

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ALAN TONETTE BATISTA

EFEITO DO TRATAMENTO COM SILDENAFIL
SOBRE AS CÉLULAS DE BAÇO DE
CAMUNDONGOS ApoE η

VITÓRIA

2015

ALAN TONETTE BATISTA

**EFEITO DO TRATAMENTO COM SILDENAFIL
SOBRE AS CÉLULAS DE BAÇO DE
CAMUNDONGOS ApoE η**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção de Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Silvana dos Santos Meyrelles

VITÓRIA

2015

ALAN TONETTE BATISTA

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM SILDENAFIL
SOBRE AS CÉLULAS DE BAÇO DE
CAMUNDONGOS ApoE^{-/-}**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória, Dezembro de 2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Silvana dos Santos Meyrelles.

Universidade Federal do Espírito Santo

Orientadora

Avaliador Interno

Avaliador Externo

**Dedico a minha avó Élida (em memória), meus tios Luís e Sandra e a
minha noiva amada, Laís.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sem a sua presença em minha vida eu jamais teria forças pra continuar. Mesmo quando tudo parecia estar perdido, minha fé me manteve convicto de que Deus não me desampararia.

Agradeço a todos os professores do programa. Todos agem como segundos mensageiros intracelulares, ativados pela sede de conhecimento, que cominam na resposta de gerar novos mestres/doutores em fisiologia (kkkk). Obrigado professora Silvana, sua animação é contagiante. Obrigado professor Vasquez, o senhor é um exemplo a ser seguido, possui conhecimento e sabedoria invejáveis. Obrigado Bianca Campagnaro, você sempre me estimulou a buscar as repostas por conta própria, sem dar nada “mastigado”, isso é o verdadeiro significado de pesquisador. Obrigado aos professores(as) Ágata, Leo, Alessandra, Ivanita, Marcelo, Jones, Dalton, Maria do Carmo, em fim, a todos os professores do programa. De cada um pude absorver conhecimento e experiências que construíram a pessoa que sou hoje.

Agradeço a todos os amigos(as) do PPGCF, Marcos, Jamila, Brunela, Vitor, Vinicius, Ananda, Bianca Rodrigues, Marcela, Thaís, Rosana, Isabela, Viviane, Silvia... Enfim, são muitos a agradecer, aqueles que eu não citei sintam-se também agradecidos. A amizade foi de importância fundamental para minha jornada. Vocês tornaram o meu fardo mais leve, com palavras de incentivo e confraternizações.

Fran, muito obrigado. Não tenho palavras para descrever a pessoa maravilhosa que você é. Foi ótimo trabalhar com você. Peço sinceras desculpas por todos os desentendimentos que tivemos. Te desejo todo sucesso do mundo, você merece, afinal, mais do que ninguém, você sabe como foi suado a conquista desse título.

Agradeço a minha avó Élide (em memória), pois sem seus ensinamentos e sua presença na minha criação, jamais teria me tornada a pessoa que sou. Devo todos os meus ideais e princípios a ela.

Agradeço aos meus tios Sandra e Luís, que me acolheram quando não tive para onde ir. Se não fosse por sua compaixão, não teria acabado nem a graduação, quem dirá o mestrado. Junto deles também aproveito para agradecer aos meus primos, Letícia e Lucas, que, na verdade, são mais irmãos do que primos. Eles me fizeram sentir como se sempre tivesse morado aqui, muito obrigado.

Agradeço ao meu pai, que mesmo de longe, tenho certeza, que sempre se preocupou e torceu por mim. Sei que ele vai sentir muito orgulho por eu ter conquistado esse título.

Por fim, agradeço a minha namorada/noiva, pelo apoio, carinho, companheirismo, você é parte fundamental em minha vida. Jamais teria conseguido sem você. Te agradeço e te amo, do fundo do meu coração.

RESUMO

A aterosclerose é um processo inflamatório crônico que ocorre em vasos de grande calibre. Este processo patológico pode atingir vários órgãos debilitando suas funções. Sendo o baço um dos órgãos que pode ser atingido pela aterosclerose, e devido sua importância para o sistema imune e prevenção de várias doenças, o objetivo desse trabalho foi avaliar o tratamento do inibidor seletivo da fosfodiesterase 5 (Sildenafil) sobre o nível de EROS, fragmentação de DNA e ciclo celular das células desse órgão. Para tal fim, foram utilizados camundongos ApoE^{-/-} machos divididos em dois grupos, tratados por 3 semanas com Sildenafil 40mg/Kg/dia (ApoEs) ou apenas água (ApoEv). Para o grupo controle (C57) foram utilizados camundongos da linhagem C57Bl/6. Após 3 semanas de tratamento, quando os animais tinham 12 semanas de vida, foi feita a eutanásia para retirada do sangue da cavidade ventricular direita e dosagem do colesterol. Foi realizada esplenectomia e isolamento das células do baço através de maceração e lise de hemácias. As células isoladas foram submetidas a ensaios em CF para avaliar o nível de $\bullet\text{O}_2^-$ e H_2O_2 , bem como a porcentagem de células com DNA fragmentado e na fase G0/G1 do ciclo celular. Os resultados foram expressos como Média \pm EPM, utilizando ANOVA 1 via com *post hoc* de Fisher, $p < 0,05$. O tratamento com Sildenafil reduziu os níveis de $\bullet\text{O}_2^-$ (ApoEs: $6,6 \pm 0,30$ vs. ApoEv: $8,4 \pm 0,67$ vs. C57: $6,1 \pm 0,29 \times 10^2$ u.a) tanto quanto os de H_2O_2 (ApoEs: $3,3 \pm 0,30$ vs. ApoEv: $4,5 \pm 0,41$ vs. C57: $2,5 \pm 0,21 \times 10^3$ u.a), o que sugere um efeito antioxidante do Sildenafil. Também foi observada redução da porcentagem de DNA fragmentado (ApoEs: $0,74 \pm 0,19\%$ vs. ApoEv: $1,98 \pm 0,23\%$ vs. C57: $0,61 \pm 0,09\%$), provavelmente devido a menor incidência de dano ao DNA provocado pelas EROS. A redução do dano ao DNA permite que as células façam o ciclo celular, saindo, portanto, da fase quiescente, como mostra o resultado da porcentagem de células em G0/G1 (ApoEs: $89,59 \pm 2,5\%$ vs. ApoEv: $96,13 \pm 0,43\%$ vs. C57: $91,28 \pm 1,1\%$). Os resultados demonstram efeito protetor do Sildenafil ao DNA das células de baço dos camundongos ApoE^{-/-}, provavelmente, por redução dos níveis aumentados de EROS nesses animais.

Palavras-chave: ApoE^{-/-}, Aterosclerose, baço, Sildenafil.

ABSTRACT

The atherosclerosis is a chronic inflammatory process that happens in large vessels. This pathological process can reach several organs weakening its functions. How the spleen is an organ that can be reached by atherosclerosis, and because of its importance to the immune system and prevention of various diseases, the aim of this study was to evaluate the treatment of selective inhibitor of phosphodiesterase 5 (Sildenafil) on the cells of that organ, about level of ROS, DNA fragmentation and cell cycle. For such purpose, were used mice ApoE \neg , male and divided in two groups, treated for 3 weeks with Sildenafil 40 mg / kg / day (ApoEs) or only water (ApoEv). For the control group (C57), C57BL/6 lineage mice were used. After 3 weeks of treatment, when the animals were 12 weeks old, euthanasia was performed to remove blood from the right ventricular cavity and dosing cholesterol. Splenectomy was performed and isolation of spleen cells by maceration and lysis of red blood cells. The isolated cells were tested in FC to evaluate the level of \bullet O₂⁻ and H₂O₂, and the percentage of cells with fragmented DNA and the G₀/G₁ phase of the cell cycle. The results were expressed as Mean \pm SE, using ANOVA 1 way followed by post hoc Fisher, p <0.05. Treatment with Sildenafil reduced levels as the \bullet O₂ (ApoEs: 6,6 \pm 0,30 vs. ApoEv: 8,4 \pm 0,67 vs. C57: 6,1 \pm 0,29 x 10² u.a) as H₂O₂ (ApoEs: 3,3 \pm 0,30 vs. ApoEv: 4,5 \pm 0,41 vs. C57: 2,5 \pm 0,21 x 10³ a.u), suggesting an antioxidant effect of sildenafil. It was also observed reduction of fragmented DNA percentage (ApoEs: 0,74 \pm 0,19% vs. ApoEv: 1,98 \pm 0,23% vs. C57: 0,61 \pm 0,09%), probably due to lower incidence of DNA damage caused by ROS. Reducing of the damage in the DNA, allows cells to make the cell cycle, leaving, therefore, the quiescent phase, as the result of the percentage of cells in G₀ / G₁ (After: 89.59 \pm 2.1% * vs. APOEL: 96.13 \pm 2.2% vs. C57: 91.28 \pm 2.0%). The results demonstrate the protective effect of sildenafil DNA from spleen cells of ApoE \neg mice, probably by reducing elevated levels of ROS in these animals.

Keywords: ApoE \neg , Atherosclerosis, spleen, Sildenafil.

LISTA DE SIGLAS

ANOVA – teste da análise de variância

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CF – Citômetro de Fluxo

GMPc – Monofosfato de Guanosina Cíclico

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DAF – Diaminofluoresceína

DAF-2DA – Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína

DCF – Diclorofluoresceína

DCV – Doenças cardiovasculares

DHE – dihidroetídeo

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EROs – Espécies reativas de oxigênio

EPM – Erro padrão da média

FBS – *Fetal Bovine Serum*

FD – Fator de diluição

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HPF – Hidroxifenilfluoresceína

ICAM – Moléculas de aderência intercelular

IDL – Intermediate Density Lipoprotein

IL-6 – *Interleucina 6*

KDa – *Kilodalton*

LDL – Low Density Lipoprotein

NaCl – Cloreto de Sódio

NADPH – Hidrogênio fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NF K β – Fator nuclear Kappa Beta

NO – óxido nítrico

PBS – Phosphate Buffered Saline

PDE5 – fosfodiesterase 5

pH – Potencial de hidrogênio

PI – iodeteo de propídeo

RNase – Ribonuclease

ROS – Reactive Oxygen Species

RPM – Rotação Por Minuto

VCAM – Moléculas de Aderência Vascular

VLDL – Very Low Density Lipoprotein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema mostrando o início do processo oxidativo nos vasos sanguíneos devido ao aumento da concentração de LDL plasmático.....	18
Figura 2 – Estágios de desenvolvimento da lesão aterosclerótica.....	19
Figura 3 – Criação de camundongos ApoE ^{-/-}	20
Figura 4 – Esquema do baço	22
Figura 5 – Ilustração da passagem de eritrócitos para dentro do lúmen das veias sinusóides.....	22
Figura 6 – Esquema que demonstra o mecanismo de ação do Sildenafil nas células do músculo liso vascular.....	25
Figura 7 – Efeitos observados dos PDE5-inibidores sobre as células vasculares.....	26
Figura 8 – Isolamento de células do baço.....	35
Figura 9 – Contagem de células em câmara de Neubauer.....	37
Figura 10 – Citômetro de fluxo FACSCanto II acoplado a um computador.....	38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Representação das fases do ciclo celular no gráfico em histograma.....	41
Gráfico 2 – Medida do colesterol plasmático dos animais em mg/dL.....	43
Gráfico 3 – <i>Dot plot</i> padrão para as análises em citometria de fluxo.....	45
Gráfico 4 – Porcentagem de células na fase G0/G1 do ciclo celular.....	47
Gráfico 5 – Porcentagem de células na fase S/G2/M do ciclo celular.....	48
Gráfico 6 – Porcentagem de células na fase sub G0/G1 do ciclo celular.....	49
Gráfico 7 – Mediana da intensidade de fluorescência do DHE.....	50
Gráfico 8 – Mediana da intensidade de fluorescência para DCF.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos do Sildenafil sobre o peso do baço e número de células viáveis isoladas.....	44
Tabela 2 – Porcentagem de células nas fases do ciclo celular.....	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 EPIDEMIOLOGIA	16
1.2 ATEROSCLEROSE.....	17
1.3 BAÇO.....	21
1.4 INIBIDOR SELETIVO DA FOSFODIESTERASE 5 (SILDENAFIL)	24
2 JUSTIFICATIVA.....	28
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	32
4.2 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE COLESTEROL PLASMÁTICO.....	33
4.3 ISOLAMENTO DE CÉLULAS DO BAÇO.....	34
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS EM CÂMARA DE NEUBAUER	35
4.5 CITOMETRIA DE FLUXO	38
4.5.1 Ensaio de DHE.....	39
4.5.2 Ensaio de DCF.....	39
4.5.3 Ensaio do ciclo celular e fragmentação do DNA	40
4.6 ANÁLISE ESTADÍSTICA.....	41
5 RESULTADOS.....	43
5.1 COLESTEROL PLASMÁTICO	43
5.2 CONTAGEM DE CÉLULAS EM CÂMARA DE NEUBAUER E PESO DO BAÇO	44
5.3 CITOMETRIA DE FLUXO	45
5.3.1 Fases do ciclo celular	45
5.3.1.1 Fase G0/G1.....	46
5.3.1.2 Fase S/G2/M.....	47
5.3.1.3 Fase sub G0/G1	48
5.3.2 Nível de EROS.....	49
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	60
8 REFERÊNCIAS.....	62

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

As doenças cardiovasculares (DCV) representam uma grande parte das causas de morte em todo o mundo (WHO, 2011; BASSON 2008; STOCKER e KEANEY, 2004). Cerca de 17 milhões de pessoas morreram decorrente de complicações do aparelho circulatório no ano de 2008 (WHO, 2011). No Brasil, 72% dos óbitos são causados por doenças crônicas não transmissíveis, sendo que 31,3% destas são doenças cardiovasculares (MALTA, 2011). Dessa forma, o alto índice de DCV levou a 10% das internações no ano de 2010, o que engloba mais de um milhão e cem mil internos. Isso gerou um enorme gasto de verba pública, de aproximadamente dois bilhões e cem milhões de reais (R\$2.094.586.170,00), sendo, portanto, o principal gasto com internações daquele ano (BRASIL, 2011).

