

THAÍS FRANCHINI TORNATORE

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM DMA
6,7-Dimetóxi-4-N-(3'-N',N'-dimetil)fenilaminoquinazolina
NA ATEROSCLEROSE EM CAMUNDONGOS LDLr-/-**

CAMPINAS

2006

THAÍS FRANCHINI TORNATORE

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM DMA
6,7-Dimetóxi-4-N-(3'-N',N'-dimetil)fenilaminoquinazolina
NA ATEROSCLEROSE EM CAMUNDONGOS LDLr-/-**

*Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós Graduação da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Clínica Médica,
área de concentração Ciências Básicas*

ORIENTADOR: Otávio Rizzi Coelho

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

T632e

Tornatore, Thais Franchini
Efeitos do tratamento com DMA 6,7-Dimetóxi-4-N-(3'-N',N'-
dimetil) fenilaminoquinazolina NA aterosclerose em camundongos
LDLr-/- / Thais Franchini Tornatore. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Otávio Rizzi Coelho
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Aterosclerose. 2. Inflamação. 3. Colesterol. I. Coelho,
Otávio Rizzi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

UNIDADE	BC
CHAMADA:	T632e
TI/UNICAMP	
Ex.	
COMBO ECCL	74761
ROC	16.145-02
<input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
REÇO	11,00
ATA	24/10/07
IB-ID	414443

Título em ingles: Effects of treatment with DMA (6,7 dimethoxy-4-N(N,N-dimethyl) phenilaminazoline in atherosclerosis in LDLr-I-mice//

Keywords:

- Atherosclerosis
- Inflammation
- Cholesterol

Área de Concentração: Ciências básicas

Titulação: Mestrado em Clínica médica

Banca examinadora: Profº.Drº. Otávio Rizzi Coelho; Profº.Drº. Francisco Garcia Soriano; Profª Drª Silvana Aparecida Rocco.

Data da defesa: 26 - 06 - 2006

200757A-61

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. OTÁVIO RIZZI COELHO

Membros:

1. Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

2. Prof^ª. Dr^ª. Silvana A. Rocco

3. Prof. Dr. Otávio Rizzi Coelho

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/06/2006

Dedico minha tese à todas as pessoas que fazem parte de minha vida.

*Aos meus pais, Alcyr e Kathya,
aos meus irmãos, Andrey, Isabella e Gabriel,
ao meu filho Augusto,
aos meus avós Oswaldo e Nita,
aos meus tios Éder, Tania e Kleber e
ao sempre presente Rodrigo.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus colegas do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular, Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e ao Laboratório de Patologia que me auxiliaram na conclusão deste trabalho. Ao meu orientador Otávio Rizzi Coelho e ao meu tio Kleber Gomes Franchini pela confiança depositada. Aos meus pais, avós, irmãos e minha tia Tania pelo apoio. Às minhas amigas de hoje e sempre Cristiana Lopes e Taciana Lupoli pelas horas de lazer proporcionadas. À Carolina Clemente, Rosana Yuri e Thaís Theizen pois, além de companheiras de trabalho, sempre foram amigas fiéis e presentes. Ao Michel pela paciência. Ao Augusto, meu filho pelo amor que me dá a cada dia. Ao Rodrigo, que me mostrou a verdadeira razão de viver.

*A auto-satisfação é inimiga do estudo.
Se queremos realmente aprender alguma coisa,
devemos começar por libertar-nos disso.
Em relação a nós próprios devemos ser
'insaciáveis na aprendizagem' e
em relação aos outros,
'insaciáveis no ensino'.*

Mao Tse-Tung

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xxvii</i>
ABSTRACT	<i>xxxi</i>
INTRODUÇÃO	35
Interações Moleculares e celulares	39
Novas Terapias	47
Adenosina	48
Terapias para doenças inflamatórias pela adenosina	55
OBJETIVOS	57
MATERIAIS E MÉTODOS	61
Dieta	65
Protocolos	68
RESULTADOS	75
DISCUSSÃO	89
Mecanismo de Ação	95
CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

LISTA DE ABREVIATURAS

A₁	Receptor de adenosina 1
A_{2A}	Receptor de adenosina 2A
A_{2B}	Receptor de adenosina 2B
A₃	Receptor de adenosina A3
ADP	Adenosina Difosfato
AMP	Adenosina Monofosfato
ApoB	Apolipoproteína B
ApoE	Apolipoproteína E
ATP	Adenosina Trifosfato
cAMP	Adenosina Monofosfato cíclico
CS-1	Molécula de adesão da fibronectina
CT	Controle
dl	decilitro
DMA	6,7-Dimetóxi-4- <i>N</i> -(3'- <i>N</i> ', <i>N</i> '-dimetil)fenilaminoquinazolina
g	gramas
HC	Hipercolesterolêmica
HDL	High Density Lipoprotein
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular 1
IDL	intermediate density lipoprotein
IFN-γ	Interferon γ
IGF	Insulin Growth Factor
IL	Interleucina

