).

Sem vocês, nada disso seria possível. Meu muito obrigado!

Obrigado senhor Deus, pelo dom da vitalidade, escolha e coragem. Pelo discernimento e perseverança que me permitiu trilhar o caminho até aqui.

“Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas.”

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

BARRETO, PA. **O envolvimento de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas com fenótipo vulnerável em camundongos nocautes para apoliproteína E.** 2018. 90 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A ativação de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) é associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), dentre elas a aterogênese. Entretanto, não foi elucidado se a ativação do AhR por compostos/moléculas endógenas influenciaria o desenvolvimento de placas vulneráveis. Diante do exposto, o presente estudo testou a hipótese que a ativação do AhR mediada por compostos/moléculas endógenas contribui para o processo aterogênico e vulnerabilidade da placa aterosclerótica de camundongos nocautes para apoliproteína E (ApoE^{-/-}). Nosso estudo mostrou que um dispositivo cilíndrico (*cast*), que promove estresse de cisalhamento baixo (ECB) e estresse de cisalhamento oscilatório (ECO), causa o desenvolvimento de placas ateroscleróticas com fenótipos vulnerável e estável de forma tempo dependente, em carótidas de camundongos ApoE^{-/-} submetidos a dieta western. Regiões com ECB, apresentaram aumento na expressão de IL-1 β , TNF- α , MMP-12 e do AhR, sugerindo que este receptor contribui com o processo inflamatório em placas vulneráveis, posto que ele regula a expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios. O tratamento com CH223191 (antagonista AhR) diminuiu a vulnerabilidade da placa aterosclerótica, pois reduziu a quantidade de macrófagos, lipídeos, a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e aumentou a quantidade de células de músculo liso (CML) em regiões com ECB. Além disso, o CH223191 reduziu a expressão de IL-1 β em placas ateroscleróticas presentes no arco aórtico e a hipercolesterolemia dos camundongos ApoE^{-/-}. Outrossim, nossos achados apontam que o CH223191 evita o prejuízo induzido por oxLDL na vasodilatação da artéria aorta de camundongos C57BL/6J. Em células endoteliais, a ativação do AhR mediada por oxLDL é responsável pela produção de IL-1 β , evento bloqueado pelo CH223191. Nossos achados destacam o AhR como alvo promissor na compreensão de DCV e possível alvo terapêutico na aterosclerose.

Palavras-chave: Aterosclerose, vulnerabilidade da placa aterosclerótica, Receptores de Hidrocarbonetos de Arila

ABSTRACT

BARRETO, PA. **Role of Aryl Hydrocarbon Receptors (AhR) in the development of atherosclerotic plaque vulnerability in apolipoprotein E knockout mice.** 2018. 90 p. Dissertation (Master of Sciences) – Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2018.

Aryl hydrocarbon receptor (AhR) activation is associated with the development of cardiovascular diseases, including atherosclerosis. However, it is unknown whether AhR activation by endogenous compounds/molecules plays a role in the development and vulnerability of the atherosclerotic plaque. We hypothesized that AhR activation by endogenous compounds/molecules promotes atherogenesis and contributes to the formation of vulnerable plaques in apolipoprotein E knockout mice (ApoE^{-/-}). A shear stress modifier (cylindrical device referred to as cast) was placed in the carotid arteries of ApoE^{-/-} mice, creating areas of lower shear stress (LSS) and oscillatory shear stress (OSS), and inducing the development of atherosclerotic vulnerable and stable plaques, respectively, in a time-dependent manner. LSS regions exhibited increased expression of IL-1 β , TNF- α , MMP-12 and AhR. Considering that AhR activation leads to transcription of proinflammatory markers transcription, it is possible that AhR expression in LSS regions is associated with the inflammatory process. Treatment with an AhR antagonist (CH223191) reduced lipid and macrophage accumulation and increased the smooth muscle cell content in LSS regions. Additionally, CH223191 reduced IL-1 β expression in atherosclerotic plaques in the aortic arch from hypercholesterolemic ApoE^{-/-} mice. Furthermore, CH223191 prevented oxLDL-induced vascular dysfunction (reduced ACh vasodilation) in C57BL/6J. In endothelial cells, oxLDL induced IL-1 β release by mechanisms dependent on AhR activation, an effect prevented by CH223191. Our findings point to AhR as a possible new therapeutic target in cardiovascular diseases, including atherosclerosis.

Keywords: Atherosclerosis, plaque vulnerability, aryl hydrocarbon receptor

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
AhR	Receptores de hidrocarbonetos de arila
AhRR	Repressor do receptor de hidrocarbonetos de arila
AIP	Proteína de interação com o AhR
ANOVA	Análise de Variância
Arnt	Translocador nuclear do AhR)
ApoE ^{-/-}	Nocaute para apoliproteína E
AVE	Acidente vascular encefálico
BaP	Benzo(a)pireno
BSA	Albumina sérica bovina
bHLH	Hélice-volta-hélice básico
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
Cast	Dispositivo cilíndrico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CH223191	1-Methyl-N- [2-methyl-4-[2-(2-methylphenyl) diazenyl]phenyl-1H-pyrazole-5-carboxamide
CML	Células de muscula liso
CMLV	Células de músculo liso vascular
CO ₂	Dióxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
c-Src	Proteína tirosina-quinase c-Src
Ct	Ciclo <i>threshold</i>
CYP1A1	Enzima do citocromo P450 1A1
DAPI	4, 6-diamidino-2-fenilindol
DCV	Doenças cardiovasculares
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol

ECA	Estresse de cisalhamento alto
ECB	Estresse de cisalhamento baixo
ECO	Estresse de cisalhamento oscilatório
EC ₅₀	Concentração efetiva de um agonista que produz 50% do efeito máximo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E _{max}	Efeito máximo produzido por uma agonista
<i>eNOS</i>	Sintase de óxido nítrico endotelial
E.P.M.	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
E-selectina	Selectina endotelial
FICZ	6-formilindolo [3,2-b] carbazole
HAP	Hidrocarboneto aromático policíclico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina & Eosina
Hsp90	Proteína de choque térmico 90
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IgG	Imunoglobulina G
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IP	Intraperitoneal
LBD	Domínio de interação para ligantes
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LXR	Receptor X do fígado
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado
mmLDL	LDL minimamente modificada
MMPs	Metaloproteinases de matriz

MMP-2	Metaloproteinase 2
MMP-9	Metaloproteinase 9
MMP-12	Metaloproteinase 12
mN	MiliNewton
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NFκ-B	Fator de transcrição nuclear-kappa B
NLS	Sequência de localização nuclear
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
oxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PAS	<i>Per-Arnt-Sim</i>
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PECAM-1	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária
PER	Proteína de período circadiano
<i>pD</i> ₂	Logaritmo negativo da concentração de uma droga que induz 50% do efeito máximo
PMSF	Fluoreto de fenilmetil-sulfonil
PRR	Receptores para reconhecimento de padrões
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SFB	Soro fetal bovino
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIM	<i>Single-minded protein</i>
TAD	Domínio de transativação
TBS	Tampão salina tris
TBS-T	Tampão salina tris com <i>tween-20</i>
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM	Molécula de adesão celular-vascular
XRE	Elementos de resposta a xenobióticos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenvolvimento de lesões ateroscleróticas	26
Figura 2 - Via de sinalização canônica e não-canônica do AhR	29
Figura 3 - Representação esquemática da hipótese deste estudo	31
Figura 4 - Representação esquemática dos padrões de estresse de cisalhamento promovidos pelo <i>cast</i>	36
Figura 5 - Alterações no estresse de cisalhamento promovem desenvolvimento de placas ateroscleróticas	50
Figura 6 - Alterações no estresse de cisalhamento aumentam a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias	51
Figura 7 - Alterações no estresse de cisalhamento aumentam a expressão gênica de MMP-12	52
Figura 8 - Alterações no estresse de cisalhamento aumentam a expressão gênica do AhR	53
Figura 9 - CH223191 não altera a evolução ponderal de animais submetidos a dieta hipercolesterolêmica.....	55
Figura 10 - Tratamento com CH223191 reduz o conteúdo lipídico em placas ateroscleróticas com fenótipo vulnerável	57
Figura 11 - Tratamento com CH223191 reduz o conteúdo de macrófagos em placas ateroscleróticas com fenótipo vulnerável	58
Figura 12 - Tratamento com CH223191 não altera o conteúdo de macrófagos em placas ateroscleróticas com fenótipo estável	59

Figura 13 - Tratamento com CH223191 aumenta o conteúdo de α -actina em placas ateroscleróticas com fenótipo vulnerável	60
Figura 14 - Tratamento com CH223191 não altera o conteúdo de α -actina em placas ateroscleróticas com fenótipo estável	61
Figura 15 - Tratamento com CH223191 não altera o conteúdo de colágeno em placas ateroscleróticas com fenótipo vulnerável	62
Figura 16 - Tratamento com CH223191 não altera o conteúdo de colágeno em placas ateroscleróticas com fenótipo estável	63
Figura 17 - Tratamento com CH223191 reduz a geração de EROs em placas ateroscleróticas com fenótipo vulnerável	64
Figura 18 - Tratamento com CH23191 reduz a expressão de IL-1 β em placas ateroscleróticas presentes no arco aórtico	65
Figura 19 - CH223191 impede a disfunção endotelial promovida por oxLDL... ..	68
Figura 20 - CH223191 reduz a expressão de IL-1 β promovida por oxLDL	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil lipídico dos camundongos ApoE ^{-/-} tratados com CH223191	56
Tabela 2. Valores de pD_2 e Emax de ACh em aortas de camundongos C57BL/6J incubadas com oxLDL e CH223191	68

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	21
Doenças cardiovasculares e a aterosclerose	21
Histórico	21
Fisiopatologia da aterosclerose.....	22
Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR).....	26
Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) e a aterosclerose	29
OBJETIVOS	33
Objetivo geral	33
Objetivos específicos.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
Animais.....	35
Modelo animal de vulnerabilidade da placa aterosclerótica.....	35
Análise da formação e progressão da placa aterosclerótica	36
Preparação das amostras, lâminas e coloração	36
Expressão de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) e mediadores pró-inflamatórios	37
PCR em tempo real.....	37
Tratamentos farmacológicos.....	39
Análise dos marcadores que determinam a vulnerabilidade da placa aterosclerótica	40
Preparação das amostras	40
Imunofluorescência	40
Coloração com <i>Picrosirius red</i>	41
Coloração <i>Oil red-O</i>	41
Avaliação do estresse oxidativo	42
Aquisição e análise das imagens	42
Dosagens bioquímicas no soro	42
Expressão do mediador pró-inflamatório IL-1 β	43
Quantificação proteica por Western Blotting	43
Análise da (dis)função endotelial	44
Estudo da reatividade vascular em anéis de aorta isolada	44

Cultivo celular	45
ELISA.....	46
Análise estatística	46
RESULTADOS	49
Análise morfológica da formação e progressão da placa aterosclerótica	49
Expressão de mediadores pró-inflamatórios	51
Expressão e atividade de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR)	53
Considerações I	54
Evolução ponderal dos animais mantidos em dieta hipercolesterolêmica e tratados com antagonista de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR).....	55
Influência do antagonismo dos Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) sobre o perfil lipídico.....	56
Influência do antagonismo de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) sobre a vulnerabilidade da placa aterosclerótica.....	57
Influência do antagonismo de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) sobre a expressão de IL-1 β em placas ateroscleróticas presentes no arco aórtico	65
Considerações II	66
Influência do antagonismo de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) sobre a (dis)função endotelial	67
Considerações III.....	70
CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXOS.....	90
Certificado da Comissão de Ética.....	90

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares e a aterosclerose

As doenças cardiovasculares (DCV), causadas por alterações funcionais ou estruturais dos vasos sanguíneos e/ou coração, representam a principal causa de morbimortalidade global (Hardman et al., 2014; Maron et al., 2006). Dados indicam que 17,7 milhões, cerca de 30% das mortes em todo o mundo, são decorrentes de eventos cardiovasculares. A maioria desses óbitos são resultantes de ataques cardíacos e acidentes vasculares encefálicos (AVE), sendo comumente precoces (World Health Report, WHO, 2017).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, as DCV também constituem a principal causa de óbitos. No ano de 2015, dos 1.264.175 óbitos registrados no sistema de informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), 349.642 foram decorrentes de DCV (Brasil, 2015).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o infarto do miocárdio (IM) e o AVE representam, respectivamente, a primeira e a segunda causa de mortalidade mundial, sendo o AVE a primeira causa no Brasil (Brasil, 2015; World Health Report, WHO, 2009). Mais de 15 milhões de pessoas são vítimas de AVE a cada ano em todo o mundo, o que resulta em 5 milhões de mortes e um número igual de pessoas permanentemente inválidas (World Health Report, WHO, 2009).

Esses eventos cardiovasculares costumam estar associados a outras condições clínicas, dentre as quais se destaca a aterosclerose. A aterosclerose é uma doença multifatorial e estudos epidemiológicos fornecem evidências que a mesma possui íntima relação com diversos fatores de risco, entre os quais: idade, sexo masculino, histórico familiar, hipertensão arterial, diabetes mellitus, tabagismo, obesidade e dislipidemias (Anderson et al., 1991; Ezzati et al., 2006; Psaltopoulou et al., 2017).

Histórico

O termo aterosclerose foi determinado por Marchand em 1904, após Monckeburg descrever que os processos de calcificação ocorridos na camada média e íntima possuíam etiologias distintas. Monckeburg postulou, em 1903, que os eventos

decorrentes de alterações na camada íntima culminavam na formação de um ateroma (Gotto, 1985).

Acreditava-se que essa condição estava associada principalmente ao estilo de vida moderno, o que lhe conferiu o título de doença contemporânea. Entretanto, estudos recentes mostraram que a aterosclerose pode ser uma doença que surgiu há mais de 4000 mil anos, posto que a análise da vasculatura de diferentes populações anciãs, de distintos períodos históricos, mostrou processo de calcificação nas artérias desses indivíduos (Thompson et al., 2013).