Outro fato preocupante é que as DCV têm levado prematuramente a morte (WHO, 2011). Dos 17 milhões de pessoas mortas devido a complicações do aparelho circulatório em 2008, 3 milhões não haviam completado 60 anos de idade (WHO, 2011).

A incidência de DCV em jovens se deve muito ao estilo de vida e fatores genéticos (Monego e Jardim, 2006; Romaldini, 2004), que somados levam a três doenças do aparelho circulatório mais freqüentemente ocorrentes, que são: insuficiência cardíaca, doenças isquêmicas do coração e acidente vascular cerebral (BRASIL, 2011), sendo as duas últimas intimamente relacionadas com a aterosclerose (WHO, 2011).

1.2 ATEROSCLEROSE

Aterosclerose é uma doença progressiva que se caracteriza pelo acúmulo de lipídeos e elementos fibróticos em artérias de grande calibre (Lusis, 2000). Em situações fisiológicas, o VLDL (very low density lipoprotein) é sintetizado no fígado e, através da corrente sanguínea, distribui colesterol e triglicerídeos para os tecidos. A diminuição do conteúdo de colesterol e triglicerídeos aumenta a densidade do VLDL transformando-o em uma IDL (intermediate density lipoprotein), que por sua vez possui dois destinos, uma parte é reabsorvida no fígado e outra distribui o restante de triglicerídeos e converte-se em LDL (low density lipoprotein), que é rico em colesterol (Parzianello, 2007). Em algumas situações, como dieta desbalanceada ou anomalias genéticas, levam a um acúmulo de LDL na corrente sanguínea (Ghosh, 2015; Meyrelles, 2011), o que favorece a ocorrência da aterosclerose.

Nessas situações, o acúmulo de LDL nos vasos sanguíneos leva a sua oxidação. O LDL oxidado aumenta a atividade da NADPH oxidase por meio da via da fosfolipase A₂ e liberação de ácido aracdônico (Meyer e Schmitt, 2000). O aumento de ânions superóxido derivado da NADPH oxidase mais ativa, age como segundo mensageiro ativando o fator nuclear K β (NF K β), que aumenta a expressão de moléculas de adesão (Figura 1). Isso faz com que haja recrutamento de monócitos, que por sua vez migram através da monocamada endotelial para dentro da túnica íntima, lá eles se multiplicam e se diferenciam em macrófagos, os quais fagocitam o LDL, formando uma célula espumosa (Lusis, 2000). Com o tempo a célula espumosa formada morre, gerando o centro necrótico da lesão (Lusis, 2000). Células musculares lisas migram da túnica média e se acumulam na região juntamente com elementos fibróticos, o que aumenta o tamanho da placa de ateroma (Lusis, 2000). O aumento do depósito de elementos fibróticos pode levar a ruptura da túnica íntima das artérias, fazendo com que fatores teciduais, induzidos pela inflamação, sinalizem alvos trombóticos que causam mais acúmulo e complicação na aterosclerose (Libby, 2002) (Figura 2).

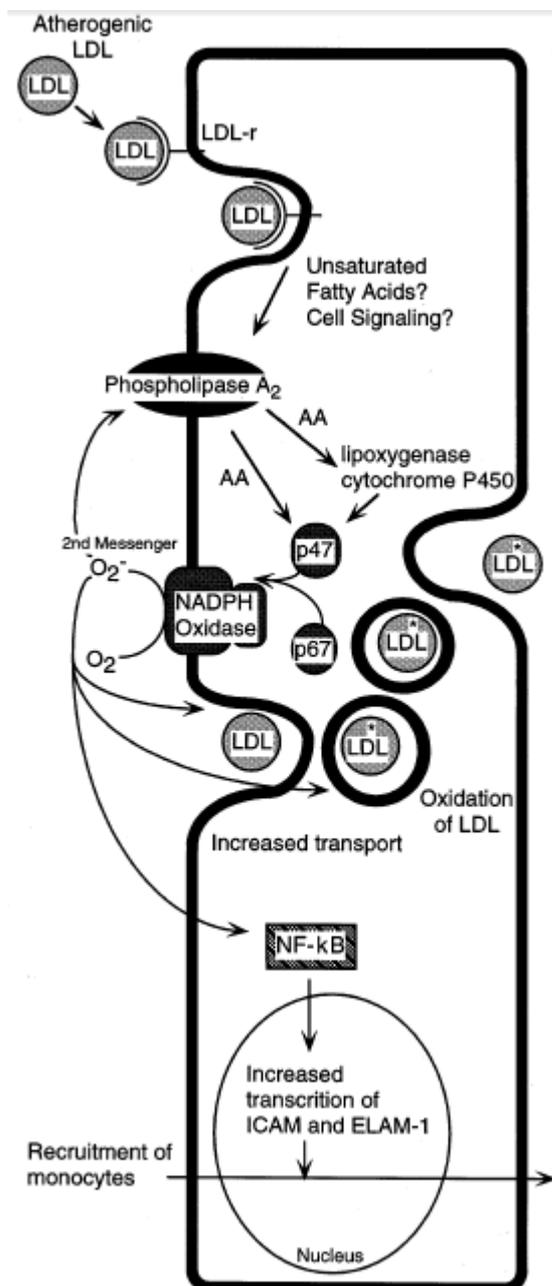


Figura 1 – Esquema mostrando o início do processo oxidativo nos vasos sanguíneos devido ao aumento da concentração de LDL plasmático.

Fonte: Adaptada de Meyer e Schmitt (2000)

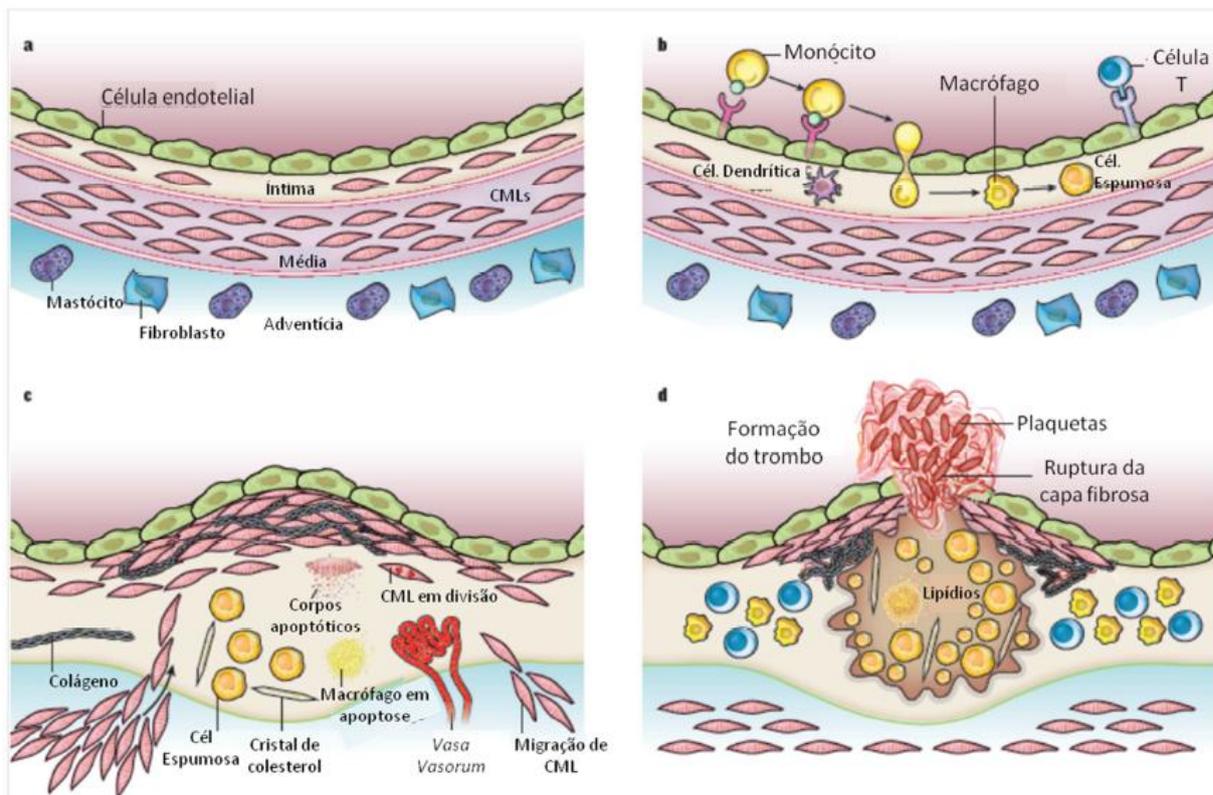


Figura 2 – Estágios de desenvolvimento da lesão aterosclerótica. Em A, corte esquemático representando uma artéria saudável. Em B, a disfunção endotelial e a oxidação do LDL na camada subendotelial vascular favorece o recrutamento de monócitos e macrófago para fagocitar esse LDL oxidado, dando assim origem às células espumosas e ao início do processo aterosclerótico. Em C, é possível observar a placa em estágio avançado, com o centro necrótico formado, angiogênese, migração de células musculares lisas e apoptose. Em d, quando ocorre ruptura da capa fibrosa e formação de trombos.

Fonte: Adaptado de LIBBY, RIDKER e HANSSON (2011)

Um modelo animal para o estudo da aterosclerose, muito utilizado e útil pela semelhança com o que ocorre em humanos, é o camundongo ApoE^{-/-}. Este modelo foi desenvolvido por dois laboratórios em 1992 (Plump *et al*, 1992; Piedrahita *et al*, 1992). O aumento do colesterol plasmático nesses animais consiste na inibição da expressão do gene que codifica a Apolipoproteína E.

A Apolipoproteína E é uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 34 KDa, com função de se ligar a receptores de LDL que, no fígado, faz a retirada de colesterol da circulação. Ela está presente nas VLDL, IDL e HDL. Sua síntese é feita principalmente no fígado, mas é produzida também no cérebro e por macrófagos (Meyrelles, 2011). Para inibir sua expressão, células-tronco embrionárias são geneticamente modificadas através de recombinação homologa e inseridas no blastômero de camundongos selvagens (C57Bl/6), dessa forma produzem quimeras, que cruzam entre si para formar o ApoE^{-/-}, conforme mostrado na figura 3 (Plump *et al*, 1992).