Kg	kilograma
KCr(SO4)2	Dissulfato de Cromo e Potássio
KHCO3	Bicarbonato de Potássio
KO	Knockout
LDL	Low Density Lipoprotein
LO	lipoxygenase
LRP	low density lipoprotein receptor related protein
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
Mg	miligramas
MgSO4	Sulfato de Magnésio
mL	mililitro
mM	mili molar
µm	micrômetro
mmLDL	Minimally modified low density lipoprotein
MPO	Mieloperoxidase
NaHCO3	Bicarbonato de Sódio
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
p53	proteína 53
PCAM	platelet endothelial cell adhesion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PON	paraoxonase

RNA	Ácido Ribonucléico
ROS	reactive oxygen species
RPM	Rotações por minuto
SHR	Spontaneous Hipertensive Rat
Smase	Esfingomielinase
Spla2	Fosfolipase Secretória 2
TLR	Toll Like Receptor
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TG	Triglicérides
US28	Receptor de quimiocina do vírus
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VH	Veículo
VLA-4	integrina de monócitos e células T
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 Dieta hipercolesterolêmica.....	65

	<i>Pág.</i>
Figura 1 Artérias coronárias seccionadas transversalmente demonstrando as lâminas elásticas interna e externa da parede do vaso.....	39
Figura 2 Lesão inicial.....	41
Figura 3 Inflamação.....	43
Figura 4 Formação de células espumosas.....	44
Figura 5 Formação de placas fibrosas.....	45
Figura 6 Lesões complexas e trombose.....	47
Figura 7 Mecanismos envolvendo o metabolismo de adenosina.....	51
Figura 8 Composto quinazolínico DMA.....	63
Figura 09 Camundongo LDLr ^{-/-}	65
Figura 10 Base da aorta.....	71
Figura 11 Nível de colesterol plasmático em camundongos LDLr ^{-/-}	79
Figura 12 Lesão aterosclerótica em camundongo alimentado com dieta hipercolesterolêmica por 15 dias(12A) e 30 dias (12B).....	80
Figura 13 Área de lesões ateroscleróticas em camundongos LDLr ^{-/-} alimentados com dieta hipercolesterolêmica por 15 dias e 30 dias.....	80
Figura 14 Peso corporal do animais-prevenção.....	82
Figura 15 Peso corporal do animais-tratamento.....	82
Figura 16 Nível de triglicérides plasmático.....	83
Figura 17 Colesterol plasmático.....	84

Figura 18	Nível de HDL plasmático.....	84
Figura 19	Base da artéria aorta.....	86
Figura 20	Área de lesão no tratamento preventivo com DMA.....	87
Figura 21	Área de lesão aterosclerótica no tratamento com DMA de lesões ateroscleróticas pré-estabelecidas.....	87

RESUMO

A aterosclerose é caracterizada pelo recrutamento de monócitos e linfócitos para a parede do vaso. O efeito desencadeador deste processo é o acúmulo de partículas de LDL minimamente oxidadas, as quais estimulam as células endoteliais a produzirem moléculas pró-inflamatórias. Em adição à LDL oxidada, vários outros fatores modulam a inflamação tais como forças hemodinâmicas, hormônios sexuais e infecção. O objetivo deste estudo foi demonstrar o efeito anti-aterogênico do DMA, 6,7-Dimetoxi-4-*N*-(3'-*N*',*N*'-dimetil)fenilaminoquinazolina, em camundongos LDLr^{-/-}. Este efeito pode ser relacionado com a propriedade anti-inflamatória do composto estudado, por evidências de que o mesmo aumenta a biodisponibilidade de adenosina nos tecidos pela inibição da adenosina quinase.

Nossos resultados mostraram que o DMA administrado via oral, tanto no tratamento preventivo, quanto no tratamento de lesões pré estabelecidas, em camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hipercolesterolêmica (1,25% colesterol e 0,5% ácido cólico) diminuiu o tamanho das placas ateroscleróticas em 67% e 52%, respectivamente, em relação ao grupo controle que recebeu veículo. Esses dados foram obtidos através da planimetria das lesões ateroscleróticas na base da artéria aorta com a coloração Oil Red O específica para lipídios. A dieta hipercolesterolêmica (HC) por 15 e 30 dias reduziu o triglicéride sérico, medido pelo sistema de cromatografia líquida, em cerca de 50% sendo que o tratamento com DMA cancelou esta redução. A dieta HC por 15 e 30 dias aumentou o colesterol sérico, em cerca de 2 vezes nos camundongos LDLr^{-/-}. Camundongos tratados com DMA e dieta HC apresentaram níveis de colesterol total maiores do que o grupo alimentado somente com dieta HC. Dados revelaram que este aumento foi devido ao maior nível de HDL circulante nos camundongos tratados com o composto DMA. Todos os camundongos em tratamento, tanto com DMA quanto com veículo, apresentaram redução do peso corporal em relação ao grupo de camundongos alimentados com dieta hipercolesterolêmica (HC).