Na idade contemporânea, um dos primeiros relatos sobre essa condição data do século XVIII, ano de 1793, quando Edwuard Jenner, ao dissecar o cadáver de um indivíduo falecido com angina *pectoris*, detectou nas artérias coronárias um processo de calcificação contendo um coágulo e vasos sanguíneos (Linden et al., 2014). Cerca de 10 anos após esse relato, foi publicado no livro do anatomista italiano Antonio Scarpa, uma descrição clara desse processo (Gotto, 1985).

Os estudos sobre a aterosclerose foram retomados intensamente no século XX, quando Nikolai N. Anitschkow, em 1913, publicou que a hipercolesterolemia e a deposição lipídica na parede vascular possuíam papel importante para o desenvolvimento dessa doença (Buja, 2014). Logo após esse período, a pesquisa nesse âmbito voltou-se para a hipótese lipídica. No entanto, é importante destacar que Rudolph Virchow, já no século XIX, sugeria que essa condição estava associada à instalação de um processo inflamatório (Gotto, 1985; Linden et al., 2014).

Atualmente sabe-se que a aterosclerose é uma doença multifatorial e que tanto o colesterol quanto o processo inflamatório desempenham papel fundamental em seus mecanismos de desenvolvimento e progressão (Bergheanu et al., 2017).

Fisiopatologia da aterosclerose

A aterosclerose possui caráter crônico e afeta segmentos específicos da árvore arterial. Desenvolve-se em artérias de médio e grande calibre, especialmente em regiões de bifurcação e ramificação, locais onde o fluxo sanguíneo deixa de ser laminar e torna-se turbilhonado, por conseguinte, onde o estresse de cisalhamento apresenta-se baixo ou oscilatório. Essas alterações hemodinâmicas levam à perda do efeito protetor do estresse de cisalhamento, permitindo que a camada íntima (endotelial) sofra modificações pró-aterogênicas (Landmesser et al., 2004; Libby, 2012; Pedersen et al., 1999).

Alterações de adesividade, permeabilidade, capacidade proliferativa e trombogênese são os principais elementos de resposta à injúria endotelial. A princípio, alterações hemodinâmicas provocam estímulos lesivos às células endoteliais e intensificam o estresse oxidativo vascular, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e causando consequente redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (*nitric oxide* - NO) (Landmesser et al., 2004; Libby, 2012; Pedersen et al., 1999).

A redução da atividade vasoprotetora e anti-inflamatória do NO ativa o fenótipo pro-trombótico das células endoteliais, que passam a expressar moléculas de adesão, como as integrinas [molécula de adesão intercelular (*intercellular adhesion molecule* - ICAM) e molécula de adesão celular-vascular (*intercellular adhesion molecule* - VCAM)] e selectinas [selectina endotelial (*endothelial selectin* - E-selectina), e aumento de permeabilidade a macromoléculas (Landmesser et al., 2004; Mullenix et al., 2005).

Com a instalação do processo inflamatório e aumento da permeabilidade endotelial, as moléculas de colesterol carregadas por lipoproteínas de baixa densidade (*low density lipoproteins* - LDL) atravessam a camada íntima, ficam retidas na matriz extracelular subendotelial e são minimamente modificadas por EROs (Henriksen et al., 1981; Parhami et al., 1993; Tabas et al., 2007).

As partículas de LDL minimamente modificadas (*minimally modified low density lipoprotein* - mmLDL) interagem com células endoteliais por meio de receptores CD36 e estimulam a produção e secreção de mediadores pró-inflamatórios, como interleucina-1 beta (*interleukin-1 β* - IL-1 β), interleucina-6 (*interleukin-6* - IL-6), fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor-alpha* - TNF- α) e proteína quimiotática de monócitos (*monocyte chemoattractant protein-1* - MCP-1). A MCP-1 recruta monócitos para a região subendotelial e estes, por sua vez, diferenciam-se em macrófagos em resposta ao fator estimulador de colônias de macrófagos (*macrophage colony-stimulating factor* - M-CSF) liberado pelo endotélio. Na camada subendotelial, os macrófagos completam o processo de oxidação das mmLDL (Christensen et al., 2016; Gu et al., 1998; Henriksen et al., 1981; Tabas et al., 2007; Westhorpe et al., 2012).

Por meio do aumento da expressão de receptores para reconhecimento de padrões (pattern recognition *receptor* - PRR), especialmente os do tipo *Toll-Like 4*, os macrófagos internalizam as LDL oxidadas (oxidized low density lipoprotein - oxLDL) e, na tentativa falha em fagocitá-las, ficam saturados de radicais livres degenerativos, transformando-se em células espumosas que dão origem às lesões ateroscleróticas

iniciais, denominadas estrias gordurosas (Higashimori et al., 2011; Nicolaou & Erridge, 2010; Parhami et al., 1993).

Paralelamente, em resposta à injúria endotelial, plaquetas recrutadas pelo processo inflamatório das células endoteliais produzem fatores de crescimento. Os produtos liberados influenciam as células de músculo liso vascular (CMLV) a mudarem seu perfil/fenótipo - de contrátil para sintético - e migrarem para o foco do processo inflamatório, a matriz extracelular subendotelial (Bentzon et al., 2014; Shah & Galis, 2001).

Neste local, as CMLV passam a produzir proteínas da matriz extracelular, como colágeno, e começam a envolver as estrias gordurosas, formando uma capa fibrosa, principal responsável pela estabilidade da placa aterosclerótica, visto que reveste o conteúdo lipídico e inflamatório das lesões gordurosas. Esse processo leva ao remodelamento da parede arterial, que é compensado por uma dilatação gradual sem prejuízo ao *lúmen* (Bentzon et al., 2014; Tabas et al., 2007).

O estágio de remodelamento expansivo das lesões fibrogordurosas, decorrentes principalmente da ampliação do núcleo e redução da capa fibrosa, aumenta progressivamente a dimensão da placa, propiciando a diminuição do *lúmen* e consequente vulnerabilidade da placa aterosclerótica (Bentzon et al., 2014; Libby, 2002).

Placas ateroscleróticas com fenótipo vulnerável são aquelas cuja quantidade de CMLV e colágeno apresentam-se reduzidas, ao passo que o núcleo torna-se gradativamente extenso e necrótico, resultado do acúmulo de restos celulares, alto teor lipídico, infiltrado de macrófagos ativos e intenso processo inflamatório, além de microvasos intraplaca, com hemorragias abundantes e frequentes (Naghavi et al., 2003; Stoll and Bendszus, 2006).

A presença de microvasos representa um dos principais fatores de risco para a vulnerabilidade da placa e consequente rotura, visto que se desenvolvem em toda extensão e contribuem com a migração monocitária local. O resultante aumento de células espumosas, e de seus produtos, tais como as catepsinas e metaloproteinases de matriz (MMPs), bem como o rompimento dos microvasos e a erosão superficial no endotélio, possibilitam a agregação plaquetária e posterior formação de trombo, desencadeando a ocorrência de eventos isquêmicos agudos que levam ao IM e AVE (Bentzon et al., 2014; Hopkins, 2013; Libby, 2005)

Como supracitado, o estresse de cisalhamento na parede arterial representa fator importante na aterogênese, não somente para a disfunção endotelial, uma vez que

alterações em seus padrões podem determinar modificações das respostas celulares e até mesmo o tipo e tamanho da placa aterosclerótica (Cheng et al., 2007; Cheng et al., 2006).

O estresse de cisalhamento baixo (ECB), através de eventos de mecanotransdução, é capaz de ativar fatores de transcrição. O fator de transcrição nuclear-kappa B (*factor nuclear kappa B* - NFκ-B), ativado por alterações do estresse de cisalhamento, pode estimular a transcrição de genes que regulam negativamente a produção de NO e positivamente a expressão de mediadores pró-inflamatórios. Nesse sentido, ao se introduzir um dispositivo capaz de alterar o fluxo laminar, e promover ECB ou estresse de cisalhamento oscilatório (ECO) em distintas regiões das carótidas de camundongos deficientes para apoliproteína E (ApoE^{-/-}), observa-se distinção entre a expressão gênica e proteica da enzima oxido nítrico sintase endotelial (*endothelial nitric oxide synthase* - eNOS), bem como da *molécula* de adesão celular endotelial plaquetária 1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule 1* - PECAM-1), com diminuição de ambas na região de ECB (Cheng et al., 2006; Cheng et al., 2005; Davies, 1995).

Em consonância, regiões de ECB apresentam precocemente placas ateroscleróticas com processo expansivo, bem como aumento de estresse oxidativo, conteúdo lipídico, número de macrófagos e atividade de MMPs, quando comparadas a regiões de ECO. Além disso, há redução da quantidade de colágeno e de CMLV nessas áreas (Cheng et al., 2007; Fraga-Silva et al., 2014).

Diante disso, os estudos fazem relações entre o estresse de cisalhamento e os fenótipos da placa aterosclerótica, onde regiões de ECB e ECO estão mais propensas a desenvolver placas vulneráveis e estáveis, respectivamente (Cheng et al., 2005).

Em síntese, a fisiopatologia da aterosclerose ocorre através de um processo dinâmico e integrativo, haja vista que os eventos descritos ocorrem em concomitância. Para fins didáticos, esses acontecimentos podem ser divididos em quatro estágios principais: disfunção endotelial e inflamação vascular; deposição, retenção e modificação das partículas de LDL, e formação de células espumosas; desenvolvimento de lesões fibrogordurosas e remodelamento arterial; precipitação de eventos agudos isquêmicos (Hopkins, 2013).

Figura 1 - Desenvolvimento de lesões ateroscleróticas – A disfunção vascular associada a hipercolesterolemia e instalação do processo inflamatório configura o estágio inicial da lesão aterosclerótica; a expansão do núcleo necrótico e diminuição da capa fibrosa, com consequente intensificação do processo inflamatório ocorre em estágio avançado. A ruptura da placa aterosclerótica e perda da capa fibrosa e da camada íntima levam à formação do trombo, o que resulta no desenvolvimento de eventos isquêmicos. Adaptado de Hopkins (2013).

Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR)

O AhR foi descrito pela primeira vez na década de 1970, por um grupo de pesquisadores da Universidade de Rochester, Estados Unidos da América (USA). O grupo do pesquisador Alan Poland descobriu essa proteína ao investigar o motivo do composto 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) promover porfiria cutânea tardia em trabalhadores da indústria (Poland et al., 1976; Poland et al., 1974; Poland et al., 1971).

A priori, essa interessante proteína foi investigada por seu papel na indução de enzimas do metabolismo de xenobióticos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP). Os estudos sobre o AhR avançaram nessa direção e logo foi descoberto que a interação de AhR com HAP influencia a atividade de receptores e gera metabólitos tóxicos ao organismo (Bradshaw and Bell, 2009; Poland et al., 1976).

Posteriormente, mostrou-se que o AhR possui semelhança com os receptores nucleares, sendo, portanto, incluído nesta superfamília (Okey et al., 1979). Entretanto, em 1990, após a clonagem de sua molécula, constatou-se que essa proteína não é um típico receptor nuclear, pois possui domínio estrutural proteico hélice-volta-hélice básico (*basic helix, loop helix*, bHLH) e um domínio *Per-Arnt-Sim* [PAS; PER (proteína de período circadiano, *period circadian protein*)-ARNT (translocador nuclear de AhR, *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*)-SIM (*single-minded protein*)], fazendo parte da família de proteínas com domínio bHLH/PAS (Burbach et al., 1992).

O domínio bHLH é N-terminal e consiste numa região de aminoácidos conservados que dão origem a duas α -hélices, separadas por uma alça relativamente não-conservada, e em uma região de aminoácidos básicos. O domínio bHLH é importante no processo de dimerização do AhR com a chaperona proteína de choque térmico 90 (*heat shock protein 90* - Hsp90), com o translocador nuclear do AhR (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* - Arnt) e também com o ácido desoxirribonucleico (DNA) (Abel & Haarmann-Stemmann, 2010).

O domínio PAS está próximo à região C-terminal do domínio bHLH, sendo composto por cerca de 300 aminoácidos, divididos em subdomínios PAS-A e PAS-B. Esse domínio funciona como sítio de acoplamento para Hsp90 e também como domínio de interação para ligantes (*ligand-binding domain* - LBD). Outrossim, na região C-terminal do AhR há domínio de transativação (*transactivation domain* - TAD), que interage com co-fatores transcrpcionais (Abel & Haarmann-Stemmann, 2010).

Estruturalmente, o AhR está associado a um complexo proteico composto pelas seguintes proteínas regulatórias: Hsp90, proteína de interação com o AhR (*aryl hydrocarbon receptor-interacting protein* - AIP), co-chaperona p-23 e a proteína tirosina-quinase c-Src (c-Src). Essas proteínas são responsáveis por manter uma conformação de alta afinidade para ligantes e prevenir a degradação proteolítica desse fator de transcrição (Ma and Whitlock, 1997; Stockinger et al., 2014).

Ao ser ativado pela interação com o ligante ou por outros estímulos celulares, o AhR sofre mudança conformacional, o que permite a exposição da região de sequência de localização nuclear (*nuclear localization sequence* - NLS). A exposição possibilita a interação com a proteína importina, responsável por mediar a translocação do AhR do citosol para o núcleo. Nesse processo, o AhR se dissocia do complexo proteico e forma um heterodímero com o Arnt (Ikuta et al., 1998).

Este heterodímero AhR-Arnt se liga a regiões genômicas que apresentam

elementos de resposta a xenobióticos (*xenobiotic response element* - XRE) e induz a transcrição de genes vizinhos a estas regiões, como a enzima do citocromo P450 1A1 (CYP1A1), via clássica de ativação do AhR (Whitelaw et al., 1993).

Por vias genômicas não clássicas, o AhR pode se associar a outros fatores de transcrição e o heterodímero pode interagir com diferentes regiões gênicas. Quando o AhR forma um heterodímero com o NF- κ B, pode se ligar a regiões que apresentam elementos de resposta ao NF- κ B, induzindo a expressão de genes pró-inflamatórios (Vogel et al., 2007; Vogel et al., 2004).

O AhR é ubiquitinado após translocação nuclear, sendo destinado à degradação proteossomal. Outro mecanismo de regulação do AhR envolve interação com o repressor do AhR (*aryl hydrocarbon receptor repressor* - AhRR), cuja expressão é regulada positivamente pelo próprio AhR quando ativado. O AhRR é estruturalmente semelhante ao AhR na região N-terminal do domínio bHLH. Esta semelhança faz com que AhRR e AhR compitam pelo mesmo sítio de ligação (Davarinos & Pollenz, 1999; Ma & Baldwin, 2000).