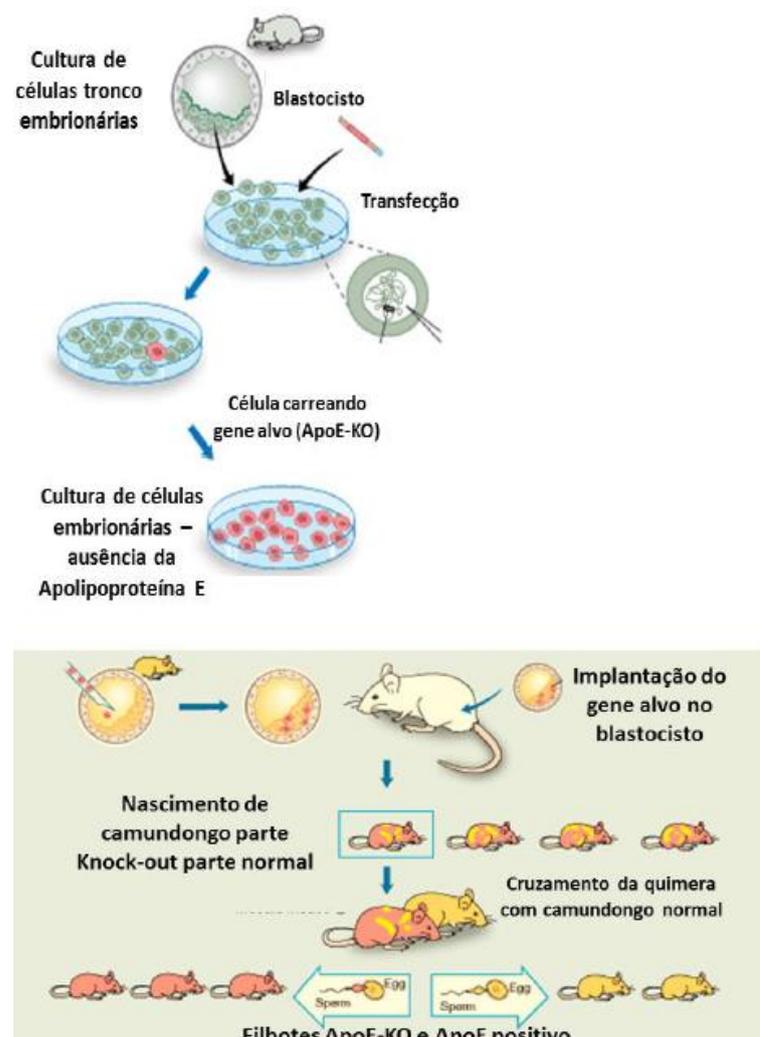


Figura 3 – Criação de camundongos ApoE^{-/-}. Mostra a inserção de células-tronco embrionárias geneticamente modificadas em blastômero de camundongos selvagens. O resultado é um animal quimera, do qual o cruzamento gera animais que expressão e não expressão a Apolipoproteína E.

Como a aterosclerose é um processo inflamatório crônico que ocorre nas artérias, as alterações fisiológicas podem levar a disfunção celular de vários órgãos, como por exemplo: medula óssea (Tonini, 2013), fígado (Rodrigues, 2013), rins (Ghosh, 2015) e baço (Potteaux, 2015).

1.3 BAÇO

O baço pode ser considerado um dos maiores filtros de sangue do corpo. Localiza-se no abdômen, diretamente abaixo do diafragma, e conectado ao estômago. É circundado por uma cápsula fibrosa de tecido conectivo, possui uma artéria aferente que se ramifica em arteríolas centrais, que desembocam na Polpa Branca e Polpa vermelha, em um tipo de circulação aberta. Na Polpa Branca encontram-se Linfócitos dos tipos T e B, responsáveis pela eliminação de microorganismos possivelmente nocivos. Na Polpa Vermelha estão presentes monócitos e macrófagos responsáveis pela eliminação de eritrócitos velhos (Figura 4). A volta do sangue para a circulação fechada ocorre pelas veias sinusóides (Figura 5). As veias sinusóides possuem frestas que permitem a passagem apenas de eritrócitos jovens, pois à medida que vão envelhecendo ocorre um enrijecimento de sua membrana que dificulta a passagem (Mebius, 2005). Portanto, o baço possui duas funções principais, uma imunológica (Polpa Branca), relacionada à eliminação de microorganismos nocivos, e outra hematológica (Polpa Vermelha), que está ligada a reciclagem de eritrócitos velhos e defeituosos, bem como a reciclagem do ferro presente no grupamento Heme da hemoglobina (Mebius e Kraal, 2005).

A aterosclerose pode afetar o funcionamento normal das células do baço, provavelmente, através do estresse oxidativo, assim como tem sido mostrado a influência das espécies reativas de oxigênio devido a aterosclerose em outros sistemas estudados (Tonini *et al*, 2013; Rodrigues *et al*, 2013). O aumento de EROS provoca peroxidação lipídica e protéica, além de gerar danos ao DNA,

como modificação química nas bases nitrogenadas, formação de sítios abásicos, cross-links DNA-protina e quebras de fita simples e dupla (Loft e Poulsen, 1996; Ashok *et al*, 1997), isso levará a perda da funcionalidade e morte prematura das células.

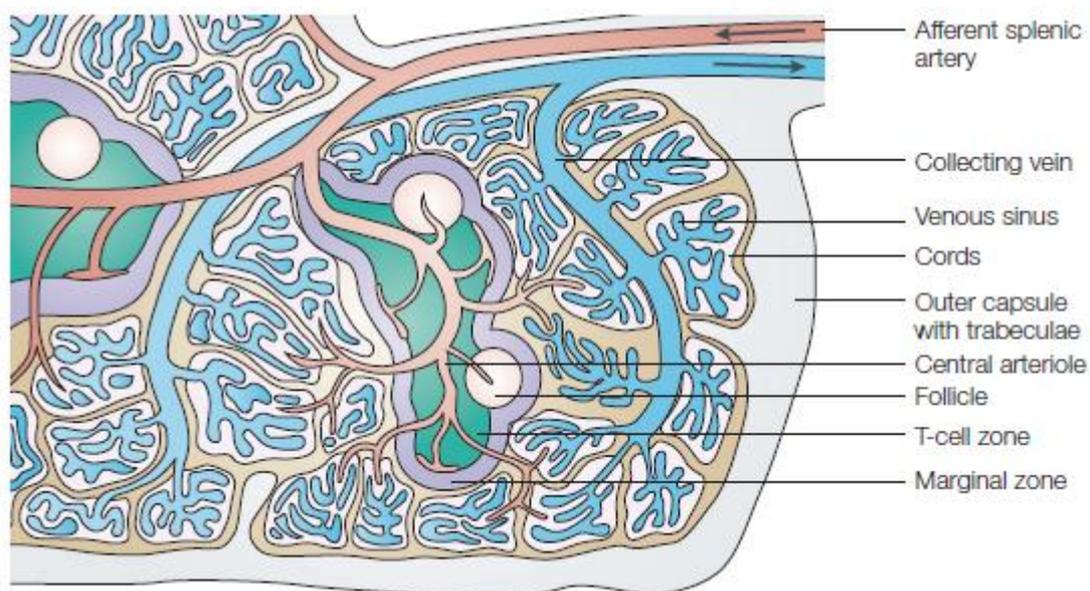


Figura 4 – Esquema do baço, mostrando a entrada do sangue pela artéria esplênica aferente, a passagem pelas polpas branca e vermelha, bem como a volta para circulação fechada através das vias sinusóides e via coletora.

Fonte: Adaptado de Mebius e Kraal (2005)

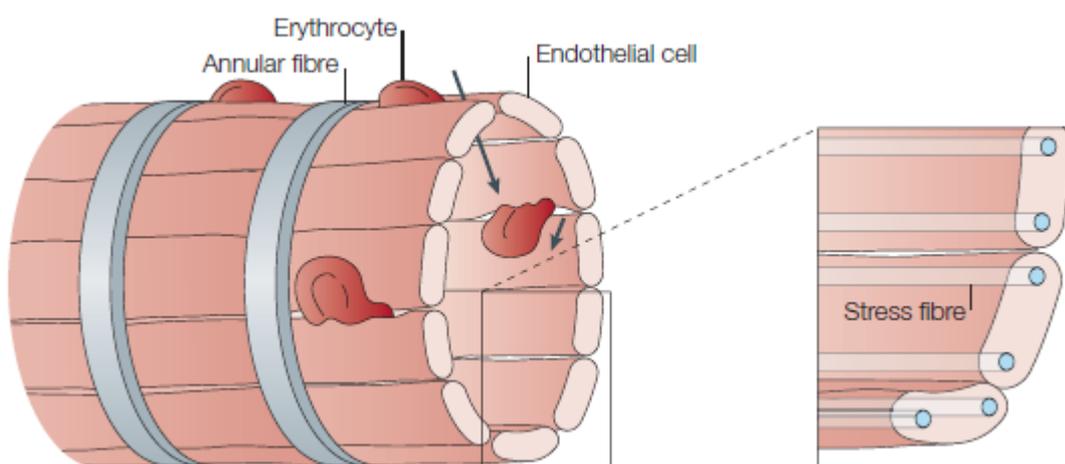


Figura 5 – Ilustração da passagem de eritrócitos para dentro do lúmen das veias sinusóides.

Fonte: Adaptado de Mebius e Kraal (2005)

Existem muitas evidências científicas que comprovam a importância do baço na prevenção de várias doenças. Como foi demonstrado em uma pesquisa feita em veteranos da Segunda Guerra Mundial, em que a remoção do baço devido a danos decorrentes de combates aumentou a incidência de pneumonia e doenças isquêmicas do coração (Robinette, 1977). Além das evidências de quadros sépticos relacionados com a esplenectomia, Shelley *et al*, em seu artigo de revisão “*Vascular complications after splenectomy for hematologic disorders*”, relata diversas complicações vasculares decorrentes da esplenectomia.

O baço também está relacionado com níveis de colesterol plasmático e agravamento da aterosclerose, como pode ser visto em experimentos realizados em coelhos, que demonstraram aumento do colesterol plasmático de coelhos esplenectomizados que recebiam dieta rica em colesterol quando comparados com aqueles que não eram esplenectomizados (Asai, 1988). Nesse estudo os efeitos observados foram atribuídos a um papel do baço no metabolismo de lipídeos.

Outro estudo, dessa vez em camundongos espontaneamente hipercolesterolêmicos, demonstrou que a esplenectomia agravava drasticamente o processo aterosclerótico. Além disso, os camundongos hipercolesterolêmicos jovens que recebiam Linfócitos B derivados do baço tiveram redução significativa do desenvolvimento da doença (Caligiuri, 2002). Nesse estudo foi sugerido um papel protetor das células B derivadas do baço na progressão da doença.

Assim como vários outros órgãos, o baço tem sua funcionalidade prejudicada pela aterosclerose. Devido a sua importância na proteção do desenvolvimento de várias doenças, este estudo teve como finalidade observar os efeitos do tratamento com Sildenafil nas células do baço de camundongos ApoE^{-/-}.

1.4 INIBIDOR SELETIVO DA FOSFODIESTERASE 5 (SILDENAFIL)

O Sildenafil, descoberto em 1989, apresenta alta seletividade à PDE5 (fosfodiesterase 5), responsável pela degradação do cGMP (Glossmann et al., 1999; Raja & Nayak, 2004). Por meio da inibição da hidrólise do Cgmp (Figura 6), o sildenafil prolonga sua ação, aumentando o relaxamento do músculo liso vascular em resposta à ativação da cascata NO/cGMP (Raja & Nayak, 2004; Rybalkin et al., 2003). Clinicamente, observou-se que o sildenafil promove dilatação de coronárias epicárdicas, melhora a disfunção endotelial e inibe ativação plaquetária em pacientes com doença arterial coronariana (Halcox et al., 2002). Em pacientes diabéticos, o tratamento crônico com sildenafil foi capaz de melhorar a função endotelial e reduzir marcadores de inflamação vascular (ICAM, VCAM, IL-6 e proteína C reativa) (figura 4) (Aversa et al., 2008).

Em animais experimentais, a inibição da PDE5 por meio do uso de sildenafil promoveu redução da peroxidação lipídica, além disso, aumentou a capacidade antioxidante total em ratos diabéticos (Milani et al., 2005). Também atuou inibindo a formação de $\bullet\text{O}_2^-$ no corpo cavernoso de ratos hipercolesterolêmicos, conseqüentemente melhorando o relaxamento do músculo liso, mesmo na deficiência de produção de NO endógeno (Shukla et al., 2005). A figura 7 mostra os efeitos dos inibidores da fosfodiesterase já conhecidos sobre as células de vasos sanguíneos.

Sendo assim, a utilização do Sildenafil surge como uma opção promissora para o tratamento de disfunção celular decorrente da aterosclerose em vários órgãos. Contudo, os efeitos do Sildenafil nas células de baço afetadas pela aterosclerose, ainda não foram investigados, sobretudo em modelos experimentais de hipercolesterolemia.