O AhR possui importante papel na proliferação e diferenciação celular, dentre outros processos fisiológicos e imunológicos. Além disso, nos últimos anos ele tem sido alvo de estudos para compreensão da fisiopatologia de diversas doenças, tais como o câncer, artrite reumatoide, asma e DCV (Barouki et al., 2012; Vasquez et al., 2003).

Figura 2 – Via de sinalização canônica e não-canônica do AhR – O AhR reside no citosol acoplado a um complexo proteico que facilita sua interação com o ligante; ao ser ativado o AhR se desacopla do complexo proteico sendo transportado para o núcleo pela proteína importina. No núcleo, o AhR forma um heterodímero com outras proteínas, liga-se à regiões específicas do DNA e participa da transcrição gênica. Ao se desligar do DNA, o AhR é transportado novamente ao citosol e degradado. AhR (receptor de hidrocarbonetos de arila); Arnt (translocador nuclear do AhR); Hsp90 (proteína de choque térmico 90); p23 (co-chaperona p23); AIP (proteína de interação com o AhR); c-Src (proteína tirosina-quinase c-Src); Receptor de estrógeno (ER); NF-κB (fator de transcrição nuclear-kappa B); XEM (enzimas do metabolismo de xenobióticos); MMP-1 (metaloproteinase 1); IL (interleucina) -2, IL-1β, IL-6, IL22; TNF-alfa (fator de necrose tumoral alfa); PGHS (prostaglandina sintase); iNOS (óxido nítrico sintase induzida). Adaptado de Esser & Ranung (2015).

Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) e a aterosclerose

O AhR é expresso em todas as células relacionadas ao processo aterogênico. Em células endoteliais, a ativação do AhR por bifenilos policlorados aumenta o estresse oxidativo, diminuindo a biodisponibilidade de NO vascular (Iwano et al., 2005).

O aumento do estresse oxidativo ocorre por dois mecanismos distintos e está relacionado à ativação de vias não-genômicas e genômicas. O primeiro envolve o

desacoplamento do complexo proteico e liberação da c-Src para o citosol, desencadeando a ativação do complexo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido [NAD(P)H]. O segundo mecanismo envolve o desacoplamento da CYP1A1 após a metabolização de dioxinas (Adelibieke et al., 2014; Iwano et al., 2005; Pernomian & da Silva, 2015; Reichard et al., 2006).

Por mecanismos independentes do aumento de estresse oxidativo, a ativação do AhR por Benzo(a)pireno (BaP), um HAP, aumenta a expressão de ICAM em células endoteliais (Oesterling et al., 2008). Além disso, estimula a produção de MMP-2 e MMP-9 em CMLV, o que contribui para proliferação e migração dessas células com posterior degradação de colágeno presente na placa aterosclerótica (Kerzee & Ramos, 2000; Meng et al., 2009).

Por vias genômicas não clássicas, o AhR, quando ativado por TCDD, pode aumentar o acúmulo de colesterol em macrófagos. Esse evento é decorrente da interação do AhR com o NFκ-B e transcrição da interleucina-8 (*interleukin-8 – IL-8*). Acrescido a isso, sabe-se que ativação do AhR aumenta a expressão de MMP-12, a qual está associada à atividade de macrófagos na região da placa aterosclerótica e maturação das células espumosas (Vogel et al., 2007; Vogel et al., 2004).

Em camundongos ApoE^{-/-}, a ativação do AhR por TCDD acelera o processo aterogênico, quadro esse inibido pelo antagonista do AhR, CH223191 (1-Methyl-N- [2-methyl-4-[2-(2-methylphenyl) diazenyl] phenyl-1H-pyrazole-5-carboxamide). De fato, a exposição a dioxinas contribui para o desenvolvimento de doenças inflamatórias, como a aterosclerose, sendo esses processos diretamente associados à atividade do AhR (Wu et al., 2011).

Além dos estudos que relacionam a atividade do AhR mediada por xenobióticos ao processo aterogênico, alguns estudos indicam que o AhR pode participar desse processo de maneira independente da metabolização de compostos tóxicos. Uma vez que este receptor possui funções fisiológicas e sua ativação endógena é necessária para o adequado desenvolvimento vascular (Fernandez-Salguero et al., 1997; Walisser et al., 2004), sabe-se que sua ativação não está relacionada apenas a compostos xenobióticos, mas também a outros compostos e moléculas de diferentes classes ou, ainda, a eventos mecânicos (McMillan & Bradfield, 2007; Wu et al., 2011).

Diante disso, usando um modelo *in vitro* de dinâmica de fluidos, foi demonstrando que o estresse de cisalhamento é capaz de ativar o AhR de células endoteliais. Esse estudo demonstrou que moléculas de oxLDL também ativam esse receptor e que a combinação

de ambos os estímulos gera um sinergismo de ativação (McMillan and Bradfield, 2007).

Embora seja descrito que o AhR participa do processo aterogênico, não encontramos estudos que relacionam diretamente a ativação deste receptor por ligantes/ativadores endógenos e sua participação na aterosclerose. Deste modo, considerando que 1) a ativação de AhR pode levar a produção de mediadores pró-inflamatórios; 2) existe relação direta entre a ativação de AhR e mecanismos pró-aterogênicos, como o estresse oxidativo; 3) ligantes endógenos, como a oxLDL, são capazes de ativar AhR, o presente estudo testou a seguinte hipótese:

A ativação do AhR mediada por compostos/moléculas endógenas contribui para o processo aterogênico e vulnerabilidade da placa aterosclerótica de camundongos em ApoE^{-/-}.

Figura 3 – Representação esquemática da hipótese deste estudo - A ativação do AhR, mediada por compostos/moléculas endógenas, contribui para o processo aterogênico e vulnerabilidade da placa aterosclerótica em camundongos ApoE^{-/-}.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o papel da ativação de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) mediada por compostos/moléculas endógenas no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em camundongos nocautes para apoliproteína E submetidos a alterações no estresse de cisalhamento

Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil inflamatório associado aos fenótipos das lesões ateroscleróticas em carótidas de camundongos ApoE ^{-/-};
- Determinar a expressão e atividade do AhR nos fenótipos das lesões ateroscleróticas em carótidas de camundongos ApoE ^{-/-};
- Identificar se a ativação do AhR influencia a expressão de marcadores da vulnerabilidade da placa aterosclerótica;
- Determinar se a disfunção endotelial promovida por oxLDL é mediada pela ativação do AhR;
- Avaliar se a resposta inflamatória mediada por oxLDL é dependente da ativação do AhR.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

O protocolo para uso de animais em experimentação está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMRP - USP) de Ribeirão Preto (protocolo nº 120/2015).

No presente estudo foram utilizados camundongos nocautes para apolipoproteína E ($ApoE^{-/-}$), com mutação alvo para $Apoetm1Unc$, machos, com 15 semanas de idade, provenientes do biotério de camundongos isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. Foram também utilizados camundongos C57BL/6J machos com idade de 10-12 semanas, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Todos os animais foram mantidos em salas com temperatura entre 23-25°C, ciclos claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à ração e água.

Modelo animal de vulnerabilidade da placa aterosclerótica

Os camundongos $ApoE^{-/-}$, com 15 semanas de idade, receberam dieta tipo Western [(manteiga de cacau 15% e colesterol 0,5%) PragSoluções, Brasil]. Após 2 semanas de início da dieta western, os animais foram anestesiados com xilazina (15 mg/Kg) e cetamina (150 mg/Kg) para a implantação de um dispositivo cilíndrico (*cast*, Figura 4) na artéria carótida direita. Este dispositivo cilíndrico é composto por duas metades longitudinais com lúmen em formato cônico (Cheng et al., 2007).

A geometria do *cast* foi desenvolvida para produzir alterações de fluxo sanguíneo local. A região em que o *cast* é implantando sofre estresse de cisalhamento alto (ECA) e apresenta-se ateroprotetida. A porção superior é submetida ao estresse de cisalhamento oscilatório (ECO) favorecendo a formação de placas estáveis, sendo a porção inferior exposta ao estresse de cisalhamento baixo (ECB) proporcionando o desenvolvimento de placas vulneráveis [(Figura 4), Cheng et al., 2006)].

Figura 4 – Representação esquemática dos padrões de estresse de cisalhamento promovidos pelo *cast* - A estenose promovida pelo *cast* modifica o padrão laminar do fluxo sanguíneo e promove alterações no estresse de cisalhamento: na região inferior ao *cast* o estresse de cisalhamento torna-se baixo (ECB), na região do *cast* o estresse de cisalhamento torna-se alto (ECA), na região superior ao *cast* o estresse de cisalhamento torna-se baixo (ECB). Reproduzido a partir de Cheng et.al, (2006).

Análise da formação e progressão da placa aterosclerótica

Para avaliação temporal das características morfológicas das lesões ateroscleróticas nos camundongos ApoE^{-/-}, o *cast* foi implantado na carótida direita dos animais. Após 3, 6 e 9 semanas do implante do *cast*, os animais foram sacrificados em câmara de dióxido de carbono (CO₂), seus tecidos coletados e destinados para os devidos fins.

Preparação das amostras, lâminas e coloração

As distintas regiões da carótida foram fixadas por 24 horas em paraformaldeído a 4%. As etapas seguintes envolveram a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e 100%) por 30 minutos, com posterior diafanização em

solução de xilol e álcool etílico absoluto (1:1) por 30 minutos e em xilol por 1 hora, com posterior inclusão em parafina.

Os tecidos incluídos em parafina foram cortados em micrótomo na espessura de 10 µm, obedecendo o critério de, após 5 cortes sequenciais, haver intervalo de 10 µm, para então ser obtida outra série de 5 cortes. Esse procedimento foi reproduzido por 10 vezes. Logo, foram obtidas 5 lâminas, com 10 cortes cada, para posterior coloração.

Para a coloração de Hematoxilina & Eosina (HE), inicialmente os cortes das lâminas foram submetidos ao processo de desparafinização através da imersão em xilol, 3 vezes por 5 minutos. Em seguida, foram imergidos em solução de xilol e álcool etílico absoluto (1:1) e, logo após, somente em álcool etílico absoluto; ambas imersões por 5 minutos. A seguir, os cortes foram hidratados em série decrescente de álcool etílico, até a concentração de 50%, e, finalmente, lavados em água por 10 minutos.

Seguida a hidratação, as lâminas foram imersas no corante hematoxilina por 3 minutos e, logo após, lavadas em água por 10 minutos, sendo imersas no corante eosina por 2 minutos. Para concluir, os cortes corados foram novamente desidratados e diafanizados, sendo montados com meio de montagem Permount® (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e lamínulas.

Expressão de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) e mediadores pró-inflamatórios

Para verificar a relação entre a expressão do AhR nos seguimentos das artérias carótidas dos animais submetidos ao implante do *cast* por 3, 6 e 9 semanas, bem como sua ativação e possível relação com mediadores pró-inflamatórios, além do processo inflamatório nas regiões de ECB e ECO, a expressão gênica dos seguintes alvos foi avaliada: AhR; CYP1A1; IL-1β; TNF-α; MMP-12. Para cada *n* experimental foi necessário um pool de 3 seguimentos da mesma região arterial.

PCR em tempo real

A expressão do RNAm do AhR, bem como de mediadores pró-inflamatórios, foi determinada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real). Os tecidos foram retirados dos animais e rapidamente congelados em nitrogênio líquido. Os mesmos foram homogeneizados e imergidos em tubos contendo 1 mL de Trizol® (Life

Technologies, Carlsbad, CA, USA). Para extração do RNA, foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol®. Os tubos foram agitados vigorosamente durante 15 segundos e incubados por 3 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas (12000 g, por 15 minutos, a 4°C);

Para precipitação do RNA, a fase aquosa (superior) foi transferida para outro tubo e foram acrescentados 500 µL de álcool isopropílico. Os tubos foram misturados por inversão e incubados a -20°C por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (12000 g, por 15 minutos, a 4°C). O sobrenadante foi desprezado e 1 mL de álcool etílico absoluto foi adicionado ao *pellet*. As amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 12000 g, por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi vertido e o *pellet* deixado à temperatura ambiente por 5-10 minutos. O *pellet* foi ressuspensionado em 10 µL de água DEPC (dietilpirocarbonato).

A quantificação foi realizada por espectrofotometria (260 nm) no aparelho Nanodrop® (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). O critério de pureza utilizado foi a razão 260/280 nm (ácido nucléico/proteína) de aproximadamente 1,8. Uma razão menor que 1,8 é indicativo de contaminação por proteínas. A concentração foi fornecida em ng/µL e foram utilizados para leitura 2 µL de amostra.

A reação de transcrição reversa é o processo pelo qual o ácido ribonucleico (RNA) é usado como um molde para sintetizar ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA). Para esta reação foi utilizado o Kit Multiscribe reverse transcription (Multiscrib RT®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A reação foi preparada com 2 µL de tampão (10x), 2 µL de solução de sondas (*primers*) randômicas (10x), 0,8 µL de solução de trifosfatos desoxirribonucleotídeos [(dNTPs) 25x], 1 µL de solução de enzima Multiscrib RT, 1 µL de inibidor de RNase, 1 µL de solução de primers oligo-dT (0,5 ng/µL), 2,2 de água DEPC, 1 µg (volume ajustado com água DEPC para 10 µL) de cada amostra de RNA, totalizando um volume de 20 µL.

As amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos, a 37°C por 120 minutos e a 85°C por 5 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até realização das reações de PCR em tempo real.

A expressão dos genes foi quantificada pelo sistema TaqMan (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Este sistema utiliza sonda fluorescente para permitir a detecção de produto específico conforme este se acumula durante os ciclos de PCR. Uma sonda (oligonucleotídeo) é construída contendo um corante sinalizador (*reporter*) fluorescente na extremidade 5' e um corante silenciador (*quencher*) na

extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do silenciador reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante sinalizador através da transferência de energia por ressonância de fluorescência através do espaço. Se a sequência alvo estiver presente, a sonda se anela logo após a um dos *primers* e é clivada pela atividade da nuclease 5' da Taq DNA polimerase enquanto o *primer* é estendido. Esta clivagem da sonda separa o corante sinalizador do corante silenciador, aumentando o sinal do primeiro, além de remover a sonda da fita alvo, permitindo que a extensão do *primer* continue até o final da fita molde.

As amostras foram incubadas a 50°C por 2 minutos e, em seguida, a 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto no aparelho 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real foi realizada em um volume final de 13 µL contendo oligonucleotídeos específicos, que foram construídos a partir de informações retiradas do GENE BANK.

Foi fixado um valor de limiar (*threshold*) para cada gene. O *threshold* é um nível de sinal do corante sinalizador normalizado utilizado para determinação do Ct (ciclo *threshold*) em ensaios de tempo real. Ele deve ser ajustado acima do sinal fluorescente de fundo emitido durante os primeiros ciclos antes do instrumento de PCR em tempo real detectar a amplificação do produto (*baseline*). O Ct é o número do ciclo no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha *threshold*. Os valores de Ct são logarítmicos e são usados para as análises quantitativas. A expressão gênica foi analisada pelo método de $2^{\Delta\Delta Ct}$. A média de Ct e desvio padrão das duplicatas foram calculados. Se o desvio padrão foi maior que 0,2 ciclos, o valor da duplicata mais discrepante foi excluído e a média, recalculada. As expressões relativas [gene alvo/gene controle interno (*housekeeping*)] foram calculadas pelo método $2^{\Delta\Delta Ct}$.

Tratamentos farmacológicos

Os camundongos ApoE^{-/-}, alimentados com dieta tipo Western e submetidos ao implante do *cast*, foram tratados com antagonista do AhR, CH223191 (Tocris Bioscience, Bristol, UK). O tratamento intraperitoneal (IP) com a dose de 2,5 mg/kg foi realizado por 21 dias consecutivos, entre a terceira e sexta semanas após o implante do *cast*. Ao término do tratamento os animais foram sacrificados, os tecidos foram coletados e destinados aos seus respectivos objetivos.

Análise dos marcadores que determinam a vulnerabilidade da placa aterosclerótica

Para avaliar os efeitos do tratamento do CH223191 sobre as lesões ateroscleróticas formadas pelo implante do *cast*, os seguintes parâmetros foram considerados:

- Infiltrado de macrófagos: marcação para CD68;
- Conteúdo de células de músculo liso vascular: marcação para α -actina de CML;
- Conteúdo de colágeno: coloração de *picrosirius*;
- Acúmulo de lipídeos: coloração por *oil red O*;
- Estresse oxidativo: sonda dihidroetidina (DHE).

Preparação das amostras

As distintas regiões (ECB e ECO) das artérias carótidas dos animais sacrificados, após 6 semanas de implante do *cast* e 21 dias de tratamento com CH223191, foram coletadas e congeladas em *Optimal Cutting Temperature* [(OCT) Sakura Finetek, Torrance, CA, USA], sendo mantidos em freezer -80°C até o momento dos cortes.

Os tecidos preservados em OCT foram cortados em criostatos na espessura de 10 μ m, obedecendo o critério de, após 10 cortes sequenciais, haver intervalo de 10 μ m, para então ser obtida outra série de 10 cortes, esse procedimento foi reproduzido por 5 vezes. Logo, foram obtidas 10 lâminas silanizadas, com 5 cortes cada, todas com distintas regiões do vaso, e conservadas em freezer -80°C até o momento do uso.

Imunofluorescência

Inicialmente, as lâminas contendo os cortes dos animais controles e tratados foram retiradas do freezer e incubadas em tampão fosfato salina (PBS, phosphate buffered saline), *overnight*, em câmara fria. Ao atingirem a temperatura ambiente, foram fixadas por 10 minutos em paraformaldeído 4% e, em seguida, foram submetidas a 3 lavagens de 5 minutos cada. Para permeabilização, os tecidos foram incubados por 20 minutos em solução contendo PBS, e triton X-100 a 0,1%. Em seguida, as lâminas foram submetidas a 5 lavagens de 5 minutos cada. Para o bloqueio, foi utilizado solução com PBS e albumina sérica bovina (BSA, bovine serum albumin) à 5% por 30 minutos.

Para imunomarcção, os tecidos aderidos às lâminas foram incubados *overnight* em câmara fria, com o anticorpo policlonal de coelho anti-CD68 (abcam, ab125212, diluído 1:200, em solução com PBS e 1% BSA), e anticorpo monoclonal de camundongo anti- α -actina de musculo liso (abcam, ab7817, diluído 1:100, em solução com PBS e 1% BSA) e, em seguida, submetidas a 5 lavagens de 5 minutos cada. Para imunocoloração, os cortes foram incubados por 2 horas a 37°C, em câmara escura, com os anticorpos secundários, IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo *Alexa Fluor® 647* (abcam, ab150079, diluído 1:500, em solução com PBS e 1% BSA), e IgG de cavalo anti-IgG de camundongo conjugado ao fluoróforo *DyLight® 549* (Vector, DI2549, diluído 1:500, solução com PBS e 1% BSA) e, em seguida, submetidas a 5 lavagens de 5 minutos cada.

Para montagem das lâminas foi utilizado meio de montagem Fluoroshield® contendo 4-6- diamidino-2-fenilindole [(DAPI) Sigma-Aldrich, St. Louis. MO, USA] e lamínulas, sendo a selagem feita com esmalte fosco incolor livre de formol. Para todos os grupos foram realizados controles negativos, com a presença apenas do anticorpo primário ou secundário.

Coloração com *Picrosirius red*

As lâminas com cortes dos tecidos foram incubadas em PBS, *overnight*, em câmara fria e posteriormente fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos. As lâminas foram coradas por 20 minutos em solução contendo 0,1 g de sal *Sírius red* em 100 mL de ácido pícrico saturado com pH 2,0. Em seguida, foram lavadas em água. Para corar os núcleos celulares, foi utilizado Hematoxilina de Harris por 1 minuto, e as lâminas foram lavadas em água; posteriormente desidratadas, diafanizadas e montadas com meio de montagem Permount® (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e lamínulas.

Coloração *Oil red-O*

As lâminas com cortes dos tecidos foram incubadas em PBS, por 2 horas a 4°C e, posteriormente, fixadas com paraformaldeído 4% por 5 minutos. Na sequência, foram incubadas em de álcool isopropílico 60% por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas no corante *oil red-O* por 10 minutos, imergidas em de álcool isopropílico 60% por 2 minutos, lavadas em água. Os núcleos celulares foram corados por 30 segundos

com Hematoxilina e as lâminas novamente lavadas em água. Para montagem das lâminas foi utilizado meio de montagem Fluoroshield® (Sigma-Aldrich, St. Louis. MO, USA) e lamínulas.

Avaliação do estresse oxidativo

Os cortes foram postos por 10 minutos em estufa a 37°C e, em seguida, incubados com PBS por 10 minutos, para reidratação. Logo após, os cortes foram incubados com 2 µM de dihidroetidina, por 30 minutos a 37°C em câmara úmida e protegidos da luz. Após este período, foi realizada a montagem das lâminas com meio de montagem Fluoroshield® (Sigma-Aldrich, St. Louis. MO, USA).

Aquisição e análise das imagens

Os cortes histológicos foram observados em microscópio Olympus modelo BX50 (Olympus Corporation, Tóquio, Japão) em objetiva com aumento de 20 e 40 vezes, sendo as imagens adquiridas por câmera digital da Marca Nikon, modelo DMX 1200 (Nikon Corporation, Tóquio, Japão).

A aquisição das imagens foi realizada em consonância com o tipo de coloração ou marcação. As imagens dos cortes corados com HE foram adquiridas em campo claro; as imagens dos cortes corados com *picrosirius red*, em campo com filtro para luz polarizada; e as imagens de imunofluorescência, adquiridas com filtro específico para cada fluoróforo.

As imagens adquiridas foram analisadas utilizando o software ImageJ® (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Dosagens bioquímicas no soro

O sague coletado dos animais pelo plexo orbital foram centrifugados a 1.500 rpm por 15 minutos, e o soro coletado armazenado em freezer -80°C.

Os níveis sorológicos de colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), e triglicérides foram mensurados utilizando-se kits comerciais, conforme descrição do fabricante Labtest® (Labtest Diagnóstica S.A., Minas Gerais, Brasil). Os níveis de LDL e de lipoproteína de muito baixa densidade (vLDL) foram obtidos, respectivamente,

através das seguintes equações: $v\text{VLDL} = \text{triglicérides}/5$; $\text{LDL} = \text{Colesterol Total} - \text{HDL} - \text{VLDL}$.

Expressão do mediador pró-inflamatório IL-1 β

Para avaliar os efeitos do tratamento do CH223191 sobre o perfil inflamatório das lesões ateroscleróticas, foi utilizado o arco aórtico dos camundongos ApoE^{-/-} e mensurada a expressão proteica da IL-1 β .

Quantificação proteica por Western Blotting

O arco aórtico dos camundongos tratados com CH223191 foram congelados em nitrogênio líquido, pulverizados e homogeneizados por 2 horas a 4°C em tampão de análise (coquetel inibidor de proteases ([4-{2-aminoetil} fluoreto de benzenosulfonil, pepstatina A, E-64, bestatina, leupeptina e aprotinina]; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) acrescido de ortovanadato de sódio (10^{-3} M), PMSF (fluoreto de fenilmetil-sulfonil, 10^{-3} M) e coquetel inibidor de protease (1%). Os extratos teciduais foram centrifugados a 13000 rpm a 4°C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, foi quantificado o conteúdo proteico total, pelo método de Bradford. As amostras foram tratadas com tampão de Laemmli contendo ditioneitol (DTT, 200 mM) e 40 μ g de proteína total foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE) 12%, em aparelho para mini gel (BioRad, Hercules, CA, USA) por 2 horas. Em cada gel havia um marcador com peso molecular de valores estabelecidos.

A transferência das proteínas, separadas no gel, para a membrana de nitrocelulose foi feita eletricamente por 1 hora a 100 V. O tampão foi acrescido de Dodecil sulfato de sódio (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) 0,1%, para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. As membranas foram incubadas com solução em bloqueadora (TBS, *tris-buffered saline* e 5% BSA) a temperatura ambiente por 1 hora, para reduzir a ligação inespecífica de proteínas na membrana. As membranas foram incubadas individualmente com anticorpos. Essas incubações foram feitas com solução bloqueadora (TBS e 1% BSA), *overnight*, a 4°C. Em seguida as membranas foram lavadas com solução tampão (TBS-T, *tris-buffered saline and tween-20*) 4 vezes por 10 minutos cada e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com a peroxidase, por 1 hora em

temperatura ambiente, e lavadas com solução tampão (TBS-T) 4 vezes por 10 minutos cada.

A solução para detecção por quimioluminescência foi utilizada como descrito no protocolo do kit. A emissão de luz foi detectada e visualizada em auto-radiografias utilizando aparelho ImageQuant 350 (GE Healthcare, Piscata Way, NJ, USA). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização de programa de análise de intensidade de bandas software ImageQuant TL 7.0. (GE Healthcare, Piscata Way, NJ, USA). Os resultados foram normalizados por GAPDH.

Foram utilizados os seguintes anticorpos: policlonal de cabra anti-IL-1 β (Sigma-Aldrich, I3767, diluído 1:250, em solução com TBS-T e 1% BSA), policlonal de coelho anti-GAPDH (Sigma-Aldrich, G9545, diluído 1:5.000, em TBS-T), IgG de jumento anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase (abcam, ab6721, diluído 1:5.000, em TBS-T) e IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (abcam, ab97120, diluído 1:10.000, em TBS-T).

Análise da (dis)função endotelial

Para avaliar a relação entre a (dis)função endotelial e a ativação do AhR mediada por oxLDL, foram utilizados oxLDL, extraídas do plasma humano conforme protocolo descrito por Shintani (2013) e o antagonista CH223191.

Estudo da reatividade vascular em anéis de aorta isolada

Após sacrifício dos camundongos C57BL/6J em câmara de CO₂, as aortas torácicas foram removidas e colocadas em placa de Petri contendo solução nutriente de Krebs-Henseleit modificada a 4°C, com a seguinte composição (em mM): NaCl, 113; KCl, 4,7; KH₂PO₄, 1,1; MgSO₄, 1,1; NaHCO₃, 25; NaNa EDTA, 0,03; CaCl₂, 2,5; Dextrose, 5,5.

O tecido perivascular foi retirado, e a porção mediana da aorta torácica foi dividida em 4 anéis de 2 mm de comprimento, e incubadas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco [(DMEM), Sigma-Aldrich, St. Louis. MO, USA] suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina/estreptomicina (50 ug/mL), com veículo [Dimetilsulfóxido (DMSO) 0,01%], oxLDL (200 ug/mL) e CH223191 (10⁻⁶ M) na presença ou ausência de oxLDL, por 24 horas em estufa com atmosfera húmida contendo

5% CO₂ a 37°C.

Os anéis com endotélio foram montados em miógrafo (modelo 620M; Danish Myo Technology, Copenhagen, Dinamarca) para estudo da geração de força isométrica, conectado a um transdutor de sinal (ML T001 transdutor isométrico de tensão, Power Lab/8S, ADInstruments PTY LTDA, Australia). As cubas do miógrafo continham solução de Krebs-Henseleit modificada, gaseificada com 95% de O₂ e 5% de CO₂, e aquecida a 37°C. As preparações permaneceram sob tensão de 5 mN por 30 minutos para estabilização, com trocas de solução nutriente e ajuste de tensão a cada 10 minutos.

Após o período de estabilização, as artérias foram contraídas com a administração de cloreto de potássio (KCl 120 mM), com a finalidade de se avaliar a viabilidade funcional. Após um período de lavagem e estabilização por mais 30 minutos, a integridade endotelial foi testada por meio da avaliação do relaxamento à acetilcolina [(ACh) vasodilatador dependente de endotélio, 10⁻⁵ mol/L] em vasos pré-contraídos com fenilefrina (agonista alfa adrenérgico, 3x10⁻⁶ mol/L). Anéis arteriais apresentando relaxamento à ACh acima de 80% do valor da pré-contracção foram utilizadas.