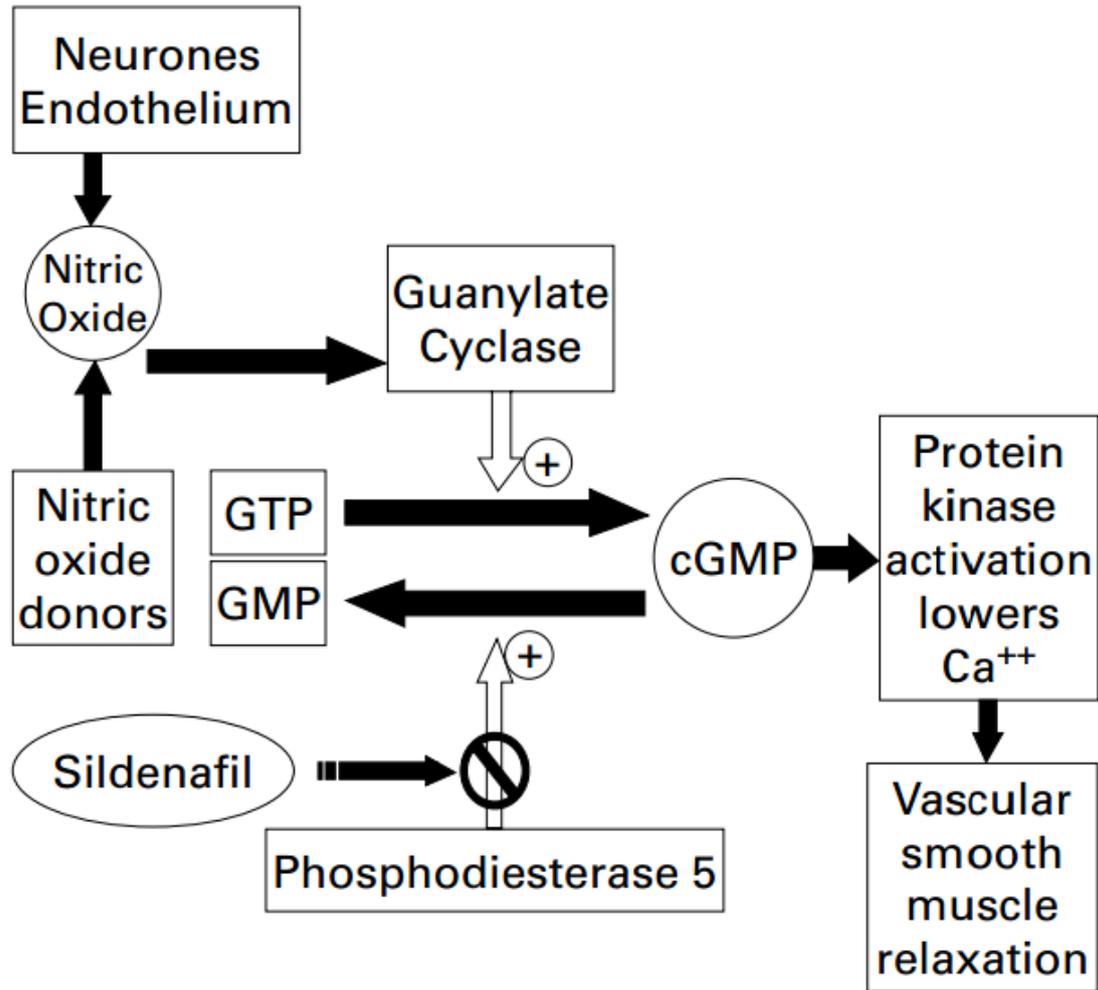


Figura 6 – Esquema que demonstra o mecanismo de ação do Sildenafil nas células do músculo liso vascular.

Fonte: Adaptado de Abrams et al (2000)

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

De acordo com a importância da funcionalidade das células do baço para a prevenção de doenças sépticas, bem como para as doenças do sistema circulatório e metabolismo lipídico, o presente trabalho pretende restaurar a funcionalidade de células do baço através de redução da genotoxicidade provocada pelas espécies reativas de oxigênio, que estão aumentadas em camundongos ApoE^{-/-}, através do uso do inibidor seletivo da fosfodiesterase 5 (Sildenafil). Uma vez que, como já foi verificado em nosso grupo, possui efeitos que contribuem para o balanço redox e diminuição dos sinais da inflamação.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo avaliar em citometria de fluxo o efeito do tratamento com Sildenafil sobre as células do baço de camundongos ApoE^{-/-}.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil lipídico dos animais;
- Avaliar o número de células isoladas, em Câmara de Neubauer;
- Avaliar o nível das espécies reativas de oxigênio:
 - Peróxido de hidrogênio;
 - Ânions superóxido;
- Avaliar o nível de fragmentação do DNA;
- Avaliar a porcentagem de células em estado quiescente (fase G0/G1) do ciclo celular, bem como na fase de síntese de DNA e divisão celular (fase S/G2/M).

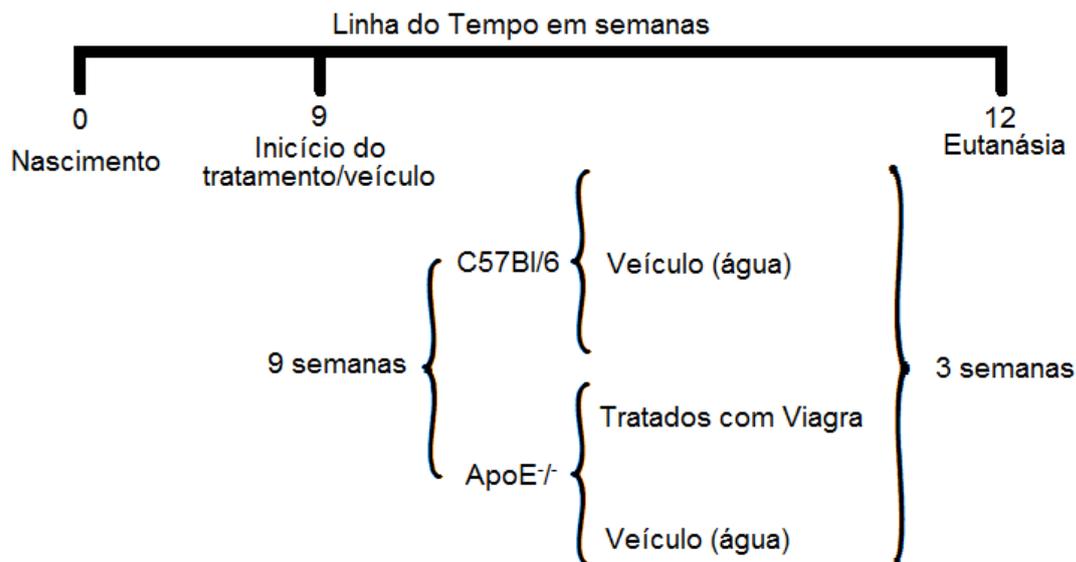
Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a realização desse estudo, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) das linhagens C57Bl/6 e ApoE^{-/-}, machos e com idade de 12 semanas de vida, provenientes do biotério do Laboratório de Fisiologia Translacional no Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais estudados eram filhos de casais irmãos para garantir que fossem isogênicos, ou seja, para que houvesse a mínima variabilidade genética entre eles. Estes animais foram mantidos em gaiolas onde recebiam água e comida *ad libitum*, o biotério onde permaneceram mantinha a temperatura controlada (22±2°C), bem como a umidade (70%), em um ciclo de 12 horas claro/escuro. O uso ético desses animais estava de acordo com o estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pela lei Brasileira que regulamenta procedimentos para o uso científico de animais (Lei Arouca) nº 11.794. Os protocolos desenvolvidos tiveram aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA.

Os animais foram divididos em três grupos e tratados com Viagra (Citrato de Sildenafil 40mg/Kg/dia) ou veículo (água) a partir da nona semana até a décima segunda semana de vida, como mostra o esquema a seguir.



A partir da décima segunda semana de vida os animais foram eutanasiados para a coleta do sangue, com finalidade da avaliação do seu colesterol plasmático, e esplenectomia, para isolamento de células do baço e análise em citometria de fluxo.

4.2 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE COLESTEROL PLASMÁTICO

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (0,15M) e submetidos a toracotomia. Dessa forma a cavidade torácica foi exposta dando acesso ao coração. Através de uma punção intracardíaca no ventrículo direito, o sangue foi coletado e 0,5mL dessa amostra foi centrifugada por 10 minutos à 4000 rpm para separação do plasma.

Para determinar os níveis de colesterol plasmático, foi utilizado o kit enzimático comercial (Bioclin, Brasil) seguindo suas instruções de uso. O mecanismo desse kit consiste na ação da enzima Lipoprotína Lipase que forma colesterol livre e ácidos graxos a partir de ésteres de colesterol. O colesterol formado reage com oxigênio, formando colesterol-3-ona e peróxido de hidrogênio. Por fim, o peróxido de hidrogênio formado reage com fenol e 4-Aminoantipirina

para formar um cromógeno cor cereja, que tem a absorvância de seu espectro determinada pelo espectrofotômetro (Biospectro SP-220). Comparando então a absorvância de uma solução padrão de concentração conhecida, proveniente do kit, com o achado nas amostras, foi possível determinar através de cálculo o colesterol total no plasma dos animais.

4.3 ISOLAMENTO DE CÉLULAS DO BAÇO

Após a coleta do sangue descrita no tópico anterior, foi realizada a esplenectomia. O baço, após removido, foi colocado em uma placa de Petri contendo 2mL de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Sigma) a fim de manter as células nutridas. A placa de Petri permaneceu sobre uma placa de gel térmico congelada, para que o meio de cultura DMEM ficasse resfriado, diminuindo assim o metabolismo das células do baço até que o órgão fosse macerado com auxílio de um bisturi (Figura 8). O material foi homogeneizado e filtrado através de um *cell strainer* de 70µm, para evitar pedaços grandes de tecido e garantir um isolamento celular mais puro.

Ao filtrado foi adicionado mais 3mL de meio de cultura DMEM, a suspensão foi homogeneizada e centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos (Eppendorf: Centrifuge 5702). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2mL de solução de lise (1x) (BD Pharm Lyse), para que houvesse lise de hemácias. A suspensão permaneceu por 5 minutos a 37°C. Após o período, foi adicionado 4 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline), para que houvesse diluição da solução de lise e diminuição da sua ação sobre as células. Novamente a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 1200 rpm. O sobrenadante foi cuidadosamente removido, as células foram ressuspensas em 2mL de solução de lise, e o procedimento se repetiu. Após a repetição das etapas de lise das hemácias, o sobrenadante foi removido cuidadosamente e foi adicionado 90% de meio de cultura DMEM e 10% de FBS (*Fetal Bovine*

Serum) em uma solução final de 1mL. As células permaneceram nessa solução em temperatura de 2°-8°C até o momento da análise em citômetro de fluxo.



Figura 8 –Isolamento de células do baço. Foi retirado o baço do animal, colocado em uma placa de Petri sobre o gelo para ser macerado (A e B). Em seguida, o baço era homogeneizado em meio de cultura DMEM (C).

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS EM CÂMARA DE NEUBAUER

Para quantificar o valor aproximado de células viáveis após o isolamento, foi feita a contagem em Câmara de Neubauer. Para tal, foi realizada uma diluição de uma alíquota de 10µL proveniente de 1mL da suspensão de células isolada. Os 10µL foram diluídos em 90µL de PBS. Dessa solução foi retirado uma alíquota de 10µL e novamente diluído em 10µL de solução de Turk (ácido acético 2% com azul de metileno), com função de lisar hemáceas. Por fim, 10µL dessa solução foi diluído em solução Azul de Tripano 0,4%, com finalidade de corar células mortas, já que em membranas integras o Azul de Tripano é impermeável à célula. Uma alíquota de 10µL dessa última preparação foi posta em Câmara de Neubauer, que consiste em uma lâmina de microscópio especial com uma superfície espelhada quadriculada de dimensão 3x3mm. A contagem foi feita em esquema de “L”, para evitar que a mesma célula fosse contatada mais de uma vez (Figura 9).

Através da equação a seguir foi possível determinar o valor aproximado de células na suspensão de 1mL inicial, que foi usado para retirar a primeira alíquota:

QC = FD X 10⁴ x 1mL x nº de células, onde:

4

FD → Fator de diluição (40x)