Para verificar os efeitos da oxLDL (200 ug/mL) e do CH223191 (10⁻⁶ M) sobre a vasodilatação em artérias aortas, curvas concentração-efeito cumulativas para ACh (10⁻¹⁰ - 3x10⁻⁵ mol/L) foram realizadas nos anéis arteriais pré-contraídos com fenilefrina (3x10⁻⁶ mol/L).

Cultivo celular

Com o objetivo de avaliar o papel da ativação do AhR mediada por oxLDL e a relação com o produção de IL-1β. *Células* endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), linhagem EA.hy926 (ATCC, Manassas, VA, EUA) foram utilizadas. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e penicilina/estreptomicina (50 ug/mL), e mantidos em estufa com atmosfera húmida contendo 5% CO₂ a 37°C.

Para os estudos funcionais, as células endoteliais foram incubadas com, veículo (0,01% DMSO) oxLDL (75 ug/mL), CH223191 (10⁻⁶ M) na presença ou ausência de oxLDL. Estas concentrações foram selecionadas com base em experiências anteriores.

Os sobrenadantes coletados foram centrifugados a 1.500 rpm a 4 °C por 10 minutos, e armazenados em freezer -80°C. Os extratos celulares foram coletados em Trizol[®] e utilizados para PCR em tempo real, conforme protocolo descrito anteriormente.

ELISA

Os sobrenadantes coletados das células endoteliais foram utilizados para detecção de IL-1 β pelo método imunoenzimático (ELISA, *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*).

O ensaio para quantificação de IL-1 β foi realizado conforme descrição do fabricante dos kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Em síntese, em placas de 96 poços foram adicionados 100 μ L/poço da solução contendo o anticorpo de captura (diluído em PBS e 10% SFB) para a citocina (anti-IL-1 β murino 800 ng/mL). As placas com o anticorpo de captura foram seladas e incubadas *overnight* a 4°C.

Posteriormente, as placas foram lavadas por 3 vezes com solução tampão (PBS e 0,05% Tween-20). Para reduzir as ligações inespecíficas, foi utilizado 100 μ L de solução bloqueadora (PBS e 1% BSA) por 2 horas, em temperatura ambiente. As amostras e a curva padrão em volume final de 100 μ L/poço foram adicionados nas placas e incubadas *overnight* a 4°C.

Após esse período, as placas foram lavadas por 3 vezes com solução tampão (PBS e 0,05% Tween-20) e 100 μ L/poço do anticorpo de detecção, biotilado, foi adicionado. Após 1 hora, as placas foram lavadas novamente com solução tampão (PBS e 0,05% Tween-20) e 100 μ L/poço de estreptoavidina-HRP foram adicionadas nas placas. Após 30 minutos de incubação, as placas foram lavadas com solução tampão (PBS e 0,05% Tween-20), e 100 μ L/poço da solução substrato [TMB (tetrametilbenzidina) e 0,06% de peróxido de hidrogênio] foram adicionados nas placas e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 μ L de ácido sulfúrico (1M) e a densidade óptica aferida à 450 nm em espectrofotômetro (FlexStation 3, Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Os resultados foram expressos em picogramas/ml.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.), e a diferença entre os valores médios foram avaliados estatisticamente por

análise de variância de uma via (*One-Way ANOVA*), seguida do pós-teste de Tukey ou de Bonferroni, ou analisados por teste “t” de *Student*. Para tal, utilizou-se o programa GraphPad Prism (Graph Pad Prism 5.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

RESULTADOS

Análise morfológica da formação e progressão da placa aterosclerótica

O desenvolvimento e evolução das lesões ateroscleróticas foram observados morfológicamente pela coloração com HE, confirmando-se que as alterações mediadas pelo implante do *cast* geram aterogênese e progressão das placas (Figura 5).

As regiões com ECB e ECO apresentaram espessamento da camada média e formação de lesões ateroscleróticas. Entretanto, é evidente que essas lesões se mostraram mais avançadas na região com ECB, onde, 9 semanas após o implante do *cast*, observou-se vasos com aspecto dilatado e com o lúmen obstruído. Notou-se ainda, que as artérias contralaterais (controles) não desenvolveram lesões ateroscleróticas (Figura 5).

Figura 5 – Alterações do estresse de cisalhamento promovem desenvolvimento de placas ateroscleróticas. Fotomicrografias representativas (200x) das secções transversais de artérias carótidas de camundongos ApoE^{-/-}. Secções coradas por HE das regiões controle (sem distúrbio), ECO e ECB, 3, 6 e 9 semanas após o implante do *cast*.

Expressão de mediadores pró-inflamatórios

A expressão de IL-1 β na região com ECB foi significativamente maior, 3 semanas após o implante do *cast*, quando comparada à observada nas regiões controle e ECO (Figura 6A). A região com ECO apresentou maior expressão de IL-1 β na terceira semana, quando comparada à do grupo controle (Figura 6A). Observou-se que o RNAm dessa citocina nos grupos com ECB e ECO diminuiu, de forma tempo dependente, nas semanas posteriores. Entretanto, 6 semanas após o implante do *cast*, a diferença na expressão de IL-1 β entre ECB e o controle permaneceu significativa (Figura 6A).

A expressão gênica de TNF- α foi significativamente maior nas regiões com ECB e ECO, entre 3 e 6 semanas após o implante do *cast*, quando comparada à observada no grupo controle (Figura 6B). Observou-se ainda que a região com ECB apresentou expressão de TNF- α significativamente maior que a região com ECO na terceira e sexta semanas de implante. As regiões com ECB e ECO após 9 semanas apresentaram redução da expressão gênica do TNF- α , quando comparadas àquelas nos demais períodos (Figura 6B).

Figura 6 - Alterações no estresse de cisalhamento aumentam a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias. Expressão de RNAm para IL-1 β e TNF- α em regiões da artéria carótida de camundongos ApoE^{-/-}. Tecidos com aproximadamente 2 mm de espessura das regiões controle (sem distúrbio), ECO e ECB, 3, 6 e 9 semanas após implante do *cast*, foram processados para ensaios de RT-PCR. Dados representados pela média $\pm$ E.P.M. (pool de 3 animais por n experimental; n=3 por grupo). (*) indica diferença significativa vs. controle, e (#) vs. ECB. ANOVA uma via com correção por pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

A expressão do RNAm da MMP-12, após 3 semanas, foi significativamente maior nas regiões com ECB e ECO em relação à região controle. Seis semanas após o implante do *cast*, a região com ECO apresentou aumento significativo da expressão gênica de MMP-12 quando comparada às regiões controle e ECB (Figura 7).

É interessante ressaltar que o pico de expressão da MMP-12 na região com ECB ocorreu 3 semanas após o implante do *cast*. Após este período houve redução na expressão genica de MMP-12, de forma tempo dependente. Em regiões com ECO, o aumento de MMP-12 iniciou-se com 3 semanas. Entretanto o pico de expressão ocorreu com 6 semanas, com diminuição da expressão na nona semana (Figura 7).

Figura 7 - Alterações no estresse de cisalhamento aumentam a expressão gênica de MMP-12. Expressão de RNAm para MMP-12 em regiões da artéria carótida de camundongos ApoE^{-/-}. Tecidos com aproximadamente 2 mm de espessura das regiões controle (sem distúrbio), ECO e ECB, 3, 6 e 9 semanas após implante do *cast*, foram processados para ensaios de RT-PCR. Dados representados pela média ± E.P.M. (pool de 3 animais por n experimental; n=3 por grupo). (*) indica diferença significativa vs. controle, (#) vs. ECB, e (&) vs. ECO. ANOVA uma via com correção por pós-teste de Tukey (p < 0,05)

Expressão e atividade de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR)

Houve aumento da expressão gênica do AhR na região com ECB, entre 3 e 6 semanas após o implante do *cast*, sendo a diferença estatisticamente significativa em comparação ao observado no grupo controle e na região com ECO. A região com ECB apresentou redução da expressão do receptor, após 9 semanas do implante do *cast*, quando comparada à mesma região nos demais períodos (Figura 8).

Figura 8 - Alterações no estresse de cisalhamento aumentam a expressão gênica de AhR. Expressão de RNAm para AhR em regiões da artéria carótida de camundongos ApoE^{-/-}. Tecidos com aproximadamente 2 mm de espessura das regiões controle (sem distúrbio), ECO e ECB, 3, 6 e 9 semanas após implante do *cast*, foram processados para ensaios de RT-PCR. Dados representados pela média $\pm$ E.P.M. (pool de 3 animais por n experimental; n=3 por grupo). (*) indica diferença significativa vs. controle, e (#) vs. ECB. ANOVA uma via com correção por pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

A expressão gênica de CYP1A1 não foi detectada nos tecidos alvos. Entretanto, cabe ressaltar que os experimentos foram realizados com controle positivo (cDNA de células Th17, provenientes da diferenciação de Células T CD4⁺ isoladas do baço de linfonodos drenantes de C57BL/6J, e estimuladas com TCDD), que funcionaram em consonância com o esperado, pois foi detectado a presença do RNAm de CYP1A1 durante a reação de RT-PCR.

Considerações I

- Os dados reforçam que alterações no estresse de cisalhamento, geradas pelo implante do *cast*, promovem o desenvolvimento de placas ateroscleróticas em camundongos ApoE^{-/-}. A evolução dessas lesões são tempo e local dependentes, uma vez que regiões com ECB apresentaram processo aterogênico e progressão da placa aterosclerótica mais intensos do que regiões com ECO;
- A expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios aumenta entre a terceira e sexta semanas pós implante do *cast*, tanto nas regiões com ECB, quanto em regiões com ECO. Porém, o processo inflamatório em regiões com ECB foi mais acentuado/evidente. Curiosamente, na nona semana, houve diminuição na expressão destes mediadores;
- O AhR é mais expresso em regiões com ECB, principalmente entre a terceira e sexta semanas pós implante do *cast*, assim como os mediadores pró-inflamatórios. Entretanto, como não foi detectada presença de CYP1A1, o AhR pode não estar sendo ativado nessas regiões ou, ainda, estar sendo ativado, mas atuando em uma via não canônica.

Estes resultados reforçam que alterações no estresse de cisalhamento, em associação com processo inflamatório, são responsáveis por definir o fenótipo da lesão aterosclerótica em camundongos ApoE^{-/-}. Estes parâmetros podem estar associados à atividade AhR, uma vez que o aumento da expressão desse receptor está correlacionada ao aumento do processo inflamatório, e ambos ao ECB.

Perante o exposto, o tratamento dos animais com antagonista do AhR, CH223191, levou em consideração o período onde, tanto o AhR quanto o processo inflamatório estão aumentados.

Evolução ponderal dos animais mantidos em dieta hipercolesterolêmica e tratados com antagonista de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR)

O acompanhamento da massa corporal dos animais foi realizado semanalmente a partir da introdução da dieta tipo western. Os animais apresentaram evolução ponderal crescente, não sofrendo interferência do tratamento com antagonista do AhR (Figura 9).

Figura 9 - CH223191 não altera a evolução ponderal de animais submetidos a dieta hipercolesterolêmica. Ganho de massa corporal dos animais controle e tratados com CH223191. Os pontos representam a média semanal $\pm$ E.P.M. (n=8 por grupo). Teste t ($p > 0,05$).

Influência do antagonismo dos Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) sobre o perfil lipídico

Conforme descrito na tabela 1, os camundongos ApoE^{-/-} tratados por 21 dias com CH223191, e sacrificados 6 semanas após o implante do *cast*, apresentaram redução das concentrações séricas de colesterol total, triglicérides, VLDL e LDL, quando comparados aos camundongos ApoE^{-/-} tratados com veículo (grupo controle). O tratamento com antagonista do AhR não alterou de maneira significativa os níveis de HDL.

Tabela 1 – Perfil lipídico dos camundongos ApoE^{-/-} tratados com CH223191

	CONTROLE	CH223191
Colesterol total (mg/dL)	1.598 ± 58,36	1.271 ± 52,78*
Triglicérides (mg/dL)	191 ± 30,52	116,70 ± 14,46*
HDL-colesterol (mg/dL)	11,75 ± 3,056	7,88 ± 1,667
LDL-colesterol (mg/dL)	1.548 ± 55,86	1.238 ± 50,36*
VLDL-colesterol (mg/dL)	38,20 ± 6,10	24,70 ± 2,744*

Dados representados como média ± E.P.M. (n=9 por grupo). (*) indica diferença significativa vs. Controle. Teste t (p > 0,05).

Influência do antagonismo de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) sobre a vulnerabilidade da placa aterosclerótica

Entre a terceira e sexta semanas após o implante do *cast*, os animais receberam doses diárias de CH223191. O antagonismo do AhR reduziu significativamente o depósito lipídico na região de placas vulneráveis, ou seja, em regiões de ECB, quando comparado àquele observado em placas do grupo controle (Figura 10A). Entretanto, o antagonista CH223191 não alterou significativamente o conteúdo lipídico em região de placas estáveis, ou seja, em regiões de ECO (Figura 10B).

Figura 10 – Tratamento com CH223191 reduz o conteúdo lipídico em placas ateroscleróticas com fenótipo vulnerável. Fotomicrografias representativas (400x) da coloração por *Oil red* das regiões com ECB (A) e ECO (B) das artérias carótidas dos grupos controle e tratado com CH223191. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de experimentos independentes (n=5 por grupo). (*) indica diferença significativa vs. Controle. Teste t ($p < 0,05$)

O tratamento com CH223191 reduziu significativamente o conteúdo de macrófagos (células CD68+) de placas ateroscleróticas com fenótipo vulnerável, em comparação ao observado no grupo controle (Figura 11). Contudo, o conteúdo de macrófagos das placas ateroscleróticas com fenótipo estável não foi significativamente modificado pelo tratamento com o antagonista (Figura 12).

Figura 11 – Tratamento com CH223191 reduz o conteúdo de macrófagos em placas ateroscleróticas com fenótipo vulnerável. Fotomicrografias representativas (200x) da fluorescência para células CD68+ nas regiões com ECB das artérias carótidas dos grupos controle e tratado com CH223191. Os cortes foram incubados com anticorpo para detecção de células CD68 positivas (macrófagos), com posterior adição de meio de montagem com DAPI para marcação do núcleo. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de experimentos independentes (n=4-6 por grupo). (*) indica diferença significativa vs. Controle. Teste t ($p < 0,05$).