10⁴ → Fator de correção da Câmara de Neubauer

1mL → Volume da amostra

nº de células → Média do número de células contadas

4

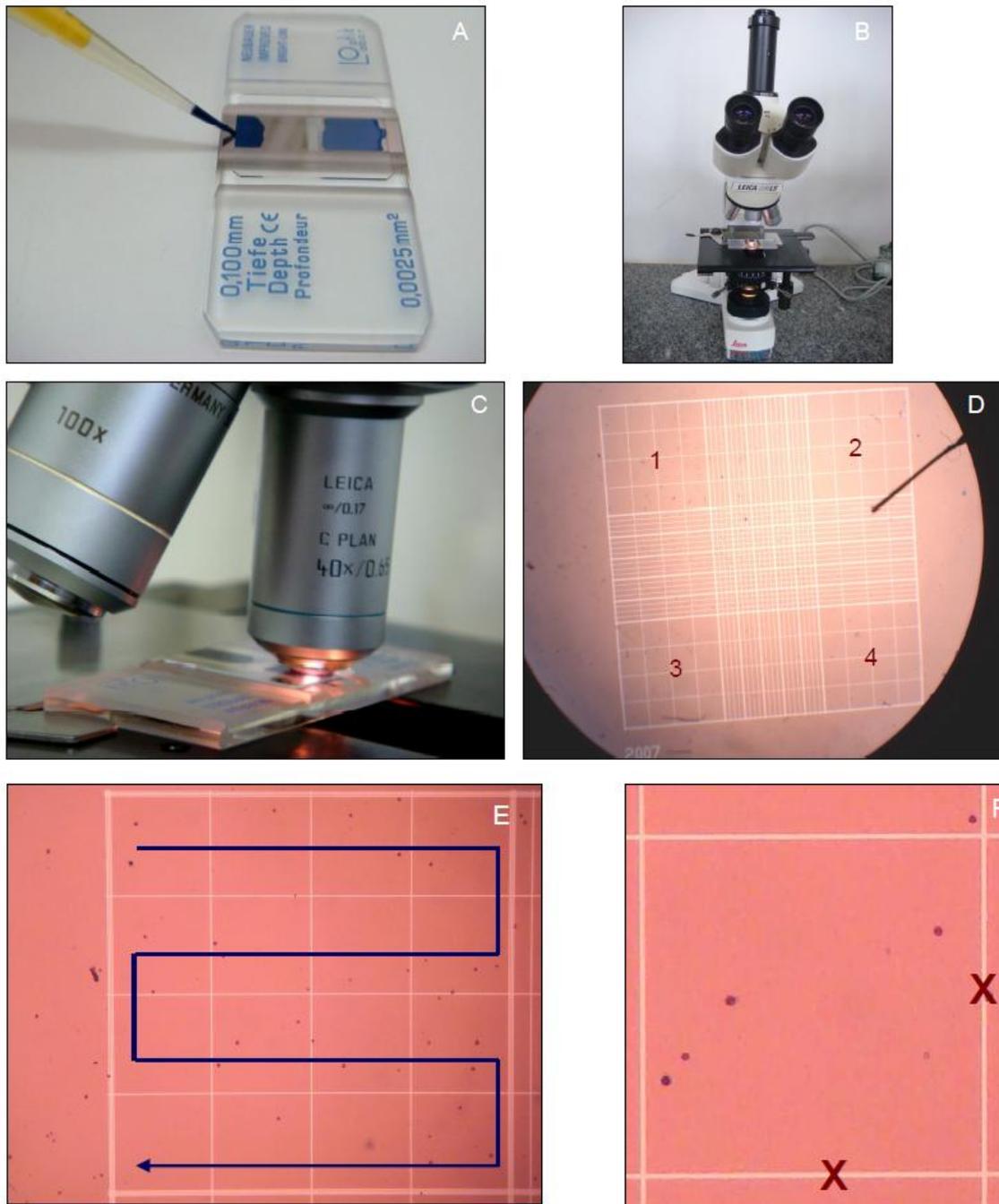


Figura 9 – Contagem de células em câmara de Neubauer. Suspensão celular misturada com os corantes sendo adicionada a câmara (A), a análise foi feita em microscópio óptico (B), no aumento de 40x (C), as células foram contadas nos quatro quadrantes externos da câmara, indicados pelos números (D), detalhe de um quadrante mostrando o sentido da contagem (E) e as células que se encontravam sobre as linhas marcadas com o x não eram contadas (F).

4.5 CITOMETRIA DE FLUXO

Para quantificar os níveis de ROS, foram feitos os ensaios de dihidroetídeo (DHE, para ânions superóxido), diclorofluoresceína (DCF, pra peróxido de hidrogênio), diaminofluoresceína (DAF, para óxido nítrico) e hidroxifenilfluoresceína (HPF, para o ânion peroxinitrito e radical hidroxila). Além disso, também foi realizado ensaio com iodeteo de propídeo (PI), para análise do ciclo celular e porcentagem de DNA (ácido desoxirribonucléico) fragmentado nas células. Para estes ensaios foi utilizado o citômetro de fluxo (FACSCanto II Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Diego, CA, USA – Figura 10) acoplado a um computador. Os dados foram adquiridos e analisados pelos softwares BDFACSDiva e FCSExpress, respectivamente.



Figura 10 – Citômetro de fluxo FACSCanto II acoplado a um computador

4.5.1 Ensaio de DHE

Para análise dos níveis de ânions superóxido, uma alíquota de 1×10^6 de células foram incubadas com $160 \mu\text{M}$ de DHE por 30 minutos a 37°C no escuro. Para o controle positivo as células foram incubadas, além do DHE, com doxorrubicina $10 \mu\text{M}$ por 5 minutos a 37°C no escuro. O DHE, ao entrar na célula, rapidamente reage com o ânion superóxido para formar etídeo, que por sua vez se liga ao DNA causando amplificação da fluorescência vermelha detectada pelo citômetro e diretamente proporcional a concentração de ânions superóxido nas células.

4.5.2 Ensaio de DCF

Para análise dos níveis de peróxido de hidrogênio, uma alíquota de 1×10^6 de células foram incubadas com 20mM de DCF-DA (2',7'- diacetato de dicloro fluoresceína) por 30 minutos a 37°C no escuro. Para o controle positivo as células foram incubadas, além do DCF-DA, com peróxido de hidrogênio 50mM por 5 minutos a 37°C no escuro. DCF-DA é uma substância que não emite fluorescência e é permeável a célula. Ao entrar na célula, sofre ação de esterases formando um composto intermediário DCFH que é passível de sofrer oxidação por peróxido de hidrogênio para formar DCF, que por sua vez emite uma fluorescência detectável pelo citômetro e diretamente proporcional a concentração de peróxido de hidrogênio nas células.

4.5.3 Ensaio do ciclo celular e fragmentação do DNA

Para análise do ciclo celular e fragmentação de DNA, foi feita a preparação de uma solução com 5µL de RNase, 15µL de Triton X-100, 0,0061g de Tris-Cl, 0,0087g de NaCl e água Milli-Q qsp 15mL. O pH foi ajustado para 7,6. Uma alíquota de 1×10^6 da amostra de células foi encubada com 500µL da solução por 10 minutos a -20°C no escuro. Após o tempo decorrido, a suspensão de células foi analisada no citômetro de fluxo.

O PI é uma molécula impermeável a membrana íntegra da célula, mas quando a membrana celular se torna permeável o PI tem a capacidade de se intercalar ao DNA, que ao ser excitado pelo citômetro emite fluorescência que é proporcional ao conteúdo de DNA celular. Dessa forma é possível diferenciar as fases do ciclo onde, em ordem crescente da intensidade de fluorescência, G₀/G₁ apresentam menor intensidade de fluorescência por estarem em fase quiescente, seguida pela fase S por estar sintetizando DNA e, por fim, fase G₂/M com maior intensidade por terem duplicado todo seu conteúdo de DNA. Também é possível verificar a porcentagem de DNA fragmentado, representado como uma fase sub-G₀/G₁, onde fragmentos de DNA emitem fluorescência menor que a fase quiescente (Gráfico 1).

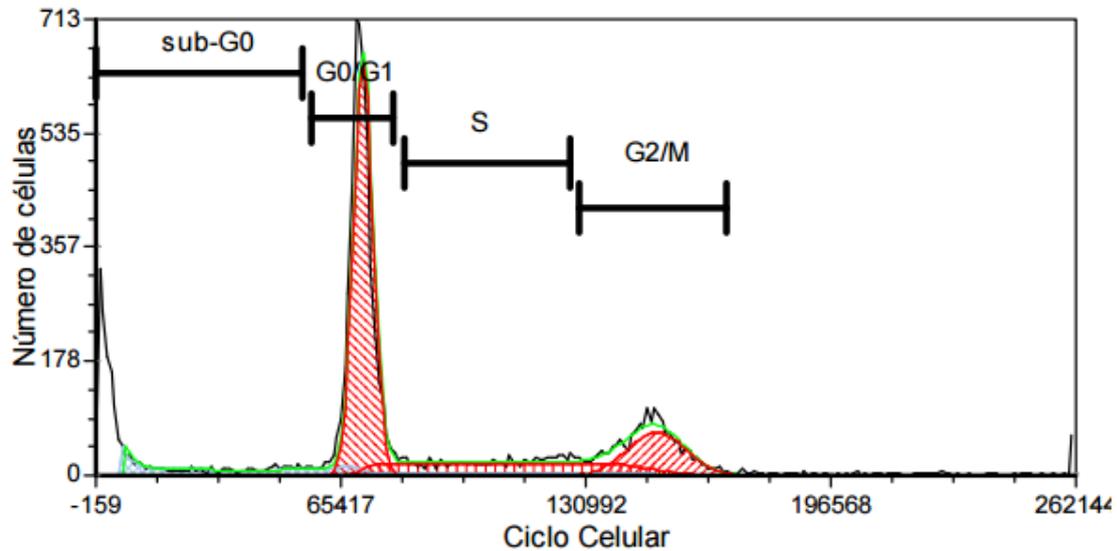


Gráfico 1 – Representação das fases do ciclo celular no gráfico em histograma. O eixo “x” representa a intensidade de fluorescência ao PI, e o eixo “y” a quantidade de células que varia em função do eixo “x”.

4.6 ANÁLISE ESTADÍSTICA

Os dados foram expressos como média±EPM. O teste Kolmogorov-Smirnov foi usado para testar a normalidade dos dados. Para testar as hipóteses foi feito teste da análise de variância (ANOVA) através do *software* GraphPad prism 6 seguido do *post hoc* de Fisher's. A diferença entre os dados foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 COLESTEROL PLASMÁTICO

De acordo com o esperado, os animais da linhagem ApoE^{-/-} mostram aumento do colesterol plasmático quando comparados ao grupo controle (Gráfico 2). Os animais controle apresentaram um nível de colesterol plasmático de 112,55±7,33, enquanto o colesterol plasmático dos animais ApoE^{-/-}, que receberam veículo e Sildenafil, foram de 542,09±10,26 e 553,89±14,68, respectivamente.

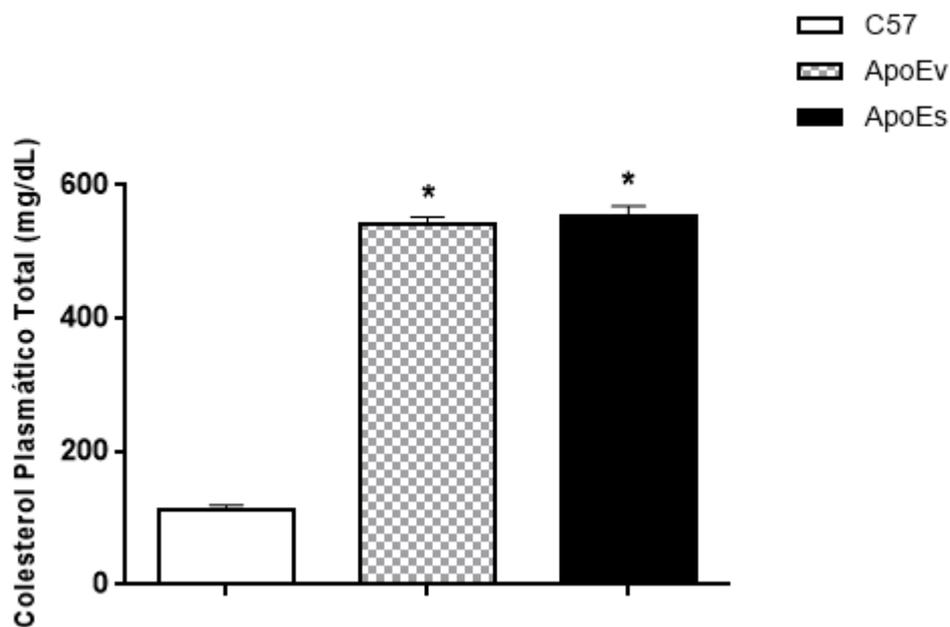


Gráfico 2 – Medida do colesterol plasmático dos animais em mg/dL. C57 (n=8), ApoEv (n=8), ApoEs (n=8). Valores expressos como média±EPM. *p<0,05 vs C57. #p<0,05 vs ApoEv.

5.2 CONTAGEM DE CÉLULAS EM CÂMARA DE NEUBAUER E PESO DO BAÇO

A contagem de células em câmara de Neubauer, realizada anteriormente aos ensaios da citometria de fluxo, teve o intuito de estimar a porcentagem de células viáveis e o número de células que foram isoladas do baço. Todas as amostras que foram submetidas à citometria de fluxo, apresentaram viabilidade superior a 95%. As células inviáveis podiam ser identificadas através do corante azul de tripano.

Foi possível notar uma relação entre o peso do baço e o conteúdo de células viáveis, sumarizados na tabela 1. Onde, nos animais que recebiam Sildenafil, foi possível notar um aumento do número de células e redução da atrofia do baço, que era presente nos animais do grupo ApoEv. Mesmo assim, os resultados mostram que, tanto para o número de células quanto para o peso do baço, o tratamento com Sildenafil não foi suficiente para que os valores se igualassem estatisticamente aos do grupo controle.

Tabela 1 – Efeitos do Sildenafil sobre o peso do baço e número de células viáveis isoladas.

	C57	ApoEv	ApoEs
Peso do baço (g)	0,22 ± 0,01	0,11 ± 0,01*	0,17 ± 0,02* [#]
Número de células (x10⁷)	3,74 ± 0,27	1,42 ± 0,14*	2,14 ± 0,11* [#]

Nota: Valores expressos como média±EPM. *p<0,05 vs C57. [#]p<0,05 vs ApoEv.