Figura 12 – Tratamento com CH223191 não altera o conteúdo de macrófagos em placas ateroscleróticas com fenótipo estável. Fotomicrografias representativas (200x) da fluorescência para células CD68+ nas regiões ECO das artérias carótidas dos grupos controle e tratado com CH223191. Os cortes foram incubados com anticorpo para detecção de células CD68 positivas (macrófagos), com posterior adição de meio de montagem com DAPI para marcação do núcleo. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de experimentos independentes (n=4-6 por grupo). Teste t ($p < 0,05$).

A quantidade de CMLV é um fator importante para garantir a estabilidade da placa aterosclerótica, pois é constituinte da capa fibrosa que reveste o núcleo das lesões. Diante disso, realizamos a marcação para α -actina nas regiões com ECO e ECB após o tratamento com o antagonista do AhR. O CH223191 aumentou significativamente o conteúdo de α -actina nas placas ateroscleróticas com fenótipo vulnerável (Figura 13), mas, não alterou o conteúdo de α -actina nas placas estáveis, em comparação ao grupo controle. (Figura 14).

Figura 13 – Tratamento com CH223191 aumenta o conteúdo de α -actina em placas ateroscleróticas com fenótipo vulnerável. Fotomicrografias representativas (200x) da fluorescência para α -actina em regiões com ECB das artérias carótidas dos grupos controle e tratado com CH223191. Os cortes foram incubados com anticorpo para detecção de α -actina, com posterior adição de meio de montagem com DAPI para marcação do núcleo. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de experimentos independentes (n=5 por grupo). (*) indica diferença significativa vs. Controle. Teste t ($p < 0,05$).

Figura 14 – Tratamento com CH223191 não altera o conteúdo de α -actina em placas ateroscleróticas com fenótipo estável. Fotomicrografias representativas (200x) da fluorescência para α -actina das regiões com ECO das artérias carótidas dos grupos controle e tratado com CH223191. Os cortes foram incubados com anticorpo para detecção de α -actina, com posterior adição de meio de montagem com DAPI para marcação do núcleo. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de experimentos independentes (n=5 por grupo). Teste t ($p < 0,05$).

Não houve alterações significativas no conteúdo de colágeno, detectado pela coloração de *sirius red*, tanto nas regiões de ECB (Figura 15) quanto de ECO (Figura 16) entre os grupos tratado com CH223191 e controle.

Figura 15 – Tratamento com CH223191 não altera o conteúdo de colágeno em placas ateroscleróticas com fenótipo vulnerável. Fotomicrografias representativas (200x) da coloração por *Sirius red* das regiões com ECB das artérias carótidas dos grupos controle e tratado com CH223191. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de experimentos independentes (n=6-5 por grupo). Teste t ($p < 0,05$).

Figura 16 – Tratamento com CH223191 não altera o conteúdo de colágeno em placas ateroscleróticas com fenótipo estável. Fotomicrografias representativas (200x) da coloração por *Sirius red* das regiões com ECB das artérias carótidas dos grupos controle e tratado com CH223191. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de experimentos independentes (n=4 por grupo). Teste t ($p < 0,05$).

A geração de EROs foi analisada utilizando a sonda fluorescente DHE, um precursor não fluorescente do brometo de etídeo. Na presença de EROs, a hidroetidina é oxidada dentro da célula, produzindo os compostos fluorescentes etídeo (E) e 2-hidróxi etídeo (EHO), que têm afinidade pelo DNA nuclear.

O tratamento com CH223191 reduziu significativamente a geração de EROs nas placas ateroscleróticas com fenótipo vulnerável (Figura 17A), mas, não alterou a gerações de EROS nas placas estáveis, em comparação ao grupo controle. (Figura 17B).

Figura 17 – Tratamento com CH223191 reduz a geração de EROs em placas ateroscleróticas vulneráveis. Fotomicrografias representativas (200x) da fluorescência para dihidroetidina (DHE) nas regiões com ECB (A) e ECO (B) das artérias carótidas dos grupos controle e tratado com CH223191. Os cortes foram incubados com a sonda DHE para detecção de estresse oxidativo. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de experimentos independentes (n=5 por grupo). Teste t ($p < 0,05$) (*) indica diferença significativa vs. Controle

Influência do antagonismo de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) sobre a expressão de IL-1 β em placas ateroscleróticas presentes no arco aórtico

Para investigar a expressão proteica da citocina IL-1 β , inicialmente foi necessário a detecção de placas ateroscleróticas no arco aórtico dos animais ApoE^{-/-} tratados com CH223191 e controles. As placas ateroscleróticas foram visualizadas pela coloração com HE (Figura 18A).

Posteriormente, o efeito do tratamento com CH223191 na expressão de IL-1 β foi avaliado. Observou-se que o tratamento com o antagonista reduziu significativamente a expressão deste mediador pró-inflamatório, quando comparado ao grupo controle (Figura 18B).

Figura 18 – Tratamento com CH23191 reduz a expressão de IL-1 β em placas ateroscleróticas presentes no arco aórtico Fotomicrografias representativas (100x) da coloração por HE das secções transversais do arco aórtico de camundongos ApoE^{-/-} dos grupos controle e tratado com CH223191 (A). Imagens representativas da expressão protéica da citocina IL-1 β . O gráfico corresponde a razão proteica de IL-1 β pelo GAPDH (B). Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de expressão proteica. (n=6 por grupo). Teste t ($p < 0,05$). (*) indica diferença significativa vs. Controle.

Considerações II

- O AhR participa da aterogênese mediando processos intrínsecos e extrínsecos à vasculatura, posto que o tratamento com antagonista CH223191 reduz o conteúdo de lipídios de placas ateroscleróticas com fenótipo vulnerável, bem como a hipercolesterolemia dos camundongos ApoE^{-/-}, importante fator de risco para a aterosclerose;
- A ativação do AhR aumenta a migração de células inflamatórias e o estresse oxidativo de placas ateroscleróticas com fenótipo vulnerável, contribuindo com o processo pró-inflamatório. Considerando que o tratamento com CH223191 diminui o infiltrado de macrófagos e a geração de EROs, pode-se inferir que a redução do processo inflamatório é um efeito esperado em regiões com ECB;
- O aumento do conteúdo de CMLV mediado pelo tratamento com CH223191, reforça que a ativação do AhR é responsável por agravar a vulnerabilidade da placa, pois a redução de CMLV configura importante fator para a rotura da placa aterosclerótica;
- O antagonismo do AhR reduz os níveis de IL-1 β em placas ateroscleróticas presentes no arco aórtico, confirmando que este receptor está envolvido no processo inflamatório das lesões ateroscleróticas.

Os dados obtidos indicam que o tratamento com antagonista do AhR é capaz de melhorar os parâmetros responsáveis pela vulnerabilidade da placa aterosclerótica, mas não de placas estáveis. Cabe ressaltar que a ação do AhR sobre os componentes da placa aterosclerótica pode estar diretamente relacionada à quantidade de receptores presentes nas lesões, uma vez que o antagonismo do AhR só foi eficaz em melhorar os parâmetros nas regiões com ECB, local onde sua expressão está aumentada. Ademais, esse conjunto de resultados indica que a influência do AhR sobre as placas ateroscleróticas é mediada por sua ativação via moléculas endógenas.

Influência do antagonismo de Receptores de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) sobre a (dis)função endotelial

À medida que partículas de oxLDL são importante fator para determinar a disfunção endotelial e pode ativar o AhR, investigamos se o prejuízo na função vascular gerado pela oxLDL é mediado pela ativação do AhR.

Como a disfunção endotelial configura o primeiro estágio para a aterogênese, curvas concentração-efeito para ACh foram feitas em anéis da artéria aorta de camundongos C57BL/6J incubados por 24 horas com oxLDL (200ug/mL) na ausência ou presença de CH22319 (10⁻⁶ mol/L), com intuito em avaliar se os mecanismos pelo quais oxLDL promove disfunção endotelial é mediado pelo AhR.

Como esperado, oxLDL reduziu significativamente o relaxamento induzido pela ACh, quando comparado ao grupo tratado com veículo (controle). Esse processo foi prevenido pelo CH223191 que, ao ser incubado com a oxLDL, impediu o prejuízo na resposta vasodilatadora dos anéis da aorta (Figura 19).

Como visto na tabela 2, o uso *in vitro* da oxLDL promoveu deslocamento da curva de ACh para a direita, alterando a EC₅₀ (valores de pD₂). Entretanto, oxLDL não alterou o efeito máximo da ACh (valores de Emax).

Figura 19 - CH223191 impede a disfunção endotelial promovida por oxLDL. O gráfico representa curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh) em aortas de camundongos C57BL/6J incubadas com oxLDL (200ug/mL), e CH223191 (10^{-6} mol/L). Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. (n=4-6). (*) indica diferença significativa vs. Controle, (#) vs. oxLDL. ANOVA uma via com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$.

Tabela 2 - Valores de pD_2 e E_{max} de ACh em aortas de camundongos C57BL/6J incubadas com oxLDL e CH223191.

	EC₅₀	E_{máx}
Controle	7,75 $\pm$ 0,08 n=6	98,1 $\pm$ 2,9 n=6
oxLDL	7,12 $\pm$ 0,08* n=6	93,0 $\pm$ 3,6 n=6
oxLDL + CH223191	7,61 $\pm$ 0,09# n=6	96,5 $\pm$ 3,3 n=6
CH223191	7,96 $\pm$ 0,12# n=4	102,4 $\pm$ 4,1 n=4

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. (*) indica diferença significativa vs. Controle, (#) vs. oxLDL. One-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$.

O processo inflamatório mediado por oxLDL em células endoteliais é uma das causas pelas quais essa partícula promove disfunção endotelial. Diante disso, foi investigado a produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β mediada por oxLDL e sua relação com ativação do AhR.

As células endoteliais incubadas por 24 horas com oxLDL (75 ug/mL) apresentaram aumento significativo da expressão gênica de IL-1 β , quando comparados a células controle. Esse efeito não foi observado na presença do CH223191 [(10⁻⁶ mol/L) Figura 20A]. Outrossim, o mesmo evento foi observado no sobrenadante dessas células (Figura 20B). Logo, o processo inflamatório e a consequente disfunção endotelial mediada por oxLDL dependem da ativação do AhR.

Figura 20 - CH223191 reduz a expressão de IL-1 β promovida por oxLDL. O gráfico representa curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh) em aortas de camundongos C57BL/6J incubadas com oxLDL (75 ug/mL), e CH223191 (10⁻⁶ mol/L). Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. (n=4-6). (*) indica diferença significativa vs. Controle, (#) vs. oxLDL . ANOVA uma via com correção por pós-teste de Tukey (p < 0,05).

Considerações III

- A ativação do AhR é responsável pela disfunção endotelial mediada por oxLDL, pois o antagonismo deste receptor previne os efeitos da oxLDL sobre a vasodilatação;
- Um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas é o processo inflamatório promovido por partículas de oxLDL. Em células endoteliais esse evento é impedido pelo antagonista do AhR, logo, a ativação do AhR é responsável pelo processo inflamatório mediado pela oxLDL durante a aterogênese.

Os resultados apontam que o antagonismo do AhR é capaz de impedir a disfunção e o processo inflamatório endotelial. Esses efeitos são decorrentes da ativação mediada por um composto ou molécula endógena, o oxLDL.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que 1) associação entre as alterações no estresse de cisalhamento e processo inflamatório promove aterogênese e determina o fenótipo da placa aterosclerótica; 2) placas vulneráveis apresentam aumento na expressão do AhR; 3) O antagonismo do AhR através do CH223191 reduz os níveis de colesterol total, LDL, VLDL e triglicérides; 4) CH223191 diminui a vulnerabilidade da placa; 5) CH223191 diminui o perfil inflamatório de placas ateroscleróticas; 6) CH223191 impede a redução da vasodilatação induzida por oxLDL; 7) CH223191 diminui o processo inflamatório mediado por oxLDL. Os resultados desse estudo mostram pela primeira vez que a ativação do AhR por ligantes endógenos desempenha papel notável na aterogênese e na vulnerabilidade da placa aterosclerótica.

Modificações na tensão de cisalhamento induzidas pelo *cast* são capazes de alterar a composição da placa aterosclerótica e o perfil inflamatório em camundongos ApoE^{-/-} (Cheng et al., 2006). Regiões com ECB desenvolvem placas ateroscleróticas com fenótipo vulnerável, enquanto regiões com ECO, possuem placas com fenótipo estável (Cheng et al., 2006). Utilizando o *cast* para induzir lesões ateroscleróticas nas carótidas de camundongos ApoE^{-/-}, nossos achados corroboram os de Cheng e cols. (2006), ao indicarem que o implante do *cast* promove evolução das lesões de forma tempo dependentes, uma vez que avaliamos a progressão das lesões ateroscleróticas 3, 6 e 9 semanas após o implante do *cast*. Entretanto, nosso estudo demonstra que, 6 semanas após o implante do *cast*, as lesões ateroscleróticas estão em estágio avançado em regiões com ECB e ECO, informação não contida em outros estudos, pois a evolução das lesões foi avaliada, 1, 3 e 9 semanas após implante do *cast*.

A expressão de mediadores pró-inflamatórios nesse modelo apresenta-se elevada nas primeiras semanas (Cheng et al., 2007; Cheng et al., 2006). Uma semana após o implante do *cast*, em resposta às alterações hemodinâmicas, a expressão de MCP-1 está aumentada em regiões com ECB e ECO, quando comparadas ao controle. Após 3 e 9 semanas do implante do *cast*, há diminuição do RNAm de MCP-1 em relação ao observado uma semana após implantação do *cast*. Entretanto expressão de MCP1-continua aumentada 3 e 9 semanas após implante do *cast* quando comparada àquela observada em regiões controle (Cheng et al., 2007).

A proteína 10 induzida por interferon está aumentada em regiões com ECB e ECO, 1 e 3 semanas, mas não 9 semanas, após implante do *cast* (Cheng et al., 2007).

Nessa acepção, mostramos que 3 e 6 semanas após o implante do *cast*, principalmente regiões com ECB apresentam intenso processo inflamatório. Entretanto, 9 semanas após implantação do *cast* a expressão de mediadores pró-inflamatórios está reduzida. A observação desses eventos pode estar relacionada à escolha dos mediadores pró-inflamatórios analisados. Entretanto, escolhemos mediadores que participam de processos ao longo da doença e que estão intimamente relacionados às respostas celulares da fisiopatologia da aterosclerose.