5.3 CITOMETRIA DE FLUXO

Para todas as análises feitas em citometria de fluxo, os parâmetros de tamanho (FSC, forwards cattered light) e complexidade interna celular (SSC, side scattered light) tiveram o ajuste de voltagem padronizados, dessa forma esperávamos manter as análises sempre sobre a mesma população de células. Ambos os parâmetros foram expressos pela área (Gráfico 3).

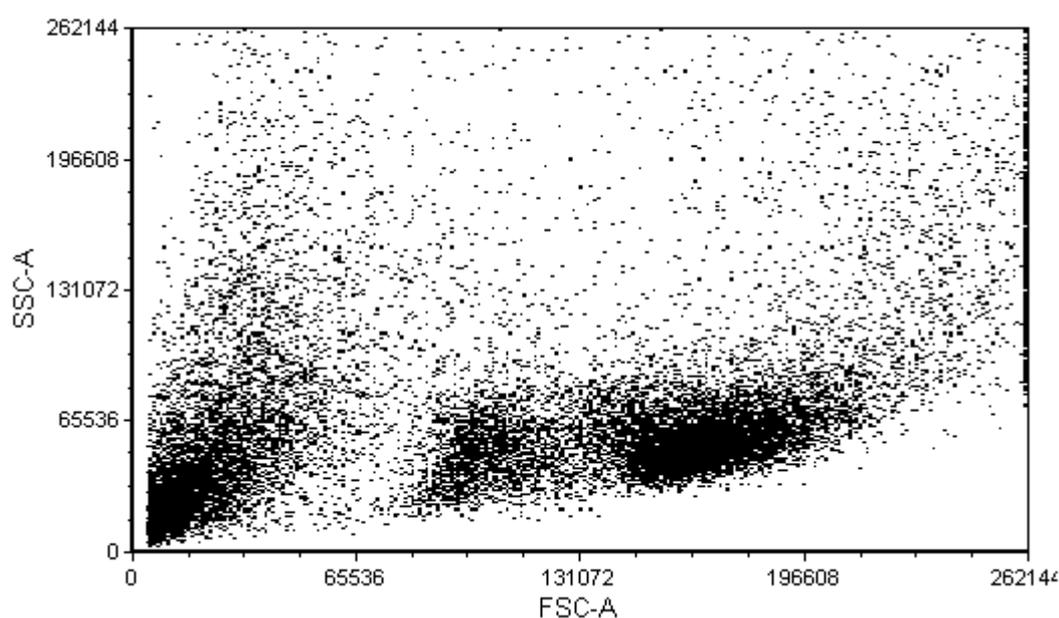


Gráfico 3 – Dot plot padrão para as análises em citometria de fluxo.

5.3.1 Fases do ciclo celular

Os resultados da porcentagem de células nas fases do ciclo celular (fase sub G0/G1, G0/G1, S/G2/M), estão sumarizados na **tabela 2**. Os resultados demonstram migração das células da fase quiescente (G0/G1) para as fases de divisão celular (S/G2/M), nos animais que recebiam Sildenafil. É possível

notar também, diminuição do percentual de células que apresentavam DNA fragmentado (fase sub G0/G1) no grupo ApoEs.

Tabela 2 – Porcentagem de células nas fases do ciclo celular.

	C57	ApoEv	ApoEs
%G0G1	91,28±1,1	96,13±0,43*	89,59±2,5 [#]
%S/G2/M	7,42±0,79	3,72±0,26*	5,95±0,66 [#]
%subG0/G1	0,61±0,09	1,98±0,43*	0,74±0,19 [#]

Nota: Valores expressos como média±EPM. *p<0,05 vs C57. [#]p<0,05 vs ApoEv.

5.3.1.1 Fase G0/G1

O período em que as células não estão sintetizando DNA nem se dividindo, é representado pelas fases G0 e G1 do ciclo celular (fase quiescente). O tratamento com Sildenafil reduziu o número de células nessa fase comparado com o grupo veículo. Não houve diferença entre os grupos ApoEs e C57 (ApoEs: 89,59±2,5% vs. ApoEv: 96,13±0,43% vs. C57: 91,28±1,1%), como pode ser observado na Gráfico 4.

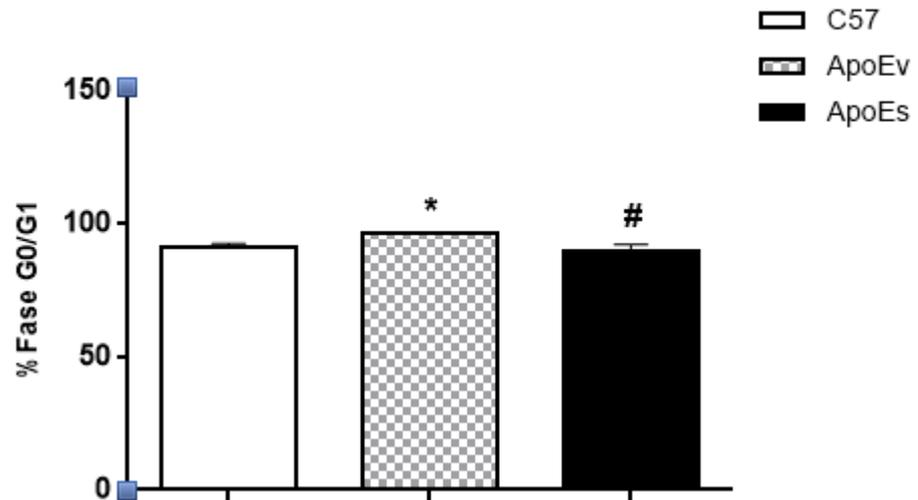


Gráfico 4 – Porcentagem de células na fase G0/G1 do ciclo celular. C57 (n=9), ApoEv (n=8), ApoEs (n=7). Valores expressos como média±EPM. *p<0,05 vs C57. #p<0,05 vs ApoEv.

5.3.1.2 Fase S/G2/M

As fases S, G2 e M, representam as fases de síntese (S) e divisão celular (G2/M). Foi possível notar que a porcentagem de células nessas fases aumentou nos animais que eram tratados com Sildenafil, quando comparados ao grupo ApoEv (ApoEs: 5,95±0,66% vs. ApoEv: 3,72±0,26%). Aqui também não houve diferença entre os grupos C57 e ApoEs (C57: 7,42±0,79% vs. ApoEs: 5,95±0,66%), tal como mostra a Gráfico 5.

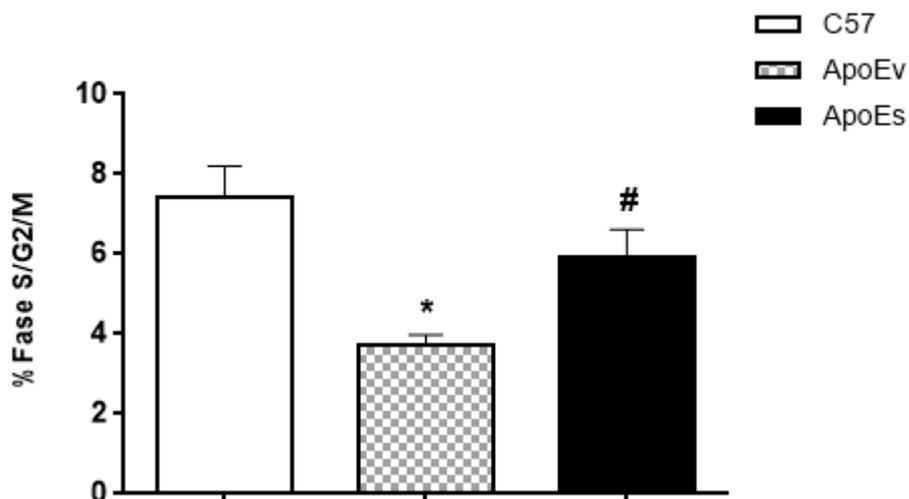


Gráfico 5 – Porcentagem de células na fase S/G2/M do ciclo celular. C57 (n=9), ApoEv (n=8), ApoEs (n=7). Valores expressos como média±EPM. *p<0,05 vs C57. #p<0,05 vs ApoEv.

5.3.1.3 Fase sub G0/G1

A fase sub G0/G1 do ciclo celular, identificada pela intensidade de fluorescência do PI, representa a porcentagem de células com DNA fragmentado. Nos animais que eram tratados com Sildenafil o número de células que apresentava DNA fragmentado era menor comparado com o grupo que recebia apenas veículo (ApoEs: 0,74±0,19% vs. ApoEv: 1,98±0,43%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ApoEs e C57 (C57: 0,61±0,09% vs. ApoEs: 0,74±0,19%. Gráfico 6).

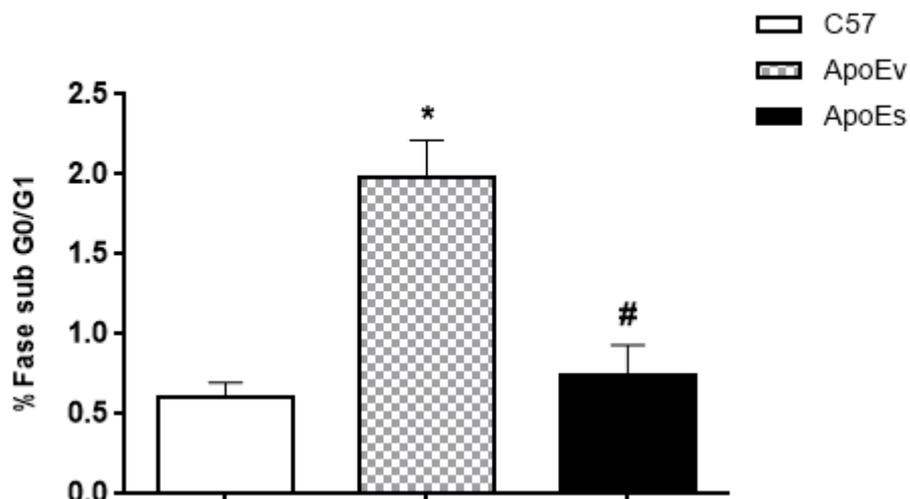


Gráfico 6 – Porcentagem de células na fase sub G0/G1 do ciclo celular. C57 (n=9), ApoEv (n=8), ApoEs (n=8). Valores expressos como média±EPM. *p<0,05 vs C57. #p<0,05 vs ApoEv.

5.3.2 Nível de EROS

Os níveis de ânions superóxido, detectados pela intensidade de fluorescência do DHE em citometria de fluxo, mostraram-se reduzidos no grupo ApoEs quando comparados com os valores do grupo ApoEv (ApoEs: $6,6 \pm 0,30^*$ vs. ApoEv: $8,4 \pm 0,67 \times 10^2$ u.a). No entanto não houve diferença estatística entre os grupos C57 e ApoEs (C57: $6,1 \pm 0,29$ vs. ApoEs: $6,6 \pm 0,30 \times 10^2$ u.a), como mostrado na Gráfico 7.

Os níveis de peróxido de hidrogênio, os quais foram mensurados pela intensidade de fluorescência do fluorocromo DCF, também estavam reduzidos no grupo ApoEs comparado ao grupo ApoEv (ApoEs: $3,3 \pm 0,30$ vs. ApoEv: $4,5 \pm 0,41 \times 10^3$ u.a). O teste estatístico não detectou diferença entre os grupos C57 e ApoEs (C57: $2,5 \pm 0,21$ vs. ApoEs: $3,3 \pm 0,30 \times 10^3$ u.a. Gráfico 8).

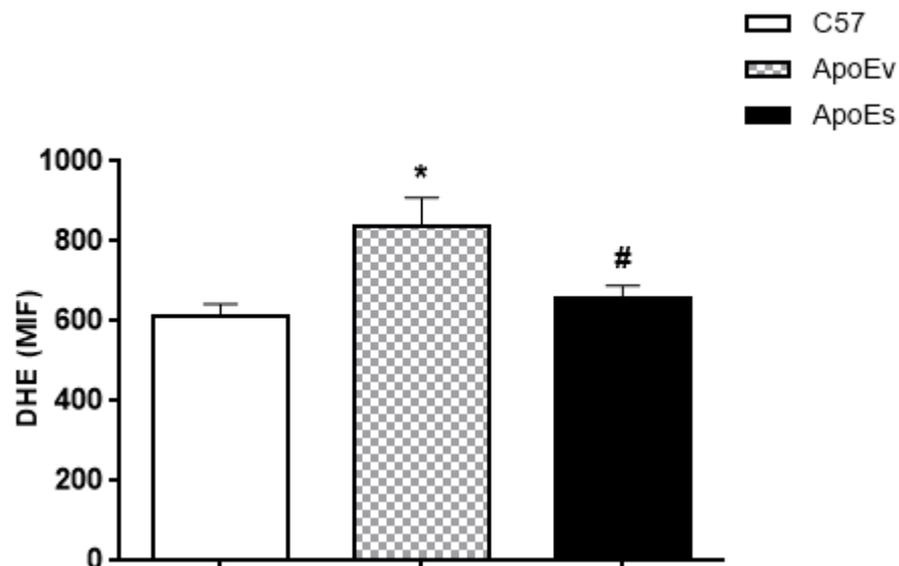


Gráfico 7 – Mediana da intensidade de fluorescência do DHE. O gráfico demonstra os níveis de ânions superóxido nos grupos C57, ApoEv e ApoEs, respectivamente. C57 (n=11), ApoEv (n=6), ApoEv (n=6). Valores expressos como média±EPM. *p<0,05 vs C57. #p<0,05 vs ApoEv.

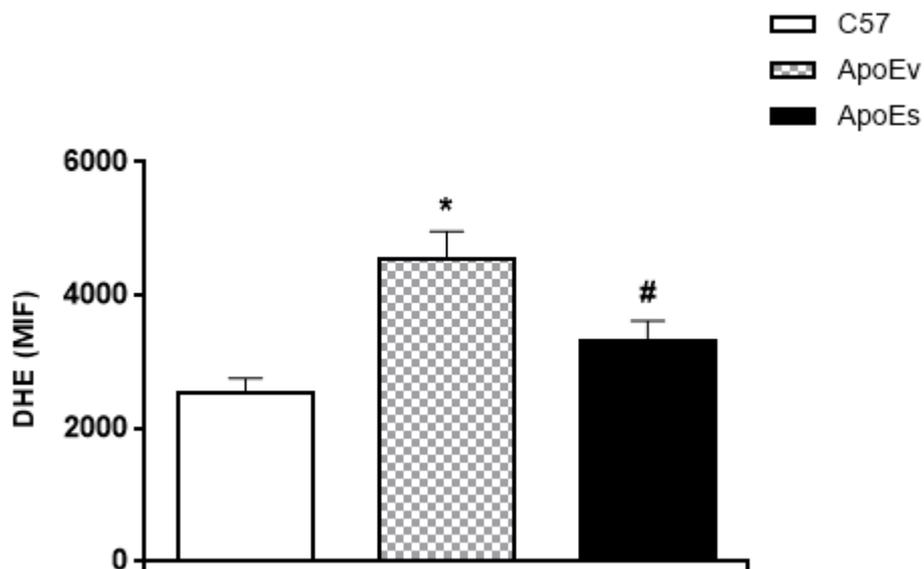


Gráfico 8 - Mediana da intensidade de fluorescência para DCF. O gráfico demonstra os níveis de peróxido de hidrogênio nos grupos C57, ApoEv e ApoEs, respectivamente. C57 (n=11), ApoEv (n=6), ApoEv (n=6). Valores expressos como média±EPM. *p<0,05 vs C57. #p<0,05 vs ApoEv.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foi demonstrado que o tratamento com Sildenafil é capaz de reduzir, mesmo sem qualquer modificação no nível de colesterol plasmático total, o nível de EROS em células de baço de camundongos ApoE^{-/-}. Além disso, também houve redução da porcentagem de DNA fragmentado e de células na fase G0/G1 do ciclo celular (fase de quiescência).

Os resultados de colesterol plasmático total, aumentados aproximadamente cinco vezes na linhagem ApoE^{-/-}, corroboram com a ausência da expressão de apolipoproteína E, uma vez que, sua função é reduzir o nível de colesterol circulante via receptor de LDL no fígado (Anoop *et al*, 2010).

Outra informação que pode ser extraída desses resultados, é que o tratamento com Sildenafil na dose de 40mg/Kg/dia durante três semanas, não influencia no nível de colesterol plasmático total, tal como observado em outros trabalhos que avaliaram os efeitos do Sildenafil em animais Knockout para a apolipoproteína E (Dussault *et al*, 2009; Blarini *et al*, 2013; Rodrigues *et al*, 2013). Este resultado demonstra que a ação do Sildenafil sobre o estresse oxidativo, na dose e tempo de tratamento usado, não envolve alteração do perfil lipídico em animais ApoE^{-/-}, sugerindo um mecanismo de ação independente da redução do colesterol.

Foi possível notar aumento do estresse oxidativo nos animais do grupo ApoE^{-/-}, tanto para o nível de ânions superóxido quanto para o de peróxido de hidrogênio.

Em situações fisiológicas, várias vias produzem espécies reativas de oxigênio, dentre elas a mitocôndria, NADPH oxidase, Xantina oxidase, Cicloxigenase e Lipoxigenase. Entretanto, a produção dessas moléculas é contrabalanceada por enzimas antioxidantes, as quais incluem a superóxido dismutase e peroxidase (Meyrelles *et al*, 2011), o que ocorre de maneira ineficiente quando as vias produtoras de espécies reativas de oxigênio são exacerbadas (Sies, 1997), tal como ocorre na aterosclerose (Bennett, 2001).

Como comentado, o nível aumentado de LDL circulante nos animais ApoE^{-/-}, devido a diminuição da recaptação de LDL via receptor de LDL no fígado, leva à sua oxidação na parede de vasos sanguíneos, que resulta na translocação das subunidades p47 e p67 da NADPH oxidase para a membrana, o que aumenta sua atividade e, conseqüentemente, produção de ânions superóxido (Meyer e Schmitt, 2000) e peróxido de hidrogênio através da superóxido dismutase (Gómez *et al*, 2015). Esse é só o início do processo, uma vez que, o aumento da produção de ânions superóxido e peróxido de hidrogênio, podem levar à expressão de moléculas de adesão através da ativação do fator nuclear kB, recrutando leucócitos que colaboram com o estresse oxidativo (Luft, 2001).

O recrutamento de leucócitos, e a proliferação dos mesmos na parede dos vasos sanguíneos, dão início ao processo inflamatório (Libby, Ridker e Maseri, 2002), provavelmente responsável pelo aumento das espécies reativas de oxigênio no sangue (Rodrigues *et al*, 2013) e em vários órgãos como medula óssea (Tonini *et al*, 2013), rins (Ghosh, 2015), fígado (Rodrigues *et al*, 2013) e baço (Potteaux, 2015).

Neste trabalho foi demonstrado que o tratamento com Sildenafil foi capaz de reduzir os níveis de ânions superóxido e peróxido de hidrogênio a níveis em que, estatisticamente, não havia diferença com o grupo controle. A razão para isso pode ser devida, como demonstrado por Balarini *et al* em 2013, à redução da atividade da NADPH oxidase provocada pelo Sildenafil.

É possível que o tratamento com Sildenafil esteja reduzindo o estresse oxidativo no baço tanto por via sistêmica, ao agir nas células de vasos sanguíneos, dessa forma inibindo o desenvolvimento do processo inflamatório, quanto diretamente nas células do órgão.

O Sildenafil é comumente usado para o tratamento da disfunção erétil. Seu mecanismo de ação consiste na inibição seletiva da fosfodiesterase 5, a qual age degradando a monofosfato de guanosina cíclica (GMPc). O GMPc regula diversas respostas fisiológicas, como tônus vascular, secreção intestinal e fototransdução retiniana e exerce seus efeitos por meio da ativação de diferentes efetores, tais como proteínas quinase (PK) e canais iônicos (De

Melo, 2005). No músculo liso, diversos processos metabólicos e mecânicos são regulados por GMPc, sendo o tônus contrátil do músculo o melhor exemplo, onde atua promovendo seu relaxamento (Glossmann, 1999).

Recentemente tem sido investigadas vias de atuação do Sildenafil alternativas a via clássica, como proposto por Leal *et al* em 2015, que demonstrou restauração da hiperresponsividade a contração da aorta, devido a diminuição da produção de tromboxano e espécies reativas de oxigênio em animais hipercolesterolêmicos tratados com Sildenafil. Portanto, é possível que a redução mostrada neste trabalho das espécies reativas de oxigênio, seja devido a uma ação antioxidante do Sildenafil.

A importância do estresse oxidativo na doença aterosclerótica cardiovascular é destacada pela observação de que na presença de fatores de risco para a doença arterial coronariana há aumento do número de marcadores de estresse oxidativo (ANTONIADES *et al.*, 2003). Hidroperóxidos lipídicos do soro (LOOH) são gerados a partir de ácidos graxos poliinsaturados e representam principalmente produtos da peroxidação de ácidos graxos. Malondialdeído (MDA) também é um produto final de peroxidação lipídica. Ambos, LOOH e MDA, têm sido encontrados em número elevado na presença de fatores de risco cardiovascular (Sanderson *et al.*, 1995).

Também foi demonstrado através da intensidade de fluorescência do Iodeto de Propídeo (PI), que os animais hipercolesterolêmicos apresentavam nível aumentado de fragmentação do DNA comparado aos animais controle. Isso provavelmente se deve ao aumento das espécies reativas de oxigênio, as quais possuem a capacidade de causar mais de 20 diferentes tipos de dano ao DNA (Slupphaug, 2003), bem como a peroxidação de lipídeos (Stocker, 2004) e proteínas (Matés, 1999).

Sabe-se que aproximadamente 2×10^4 danos no DNA ocorrem em cada célula por dia, a maioria via espécies reativas de oxigênio (ERO). Nas doenças cardiovasculares a produção de radicais livres aumenta mais ainda (Andreassi, 2003; Mahmoudi *et al.*, 2006).

Ballinger demonstrou o aumento da oxidação de DNA mitocondrial em aortas de camundongos ApoE^{-/-} de 8 meses de idade comparando-os com controle C57. Ainda no mesmo estudo, verificaram que o dano oxidativo ao DNA mitocondrial já estava presente e mais elevado do que seu controle na idade de 3 semanas (Ballinger, 2002).

Em 2001, Botto e colaboradores publicaram um estudo que correlacionou a presença de fragmentos de DNA nos linfócitos de sangue periférico de pacientes com doença arterial coronariana utilizando o teste do micronúcleo (Botto et al., 2001).

Gackowski, em 2001, demonstrou maior fragmentação no DNA de linfócitos de pacientes ateroscleróticos, além de diminuição nos níveis de vitamina C (Gackowski et al., 2001).

A resposta ao dano no DNA é a ativação de enzimas reparadoras, que cominam na fosforilação e ativação *checkpoints kinases*, tais como chk2 e hCDS1, ambas subseqüentemente fosforilam gene supressor tumoral p53, que expressa uma proteína capaz de interromper a divisão celular e levar a célula a apoptose (Bennett, 2001).

A apoptose é considerada uma resposta a estímulos fisiológicos que levam à morte e eliminação celular sem ativação de vias inflamatórias ou alteração do microambiente celular (Orrenius, 2003), entretanto, o processo inflamatório que ocorre na aterosclerose pode levar a apoptose principalmente pelo estresse oxidativo (Bennett, 2001). Dessa forma, podemos inferir que os resultados a respeito do nível aumentado de dano ao DNA observado nos animais ApoE^{-/-}, também provocam aumento do número de células em estado apoptótico, como mostrado em células da linhagem hematopoiéticas de medula óssea por Porto *et al* em 2015.

Já nos animais do grupo ApoE^s, o tratamento com Sildenafil foi capaz de exercer um efeito protetor ao DNA, provavelmente através do efeito antioxidante mencionado anteriormente. Dessa forma, a redução que o Sildenafil exerce sobre os níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio, possivelmente ao reduzir o dano ao DNA, permite que mecanismos

reparadores como a excisão de bases, que consiste na remoção de lesões simples por meio da ação da glicosilase, e a excisão de nucleotídeo, um processo mais complexo envolvendo a remoção de um oligonucleotídeo contendo a lesão, restaurem a funcionalidade celular e conservem o conteúdo de células no órgão (Cooke, 2003).

Como era esperado, o resultado que demonstra a porcentagem de células nas fases G₀/G₁ do ciclo celular, que representa a fase em que as células estão em estado quiescente, estava aumentada nos animais hipercolesterolêmicos. Esse resultado corrobora com o mencionado anteriormente sobre o nível de fragmentação do DNA.

A genotoxicidade provocada pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio causa lesão ao DNA que por sua vez causa instabilidade genômica que pode interromper o ciclo celular (Marnett, 2000), dessa forma aumentando o número de células na fase quiescente, tal como demonstraram os resultados de Campagnaro *et al* (2013) em modelos animais de hipertensão renovascular, Porto *et al* (2015) sobre os efeitos da idade em camundongos *mus musculus* e Tonini *et al* (2013) em modelos hipercolesterolêmicos. Nesse aspecto, os resultados presentes nesse trabalho demonstraram que o tratamento com Sildenafil foi capaz, através da redução da lesão ao DNA, induzir a entrada no ciclo celular dos animais ApoE^{-/-}.

Para confirmar a conclusão obtida através dos resultados da porcentagem de células na fase quiescente, foi realizada a análise da porcentagem de células nas fases S/G₂/M do ciclo celular. A fase S representa a fase em que as células estão replicando o DNA, esta fase é crucial para a divisão celular e é regulada por vários fatores, podendo a célula voltar ao estado quiescente se for identificado alguma falha genética, sendo, portanto, uma etapa limitante para a divisão propriamente dita da célula (Sorensen, 2003).