Nesse sentido, a ativação endotelial, decorrente do aumento da atividade do NF κ B em regiões com ECB, modifica a sinalização celular da camada íntima promovendo produção de mediadores pró-inflamatórios (Wang et al., 2011). IL-1 β e TNF- α contribuem para a disfunção endotelial por promover a expressão de moléculas de adesão e de MCP-1, aumentando a migração monocitária para o foco inflamatório. Os macrófagos, por sua vez, intensificam o processo inflamatório, aumentando a produção de IL-1 β e TNF- α . Logo, esses mediadores pró-inflamatórios estão associados ao conteúdo e ativação de macrófagos na região da placa (Libby, 2017). Nesse sentido, outro mediador pró-inflamatório, relacionado a atividade dos macrófagos na aterosclerose é a MMP-12, metaloelastase de macrófago (Johnson et al., 2005; Nenan et al., 2005). O tratamento de camundongos ApoE^{-/-} com inibidor de MMP-12 retarda o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas por reduzir a quantidade de macrófagos e aumentar o número de CMLV e conteúdo de colágeno presentes nas lesões (Johnson et al., 2011).

Nessa perspectiva, o TNF- α é responsável por aumentar o núcleo necrótico das lesões, pois induz morte de CMLV, de macrófagos e *foam cells* (Boesten et al., 2005). A ampliação do núcleo necrótico aumenta a formação de cristais de colesterol que levam a ativação de IL- β e estresse oxidativo, o que, por sua vez, contribui para a oxidação de LDL e produção de fatores pró-inflamatórios (Düwell et al., 2010; Giese et al., 2010; Seneviratne et al., 2013).

Como descrito, o aumento de IL- β , TNF- α e MMP-12 desempenha papel crucial na aterogênese e vulnerabilidade da placa. Diante disso, nossos resultados apontam que a expressão desses mediadores participa intensamente da aterogênese e consequente vulnerabilidade de placas ateroscleróticas, sendo a expressão desses mediadores mais acentuada em regiões com ECB, 3 e 6 semanas após o implante do *cast*, períodos em que a expressão do AhR está aumentada nesse modelo.

Os elevados níveis destes mediadores podem estar relacionados à atividade do AhR mediada por composto/molécula endógena uma vez que este receptor, ao ser

ativado, pode interagir com o NFκB e participar da transcrição gênica relacionada à resposta inflamatória (Watanabe et al., 2013). Esse evento é observado quando a ativação do AhR é mediada por TCDD, e promove acúmulo de colesterol em monócitos, desenvolvimento de *foam cells*, aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1β, TNF-α, e MMP-12, e migração celular (Vogel et al., 2014; Vogel et al., 2004). O bloqueio do AhR com CH223191 diminui a polarização de células Th17 (Veldhoen et al., 2009). Entretanto, a ativação do AhR, promovida por 6-formilindolo [3,2-b] carbazole (FICZ), em células dendríticas derivadas de monócitos humanos inibe a produção de IL-1β, IL-6, IL-23 e TNF-α, induzida por lipopolissacarídeo. Outrossim, a ativação do AhR por FICZ aumenta a produção de IL-10 (Wang et al., 2014).

É impossível determinar, de modo geral, os padrões de respostas do AhR, pois seus efeitos são ligante e condições dependentes, e levam em consideração polimorfismos do receptor e as diversas vias de sinalização nas quais atua (Chen et al., 2006; Denison & Nagy, 2003; Esser and Rannug, 2015). No entanto, os resultados obtidos pelo tratamento de camundongos ApoE^{-/-} com CH223191, somando-se aos dados da literatura sobre seu papel na aterosclerose, e nos direciona para uma nova perspectiva sobre o papel da ativação do AhR mediada por compostos/moléculas endógenas em doenças crônico-inflamatórias como a aterosclerose

A retroalimentação positiva do processo inflamatório associada a regiões com ECB diminui a capa fibrosa e aumenta o núcleo necrótico, levando à vulnerabilidade da placa aterosclerótica, enquanto regiões com ECO respondem de forma oposta (Cheng et al., 2006; Virmani et al., 2002). Em regiões com ECB, o conteúdo de macrófagos e lipídeos apresenta-se aumentado, enquanto o conteúdo de CMLV é menor, em comparação às regiões com ECO (Cheng et al., 2006). O antagonismo do AhR melhora esses parâmetros em regiões com ECB, mas não em regiões com ECO. O mesmo foi observado em estudo utilizando inibidor de CX3CL1, quimiocina com elevada expressão na aterosclerose, onde o conteúdo de CMLV aumenta, enquanto o infiltrado de macrófagos e conteúdo lipídico são reduzidos em regiões com ECB, mas não em regiões com ECO (Cheng et al., 2007). Outro estudo demonstrou que o tratamento com inibidor de arginase reduz o conteúdo lipídico apenas em regiões com ECB (Olivon et al., 2013).

No que tange outro marcador, o colágeno, os dados foram variáveis, uma vez que o tratamento com inibidor de arginase reduziu o conteúdo de colágeno em regiões com ECB (Olivon et al., 2013), enquanto o tratamento com inibidor de CX3CL1 aumentou colágeno em regiões com ECB e ECO (Cheng et al., 2007; Fraga-Silva et al.,

2014; Olivon et al., 2013). Por sua vez, o tratamento com CH223191 no presente estudo não alterou o conteúdo de colágeno.

Outro importante marcador da vulnerabilidade da placa aterosclerótica é o aumento da geração de EROs, ou estresse oxidativo. Nesse sentido, Olivon e cols. (2013) demonstraram que a inibição da arginase reduz o estresse oxidativo em regiões com ECB. O tratamento com CH223191 produziu o mesmo resultado, corroborando estudo de Watanabe e cols. (2013) que demonstraram que o antagonismo do AhR reduz o estresse oxidativo (Watanabe et al., 2013).

Alguns parâmetros comumente avaliados são importantes fatores de risco na aterosclerose. Dentre eles estão a massa corporal e a hipercolesterolemia. Nossos dados mostram que o antagonismo do AhR não reduz a massa corporal dos animais tratados com dieta western, resultado oposto do observado por Moyer e cols. (2006), que mostraram que o antagonismo do AhR não só reduz a massa corporal de camundongos submetidos a dieta western, como previne a obesidade e estimula o emagrecimento nesses animais.

Esse mesmo estudo apontou que o antagonismo do AhR reduz os níveis de LDL, mas não modifica os níveis de triglicérides e colesterol total (Moyer et al., 2016). Nosso estudo mostrou que, além de reduzir os níveis de LDL, o tratamento com CH223191 foi efetivo em reduzir os níveis séricos de VLDL, triglicérides e colesterol total. A melhora no perfil lipídico desses animais certamente relaciona-se com o fato da ativação do AhR por HAP regular negativamente a expressão de genes envolvidos no metabolismo do colesterol, pois inibe o receptor X do fígado (LXR), contribuindo para aumento do colesterol circulante com consequente processo aterogênico (Iwano et al., 2005).

Como descrito, a hipercolesterolemia e a resposta inflamatória desencadeiam uma série de eventos vasculares que promovem aterogênese (Libby et al., 2009; Plump et al., 1992). Em camundongos ApoE^{-/-}, o aumento de colesterol promove disfunção vascular, com diminuição da resposta vasodilatadora mediada por metacolina (Raman et al., 2011). A redução da vasodilatação é comumente associada aos danos endoteliais gerados pelo aumento de LDL (Raman et al., 2011; Valente et al., 2014; Zhao and Tackett, 1998). Nesse sentido, nossos resultados corroboram com dados da literatura, reforçando que as partículas de oxLDL promovem disfunção endotelial, e acrescenta a informação que essa disfunção pode ser mediada pela ativação do AhR, visto que o antagonismo desse receptor impede que oxLDL promova redução da vasodilatação dependente de endotélio.

Posto que partículas de oxLDL reduzem a resposta vasomotora a ACh e geram produção de IL-1 β , que também prejudica o vasorelaxamento dependente de endotélio (Lin et al., 2003; Napoli et al., 1997), descobrimos que a produção de IL-1 β mediada por oxLDL pode ser bloqueada/inibida pelo CH223191. Logo, sugere-se que a ativação do AhR mediada por oxLDL é responsável pela produção de IL-1 β e consequente disfunção endotelial. Entretanto, estudos mais aprofundados são necessários a fim de elucidar os mecanismos envolvidos nesses eventos.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

O presente estudo permite concluir que a ativação do AhR promovida por compostos/moléculas endógenas promove vulnerabilidade da placa aterosclerótica por regular os componentes presentes nessas lesões, além de influenciar o processo inflamatório. Ademais, fornece evidências que sugerem a participação do eixo AhR-oxLDL-inflamação sobre os mecanismos envolvidos na aterogênese. Destarte, nosso estudo contribui com uma parcela de conhecimento para a compreensão da instalação e manutenção da aterosclerose. Assim sendo, é necessária a realização de mais estudos nessa direção, pois o AhR pode tornar-se um promissor alvo terapêutico no tratamento não somente da aterosclerose, mas de outras doenças crônico-inflamatórias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel, J., and Haarmann-Stemmann, T. (2010). An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol Chem* 391, 1235-1248.

Adelibieke, Y., Yisireyli, M., Ng, H.Y., Saito, S., Nishijima, F., and Niwa, T. (2014). Indoxyl sulfate induces IL-6 expression in vascular endothelial and smooth muscle cells through OAT3-mediated uptake and activation of AhR/NF-kappaB pathway. *Nephron Exp Nephrol* 128, 1-8.

Anderson, K.M., Odell, P.M., Wilson, P.W., and Kannel, W.B. (1991). Cardiovascular disease risk profiles. *Am Heart J* 121, 293-298.

Barouki, R., Aggerbeck, M., Aggerbeck, L., and Coumoul, X. (2012). The aryl hydrocarbon receptor system. *Drug Metabol Drug Interact* 27, 3-8.

Bentzon, J.F., Otsuka, F., Virmani, R., and Falk, E. (2014). Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res* 114, 1852-1866.

Bergheanu, S.C., Bodde, M.C., and Jukema, J.W. (2017). Pathophysiology and treatment of atherosclerosis : Current view and future perspective on lipoprotein modification treatment. *Neth Heart J* 25, 231-242.

Boesten, L.S., Zadelaar, A.S., van Nieuwkoop, A., Gijbels, M.J., de Winther, M.P., Havekes, L.M., and van Vlijmen, B.J. (2005). Tumor necrosis factor-alpha promotes atherosclerotic lesion progression in APOE*3-Leiden transgenic mice. *Cardiovasc Res* 66, 179-185.

Bradshaw, T.D., and Bell, D.R. (2009). Relevance of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) for clinical toxicology. *Clin Toxicol (Phila)* 47, 632-642.

BRASIL. Ministério da Saúde. DataSus (2016). Informações de Saúde. Estatísticas Vitais [acesso em 2018]. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>.

Buja, L.M. (2014). Nikolai N. Anitschkow and the lipid hypothesis of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* 23, 183-184.

Burbach, K.M., Poland, A., and Bradfield, C.A. (1992). Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8185-8189.

Chen, Y., Bai, Y., Yuan, J., Chen, W., Sun, J., Wang, H., Liang, H., Guo, L., Yang, X., Tan, H., *et al.* (2006). Association of polymorphisms in AhR, CYP1A1, GSTM1, and

GSTT1 genes with levels of DNA damage in peripheral blood lymphocytes among coke-oven workers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 1703-1707.

Cheng, C., Tempel, D., van Haperen, R., de Boer, H.C., Segers, D., Huisman, M., van Zonneveld, A.J., Leenen, P.J., van der Steen, A., Serruys, P.W., *et al.* (2007). Shear stress-induced changes in atherosclerotic plaque composition are modulated by chemokines. *J Clin Invest* 117, 616-626.

Cheng, C., Tempel, D., van Haperen, R., van der Baan, A., Grosveld, F., Daemen, M.J., Krams, R., and de Crom, R. (2006). Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress. *Circulation* 113, 2744-2753.

Cheng, C., van Haperen, R., de Waard, M., van Damme, L.C., Tempel, D., Hanemaaijer, L., van Cappellen, G.W., Bos, J., Slager, C.J., Duncker, D.J., *et al.* (2005). Shear stress affects the intracellular distribution of eNOS: direct demonstration by a novel in vivo technique. *Blood* 106, 3691-3698.

Christensen, J.J., Retterstol, K., Godang, K., Roland, M.C., Qvigstad, E., Bollerslev, J., Ueland, T., Henriksen, T., and Holven, K.B. (2016). LDL cholesterol in early pregnancy and offspring cardiovascular disease risk factors. *J Clin Lipidol* 10, 1369-1378 e1367.

Davarinos, N.A., and Pollenz, R.S. (1999). Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J Biol Chem* 274, 28708-28715.

Davies, P.F. (1995). Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 75, 519-560.

Denison, M.S., and Nagy, S.R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 309-334.

Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nunez, G., Schnurr, M., *et al.* (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464, 1357-1361.

Esser, C., and Rannug, A. (2015). The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology. *Pharmacol Rev* 67, 259-279.

Ezzati, M., Hoorn, S.V., Lopez, A.D., Danaei, G., Rodgers, A., Mathers, C.D., and Murray, C.J.L. (2006). Comparative Quantification of Mortality and Burden of Disease Attributable to Selected Risk Factors. In *Global Burden of Disease and Risk Factors*, A.D. Lopez, C.D. Mathers, M. Ezzati, D.T. Jamison, and C.J.L. Murray, eds. (Washington (DC)).

Fernandez-Salguero, P.M., Ward, J.M., Sundberg, J.P., and Gonzalez, F.J. (1997). Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Vet Pathol* 34, 605-614.

Fraga-Silva, R.A., Savergnini, S.Q., Montecucco, F., Nencioni, A., Caffa, I., Soncini, D., Costa-Fraga, F.P., De Sousa, F.B., Sinisterra, R.D., Capettini, L.A., *et al.* (2014). Treatment with Angiotensin-(1-7) reduces inflammation in carotid atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost* 111, 736-747.

Giese, S.P., Amit, Z., Yang, Y.T., Shchepetkina, A., and Katouah, H. (2010). Oxidant production, oxLDL uptake, and CD36 levels in human monocyte-derived macrophages are downregulated by the macrophage-generated antioxidant 7,8-dihydroneopterin. *Antioxid Redox Signal* 13, 1525-1534.

Gotto, A.M., Jr. (1985). Some reflections on arteriosclerosis: past, present, and future. *Circulation* 72, 8-17.

Gu, L., Okada, Y., Clinton, S.K., Gerard, C., Sukhova, G.K., Libby, P., and Rollins, B.J. (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 2, 275-281.

Hardman, R.L., Jazaeri, O., Yi, J., Smith, M., and Gupta, R. (2014). Overview of classification systems in peripheral artery disease. *Semin Intervent Radiol* 31, 378-388.

Henriksen, T., Mahoney, E.M., and Steinberg, D. (1981). Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 6499-6503.

Higashimori, M., Tatro, J.B., Moore, K.J., Mendelsohn, M.E., Galper, J.B., and Beasley, D. (2011). Role of toll-like receptor 4 in intimal foam cell accumulation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 50-57.

Hopkins, P.N. (2013). Molecular biology of atherosclerosis. *Physiol Rev* 93, 1317-1542.

Ikuta, T., Eguchi, H., Tachibana, T., Yoneda, Y., and Kawajiri, K. (1998). Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 273, 2895-2904.

Iwano, S., Asanuma, F., Nukaya, M., Saito, T., and Kamataki, T. (2005). CYP1A1-mediated mechanism for atherosclerosis induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 708-712.

Kerzee, J.K., and Ramos, K.S. (2000). Activation of c-Ha-ras by benzo(a)pyrene in vascular smooth muscle cells involves redox stress and aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol* 58, 152-158.

Landmesser, U., Hornig, B., and Drexler, H. (2004). Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 109, II27-33.

Johnson, J.L., George, S.J., Newby, A.C., and Jackson, C.L. (2005). Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15575-15580.

Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874.

Libby, P. (2005). Act local, act global: inflammation and the multiplicity of "vulnerable" coronary plaques. *J Am Coll Cardiol* 45, 1600-1602.

Libby, P., Ridker, P.M., Hansson, G.K., and Leducq Transatlantic Network on, A. (2009). Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol* 54, 2129-2138.

Libby, P. (2012). Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 2045-2051.

Libby, P. (2017). Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy: Biological Basis of CANTOS and Beyond. *J Am Coll Cardiol* 70, 2278-2289.

Lin, S.J., Yen, H.T., Chen, Y.H., Ku, H.H., Lin, F.Y., and Chen, Y.L. (2003). Expression of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist in oxLDL-treated human aortic smooth muscle cells and in the neointima of cholesterol-fed endothelia-denuded rabbits. *J Cell Biochem* 88, 836-847

Linden, F., Domschke, G., Erbel, C., Akhavanpoor, M., Katus, H.A., and Gleissner, C.A. (2014). Inflammatory therapeutic targets in coronary atherosclerosis-from molecular biology to clinical application. *Front Physiol* 5, 455.

Ma, Q., and Baldwin, K.T. (2000). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. Role of the transcription activation and DNA binding of AhR. *J Biol Chem* 275, 8432-8438.

Ma, Q., and Whitlock, J.P., Jr. (1997). A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem* 272, 8878-8884.

Maron, B.J., Towbin, J.A., Thiene, G., Antzelevitch, C., Corrado, D., Arnett, D., Moss, A.J., Seidman, C.E., Young, J.B., American Heart, A., *et al.* (2006). Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional

Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113, 1807-1816.

McMillan, B.J., and Bradfield, C.A. (2007). The aryl hydrocarbon receptor is activated by modified low-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1412-1417.

Meng, D., Lv, D.D., Zhuang, X., Sun, H., Fan, L., Shi, X.L., and Fang, J. (2009). Benzo[a]pyrene induces expression of matrix metalloproteinases and cell migration and invasion of vascular smooth muscle cells. *Toxicol Lett* 184, 44-49.

Moyer, B.J., Rojas, I.Y., Kerley-Hamilton, J.S., Hazlett, H.F., Nemani, K.V., Trask, H.W., West, R.J., Lupien, L.E., Collins, A.J., Ringelberg, C.S., *et al.* (2016). Inhibition of the aryl hydrocarbon receptor prevents Western diet-induced obesity. Model for AHR activation by kynurenine via oxidized-LDL, TLR2/4, TGFbeta, and IDO1. *Toxicol Appl Pharmacol* 300, 13-24.

Mullenix, P.S., Andersen, C.A., and Starnes, B.W. (2005). Atherosclerosis as inflammation. *Ann Vasc Surg* 19, 130-138.

Naghavi, M., Libby, P., Falk, E., Casscells, S.W., Litovsky, S., Rumberger, J., Badimon, J.J., Stefanadis, C., Moreno, P., Pasterkamp, G., *et al.* (2003). From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* 108, 1664-1672.

Napoli, C., Paterno, R., Faraci, F.M., Taguchi, H., Postiglione, A., and Heistad, D.D. (1997). Mildly oxidized low-density lipoprotein impairs responses of carotid but not basilar artery in rabbits. *Stroke* 28, 2266-2271; discussion 2271-2262.

Nenan, S., Boichot, E., Lagente, V., and Bertrand, C.P. (2005). Macrophage elastase (MMP-12): a pro-inflammatory mediator? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100 Suppl 1, 167-172.

Nicolaou, G., and Erridge, C. (2010). Toll-like receptor-dependent lipid body formation in macrophage foam cell formation. *Curr Opin Lipidol* 21, 427-433.

Oesterling, E., Toborek, M., and Hennig, B. (2008). Benzo[a]pyrene induces intercellular adhesion molecule-1 through a caveolae and aryl hydrocarbon receptor mediated pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 232, 309-316.

Okey, A.B., Bondy, G.P., Mason, M.E., Kahl, G.F., Eisen, H.J., Guenther, T.M., and Nebert, D.W. (1979). Regulatory gene product of the Ah locus. Characterization of the cytosolic inducer-receptor complex and evidence for its nuclear translocation. *J Biol Chem* 254, 11636-11648.

Olivon, V.C., Fraga-Silva, R.A., Segers, D., Demougeot, C., de Oliveira, A.M., Savergnini, S.S., Berthelot, A., de Crom, R., Krams, R., Stergiopoulos, N., and da Silva,

R.F. (2013). Arginase inhibition prevents the low shear stress-induced development of vulnerable atherosclerotic plaques in ApoE^{-/-} mice. *Atherosclerosis* 227, 236-243

Parhami, F., Fang, Z.T., Fogelman, A.M., Andalibi, A., Territo, M.C., and Berliner, J.A. (1993). Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. *J Clin Invest* 92, 471-478.

Pedersen, E.M., Oyre, S., Agerbaek, M., Kristensen, I.B., Ringgaard, S., Boesiger, P., and Paaske, W.P. (1999). Distribution of early atherosclerotic lesions in the human abdominal aorta correlates with wall shear stresses measured in vivo. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 18, 328-333.

Pernomian, L., and da Silva, C.H. (2015). Current basis for discovery and development of aryl hydrocarbon receptor antagonists for experimental and therapeutic use in atherosclerosis. *Eur J Pharmacol* 764, 118-123.

Plump, A.S., Smith, J.D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J.G., Rubin, E.M., and Breslow, J.L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71, 343-353.

Poland, A., Glover, E., and Kende, A.S. (1976). Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem* 251, 4936-4946.

Poland, A.P., Glover, E., Robinson, J.R., and Nebert, D.W. (1974). Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase activity. Induction of monooxygenase activities and cytochrome P1-450 formation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice genetically "nonresponsive" to other aromatic hydrocarbons. *J Biol Chem* 249, 5599-5606.

Poland, A.P., Smith, D., Metter, G., and Possick, P. (1971). A health survey of workers in a 2,4-D and 2,4,5-T plant with special attention to chloracne, porphyria cutanea tarda, and psychologic parameters. *Arch Environ Health* 22, 316-327.

Psaltopoulou, T., Hatzis, G., Papageorgiou, N., Androulakis, E., Briasoulis, A., and Tousoulis, D. (2017). Socioeconomic status and risk factors for cardiovascular disease: Impact of dietary mediators. *Hellenic J Cardiol* 58, 32-42.

Reichard, J.F., Dalton, T.P., Shertzer, H.G., and Puga, A. (2006). Induction of oxidative stress responses by dioxin and other ligands of the aryl hydrocarbon receptor. *Dose Response* 3, 306-331.

- Raman, K.G., Gandley, R.E., Rohland, J., Zenati, M.S., and Tzeng, E. (2011). Early hypercholesterolemia contributes to vasomotor dysfunction and injury associated atherogenesis that can be inhibited by nitric oxide. *J Vasc Surg* 53, 754-763.
- Seneviratne, A., Hulsmans, M., Holvoet, P., and Monaco, C. (2013). Biomechanical factors and macrophages in plaque stability. *Cardiovasc Res* 99, 284-293.
- Shah, P.K., and Galis, Z.S. (2001). Matrix metalloproteinase hypothesis of plaque rupture: players keep piling up but questions remain. *Circulation* 104, 1878-1880.
- Stockinger, B., Di Meglio, P., Gialitakis, M., and Duarte, J.H. (2014). The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. *Annu Rev Immunol* 32, 403-432.
- Stoll, G., and Bendszus, M. (2006). Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke* 37, 1923-1932.
- Tabas, I., Williams, K.J., and Boren, J. (2007). Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* 116, 1832-1844.
- Thompson, R.C., Allam, A.H., Lombardi, G.P., Wann, L.S., Sutherland, M.L., Sutherland, J.D., Soliman, M.A., Frohlich, B., Mininberg, D.T., Monge, J.M., *et al.* (2013). Atherosclerosis across 4000 years of human history: the Horus study of four ancient populations. *Lancet* 381, 1211-1222.
- Valente, A.J., Irimpen, A.M., Siebenlist, U., and Chandrasekar, B. (2014). OxLDL induces endothelial dysfunction and death via TRAF3IP2: inhibition by HDL3 and AMPK activators. *Free Radic Biol Med* 70, 117-128.
- Vasquez, A., Atallah-Yunes, N., Smith, F.C., You, X., Chase, S.E., Silverstone, A.E., and Vikstrom, K.L. (2003). A role for the aryl hydrocarbon receptor in cardiac physiology and function as demonstrated by AhR knockout mice. *Cardiovasc Toxicol* 3, 153-163.
- Veldhoen, M., Hirota, K., Christensen, J., O'Garra, A., and Stockinger, B. (2009). Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *J Exp Med* 206, 43-49.
- Virmani, R., Burke, A.P., Kolodgie, F.D., and Farb, A. (2002). Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol* 15, 439-446.
- Vogel, C.F., Khan, E.M., Leung, P.S., Gershwin, M.E., Chang, W.L., Wu, D., Haarmann-Stemann, T., Hoffmann, A., and Denison, M.S. (2014). Cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and the inflammatory response: a role for nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 289, 1866-1875.

Vogel, C.F., Sciallo, E., Li, W., Wong, P., Lazennec, G., and Matsumura, F. (2007). RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol* 21, 2941-2955.

Vogel, C.F., Sciallo, E., and Matsumura, F. (2004). Activation of inflammatory mediators and potential role of ah-receptor ligands in foam cell formation. *Cardiovasc Toxicol* 4, 363-373.

Walisser, J.A., Glover, E., Pande, K., Liss, A.L., and Bradfield, C.A. (2005). Aryl hydrocarbon receptor-dependent liver development and hepatotoxicity are mediated by different cell types. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17858-17863.

Wang, C., Ye, Z., Kijlstra, A., Zhou, Y., and Yang, P. (2014). Activation of the aryl hydrocarbon receptor affects activation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 177, 521-530.

Wang, J., An, F.S., Zhang, W., Gong, L., Wei, S.J., Qin, W.D., Wang, X.P., Zhao, Y.X., Zhang, Y., Zhang, C., and Zhang, M.X. (2011). Inhibition of c-Jun N-terminal kinase attenuates low shear stress-induced atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Mol Med* 17, 990-999.

Watanabe, I., Tatebe, J., Namba, S., Koizumi, M., Yamazaki, J., and Morita, T. (2013). Activation of aryl hydrocarbon receptor mediates indoxyl sulfate-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Circ J* 77, 224-230.

Westhorpe, C.L., Dufour, E.M., Maisa, A., Jaworowski, A., Crowe, S.M., and Muller, W.A. (2012). Endothelial cell activation promotes foam cell formation by monocytes following transendothelial migration in an in vitro model. *Exp Mol Pathol* 93, 220-226.

Whitelaw, M., Pongratz, I., Wilhelmsson, A., Gustafsson, J.A., and Poellinger, L. (1993). Ligand-dependent recruitment of the Arnt coregulator determines DNA recognition by the dioxin receptor. *Mol Cell Biol* 13, 2504-2514.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO (2009) - Cardiovascular diseases (CVDs). Fact sheet n. 317.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO (2017). The top 10 causes of death. [acesso em 2018]. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

Wu, D., Nishimura, N., Kuo, V., Fiehn, O., Shahbaz, S., Van Winkle, L., Matsumura, F., and Vogel, C.F. (2011). Activation of aryl hydrocarbon receptor induces vascular inflammation and promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 1260-1267.

Zhao, L., and Tackett, R.L. (1998). Oxidized low-density lipoprotein inhibits acetylcholine-induced vasorelaxation and increases 5-HT-induced vasoconstriction in isolated human saphenous vein. *J Pharmacol Exp Ther* 284, 637-643.

ANEXOS

ANEXOS

Certificado da Comissão de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 120/2015, sobre o projeto intitulado "*O papel do Receptor de Hidrocarbonetos de Arila na instabilidade ou vulnerabilidade da placa aterosclerótica*", sob a responsabilidade da **Professora Doutora Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 29 de fevereiro de 2016.

We certify that the protocol nº 120/2015, entitled "*The Role of Aryl Hydrocarbon Receptor in atherosclerotic plaque instability or vulnerability*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 02/29/2016.

Ribeirão Preto, 29 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro
Vice-Presidente, em exercício, da
CEUA – FMRP – USP

Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – (16)3315-3301.