A fase subsequente a fase S é a G₂/M, nesse ponto a célula está com todo seu material genético replicado e preparado para a divisão. A fase M é separada em prófase, metáfase, anáfase e telófase. Neste ponto ainda há auto-regulação, principalmente através do processo promotor anáfase/ciclosomo

(APC/C), que, quando ativado, leva a uma cascata protéica que resulta na separação das cromátides irmãs, dessa forma ativando a saída da mitose (Boer, 2015).

Como já foi mencionado, um dos fatores que colaboram para a interrupção da divisão celular são as espécies reativas de oxigênio. De maneira que, o raciocínio se fecha ao demonstrar que houve redução na porcentagem de células nas fases S/G2/M.

O tratamento com Sildenafil foi capaz de restaurar a porcentagem de células que entravam na fase de divisão celular, tendo diferença estatisticamente insignificante quando comparadas aos valores do grupo controle.

Outros pontos que corroboraram com nossos dados, foram as análises do conteúdo de célula quantificado em câmara de Neubauer e o peso do baço. Como foi dito, os animais ApoE^{-/-} apresentaram diminuição do número de célula na fase de divisão celular, dessa forma foi também constatada redução do conteúdo de células em câmara de Neubauer, bem como atrofia do baço. Nos animais que receberam tratamento com Sildenafil, foi possível observar aumento do conteúdo de células em câmara de Neubauer e diminuição da atrofia do baço. Isso nos leva a crer que realmente houve proliferação celular nos animais ApoEs. Entretanto, houve diferença também desses parâmetros quando se comparava os animais controle com os ApoEs. Nesse caso, podemos concluir que houve proliferação celular, mas o tempo de tratamento, ou a concentração de Sildenafil, apesar de promissor, não foi suficiente para restaurar os níveis normais.

De forma a sumarizar todos os achados, os animais ApoE^{-/-} apresentam aumento do colesterol plasmático, sobretudo carregado em forma de LDL, devido a diminuição da recaptação de IDL no fígado. O aumento de LDL circulante se liga a receptores em vasos sanguíneos e sofre oxidação. Dessa forma ativa vias intracelulares que aumentam a atividade da NADPH oxidase. A NADPH oxidase, sendo uma das maiores produtoras de espécies reativas de oxigênio em situações patológicas, leva ao aumento da fragmentação do DNA. O alto nível de lesão ao DNA se sobrepõe aos efeitos reparadores, fazendo

com que a célula interrompa o ciclo celular e entre em apoptose. O nível aumentado de apoptose, sem proliferação celular, causa atrofia das células no baço de camundongos ApoE^{-/-}. Entretanto os efeitos nocivos provocados ao DNA pelas espécies reativas de oxigênio podem ser revertidos através do uso de Sildenafil, o qual, provavelmente, possui efeitos antioxidantes e restauradores da função vascular, suprimindo os sinais pró-inflamatórios que levam ao dano de vários órgãos, tal como foi demonstrado no baço.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Através do presente estudo é possível concluir que o tratamento com Sildenafil na dose de 40mg/Kg/d durante três semanas foi capaz, em animais ApoE^{-/-} de reduzir o nível de espécies reativas de oxigênio, restabelecendo a função celular através da diminuição dos danos ao DNA, bem como a capacidade das células entrarem no ciclo celular, mas sem alterar o perfil lipídico dos animais. O retorno da função celular normal pôde ser evidenciado através do aumento do conteúdo de células isoladas e peso do baço.

Referências

8 REFERÊNCIAS

ABRAMS, D.; SCHULZE-NEICK, I.; MAGEE, A. G. Sildenafil as a selective pulmonary vasodilator in childhood primary pulmonary hypertension. **HEART**. 2000, 84(4):1-2.

ANDREASSI, MG. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. **Mutat Res**. 2003, 543(1):67-86.

ANOOP, MA. et al. Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular and coronary heart diseases. **Indian J Med Res**. 2010, 132:363-378.

ANTONIADES C, TOUSOULIS D, TENTOLOURIS C, et al. Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis. From basic research to clinical practice. **Herz**. 2003, 28 (7): 628-38.

ASAI, K. Effects of splenectomy on serum lipids and experimental atherosclerosis. **Angiology**. 1988, 39 (6):497-504.

ASHOK BT, AHMAD J, QADRI A, et al. Anti-ROS-DNA monoclonal antibody as molecular probe for oxidative DNA damage. **Biochem Mol Biol Int**. 1997, 43 (6):1219-29.

Aversa A, Vitale C, Volterrani M, Frabbrit A, Spera G, Fini M, Rosano GMC. Chronic administration of Sildenafil improves markers of endothelial function in men with Type 2 diabetes. **Diabetic medicine**. 2008;25 (1):37–44.

BALLINGER SW, PATTERSON C, KNIGHT-LOZANO CA, et al. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. **Circulation**. 2002, 106 (5):544-9.

BASSON, M. Cardiovascular Disease. **Nature Insight**. 2008, 7181 (451):1-9

BENNETT, MR. Reactive oxygen species and death: oxidative DNA damage in atherosclerosis. **American Heart Association**. 2001, 88:648-650

BALARINI, CM, et al. Sildenafil restores endothelial function in the apoilipoprotein E knockout mouse. **Journal of Translational Medicine**. 2013, 11 (3):1-8.

BOER, HR.; LLOBET, SG.; van VUGT, MATM. Controlling the response to DNA damage by the APC/C-Cdh1. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 2015, 1007:1-12.

BOTTO N, RIZZA A, COLOMBO MG. et al. Evidence for DNA damage in 146 patients with coronary artery disease. *Mutat Res*. 2001, 493: 23–30.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. **Informações de Saúde**. Brasília: [s.n.], 2011. Disponível em <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/niuf.def>>. Acesso em: 28 dez. 2011.

CALIGIURI, G. et al. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 6, Mar 2002.

BOTTO N, RIZZA A, COLOMBO MG. et al. Evidence for DNA damage in 146 patients with coronary artery disease. *Mutat Res*. 2001, 493: 23–30.

COOKE, MS.; EVANS, MD.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, AJ. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. **The FASEB Journal**. 2003, 17:1195-1214.

De Melo SESFC. Efeitos cardiovasculares do citrato de sildenafil na miocardiopatia hipertensiva induzida pela inibição da síntese de óxido nítrico em ratos. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2005. 133 p. Tese de Doutorado.

Dussault S, Maingrette F, Ménard C, Michaud SE, Haddad P, Groleau J, Turgeon J, Perez G, Rivard A. Sildenafil increases endothelial progenitor cell function and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. **Hypertension**. 2009;54 (5):1043–1049.

GACKOWSKI D, KRUSZEWSKI M, JAWIEN A, et al. Further evidence that 152 oxidative stress may be a risk factor responsible for the development of atherosclerosis. **Free Radic Biol Med.** 2001, 15;31 (4):542-7.

GHOSH, S. S. et al. High Fat High Cholesterol Diet (Western Diet) Aggravates Atherosclerosis, Hyperglycemia and Renal Failure in Nephrectomized LDL Receptor Knockout Mice: Role of Intestine Derived Lipopolysaccharide. **Plos One.** 2015, 10 (1).

GLOSSMANN, H.; PETRISCHOR, G.; BARTSCH, G. Molecular mechanisms of the effects of sildenafil (VIAGRA). **Experimental Gerontology.** 1999, 34:305-318.

GÓMEZ-M, MA. et al. Serum superoxide dismutase is associated with vascular structure and function in hypertensive and diabetic patients. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** 2015, 2016:1-8.

Halcox JPJ, Nour KRA, Zalos G, Mincemoyer R, Waclawiw MA, Rivera CE, Willie G, Ellahham S, Quyyumi AA. The effect of sildenafil on human vascular function, platelet activation, and myocardial ischemia. **Journal of the American College of Cardiology.** 2002;40 (7):1232–1240.

LEAL, M. A. et al. Mechanisms of enhanced vasoconstriction in the mouse model of atherosclerosis: the beneficial effects of sildenafil. **Current Pharmaceutical Biotechnology.** 2015, 16:517-530.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002, 420:868-874.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M. e HANSSON, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, p. 317-325, May 2011. LOFT S, POULSEN HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. **J Mol Med**. 1996,74 (6):297-312.

LUFT, FC. Mechanisms and cardiovascular damage in hypertension. **American Heart Association**. 2001, 37:594-598.

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**. 2000, 407:233-241.

MAHMOUDI M, MERCER J, BENNETT M. DNA damage and repair in atherosclerosis. **Cardiovasc Res**. 2006, 71 (2):259-68.

MALTA, D. C.; DE MORAIS NETO, O. L.; DA SILVA JUNIOR, J. B. Apresentação do plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, 2011 a 2022. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. 2011, 20 (4).

MARNETTE, LJ. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**. 2000, 21 (3):361-370.

Matés JM, Pérez-Gómez C, Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin Biochem**. 1999; 32 (8):595-603.

MEBIUS, RE.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature**. 2005, 5:606-616.

MEYER, JW.; SCHMITT, ME. A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. **Federation of European Biochemical Societies**. 2000, 472:1-4.

MEYRELLES, S. S. M. et al. Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. **Lipids Health Dis**. 2011, 211 (10):1-18

Milani E, Nikfar S, Khorasani R, Zamani MJ, Abdollahi M. Reduction of diabetes-induced oxidative stress by phosphodiesterase inhibitors in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 2005;140 (2):251–255.

MONEGO, E. T.; JARDIM, P. C. B. V. Determinantes de Risco para Doenças Cardiovasculares em Escolares. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 2006, 87(1).

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2003; 4:552-565.

PARZIANELLO, L. **Polimorfismo da apolipoproteína C-III (APOC- III) e níveis de triacilgliceróis em japoneses residentes no sul do Brasil**. 2007. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências biológicas - Bioquímica) – Programa de pós-graduação em Ciências biológicas - Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2007.

Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in

embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 1992;89(10):4471–4475.

Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell.** 1992;71 (2):343–353.

PORTO, ML. et al. Reactive oxygen species contribute to dysfunction of bone marrow hematopoietic stem cells in aged C57Bl/6 J mice. **Journal of Biomedical Science.** 2015, 22:1-13.

POTTEAUX, S.; OUFELLA, HA.; MALLAT, Z. Role of splenic monocytes in atherosclerosis. 2015, 26:457-463.

Raja SG, Nayak SH. Sildenafil: emerging cardiovascular indications. **The Annals of Thoracic Surgery.** 2004;78 (4):1496–1506.

ROMALDINI, C. C. et al. Fatores de risco para aterosclerose em crianças e adolescentes com história familiar de doença arterial coronariana prematura. **Jornal de Pediatria.** 2004, 80(2).

ROBINETTE, CD.; FRAUMENI JUNIOR, JF. Splenectomy and subsequent mortality in veterans of the 1939-45 war. *The Lancet.* 1977, 8029 (310):127-129.

RODRIGUES, BP. et al. Sildenafil ameliorates biomarkers of genotoxicity in an experimental model of spontaneous atherosclerosis. **Lipids in Health and Disease**. 2013, 12 (1):128-136.

ROMALDINI, CC. et al. Risk factors for atherosclerosis in children and adolescents with family history of premature coronary artery disease. **J Pediatr**. 2004, 80 (2):135-40.

SANDERSON KJ, VAN RIJ AM, WADE CR, et al. Lipid peroxidation of circulating low density lipoproteins with age, smoking and in peripheral vascular disease. **Atherosclerosis**. 1995, 118 (1):45-51.

CRARY, S. E.; BUCHANAN, G. R. Vascular complications after splenectomy for hematologic disorders. **BLOOD**, 2009, 114 (14):2861-2868

Shukla N, Jones R, Persad R, Angelini GD, Jeremy JY. Effect of sildenafil citrate and a nitric oxide donating sildenafil derivative, NCX 911, on cavernosal relaxation and superoxide formation in hypercholesterolaemic rabbits. **European Journal of Pharmacology**. 2005;517 (3):224–231.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**. 1997, 82 (2): 291-5.

SLUPPHAUG G, KAVLI B, KROKAN HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutat Res**. 2003, 531 (1-2):231-51.

SORENSEN, CS. et al. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. **Elsevier Inc.** 2013, 3 (3):247-258.

STOCKER, R. e KEANEY, J.F. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. **Physiol Rev.** 2004, 84:1381-1478.

TONINI, CL. et al. Effects of aging and hypercholesterolemia on oxidative stress and DNA damage in bone marrow mononuclear cells in apolipoprotein E-deficient mice. **International Journal of Molecular Sciences.** 2013, 14:3325-3342.

WHO. World Health Organization. **Global Atlas on Cardiovascular Disease - Prevention and Control.** Geneva: [s.n.], 2011. Disponível em <http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/en/>.

Acesso em: 03 jan. 2012.