ABSTRACT

Atherosclerosis is characterized by the recruitment of monocytes and lymphocytes to the artery wall. A triggering event for this process is the accumulation of minimally oxidized LDL, which stimulates the overlying endothelial cells to produce a number of pro-inflammatory molecules, including hemodynamic forces, sex hormones and infection. We demonstrated that DMA, 6,7-Dimethoxy-4-*N*-(3'-*N*',*N*'-dimethyl)phenilaminoquinazoline, have an anti-atherogenic effect in mice LDLr^{-/-}. This effect could have a relationship with an anti-inflammatory property of adenosine in tissues, by the inhibition of adenosine kinase.

Results showed that DMA administrated by oral via, as prevent treatment, as pre-established lesions, in mice LDLr^{-/-} with hypercholesterolemic diet (1,25% cholesterol and 0,5% colic acid), decreases atherosclerotic lesions in 67% and 52% respectively in relation of the vehicle group. These data was obtained by planimetric study of atherosclerotic lesions in the base of aortic arthery with Oil Red O especific for lipids. The hypercholesterolemic diet by 15 and 30 days, decreases serum tryglicerides in 50%, in the other way, the treatment with DMA cancelled this reduction. At the same time, HC diet by 15 and 30 days increases total cholesterol serum, in 2 times in mice LDLr^{-/-}. Mice treatment with DMA and hypercholesterolemic diet showed serum cholesterol higher than the HC group (control). Results demonstrated that this increase have relationship with higher HDL serum level in mice treated with compound. All mice in treatment (DMA and Vehicle group) had the weight decreased.

INTRODUÇÃO

Aterosclerose é uma doença progressiva caracterizada por um acúmulo de lipídios e elementos fibrosos nas grandes artérias. As lesões iniciais da aterosclerose consistem em acúmulo de colesterol em macrófagos no endotélio, também conhecidas como células espumosas. Em humanos, podem ser encontradas na aorta na primeira década de vida, nas coronárias na segunda década e nas artérias cerebrais nas terceira e quarta décadas. Pela dinâmica diferencial do fluxo sanguíneo, existem locais “preferenciais” para a formação das lesões nas artérias. As estrias gordurosas não são significantes clinicamente, mas são precursoras da maioria das lesões avançadas caracterizadas pelo acúmulo de lipídios, debris necróticos e células musculares lisas (Lusis,2000). As lesões fibrosas típicas possuem uma capa fibrosa formada por células musculares lisas e matriz extracelular que envolvem um núcleo necrótico rico em lipídios. As placas podem se tornar extremamente complexas, com calcificação, ulceração na face luminal e hemorragia de pequenos vasos que crescem na camada média da parede vascular. Além disso, as lesões avançadas podem crescer o suficiente bloqueando o fluxo sanguíneo o que provoca uma oclusão aguda, um trombo, resultando em um infarto do miocárdio e derrame. Comumente, a trombose está associada com a ruptura ou erosão da lesão. Os eventos da aterosclerose vêm sendo elucidados por estudos em modelos experimentais de animais como coelhos, porcos, roedores e primatas (excluindo os seres humanos). Camundongos nocautes para a Apolipoproteína E ou para o receptor de LDL(Low Density Lipoprotein) desenvolvem lesões avançadas e são os modelos mais utilizados para estudos genéticos e fisiológicos (Tamminen et al,1999). A primeira mudança observada na parede arterial em animais alimentados com dieta hipercolesterolêmica é o acúmulo de partículas de lipoproteína e agregados na íntima em locais de predileção para a formação de lesão. Em dias ou semanas os monócitos aderem na superfície do endotélio. Os monócitos migram através da monocamada endotelial até a íntima, onde proliferam, se diferenciam em macrófagos e englobam lipoproteínas, formando as células espumosas (Ross,1993). Com o tempo, as células espumosas morrem, e passam a fazer parte do núcleo necrótico da lesão. Algumas estrias gordurosas acumulam células musculares lisas que migram da camada média do vaso. Com a secreção de elementos fibrosos pelas células musculares lisas, são desenvolvidas placas fibrosas que aumentam o tamanho da lesão. Inicialmente, as lesões crescem para a adventícia, depois começam a se expandir para o lúmen do vaso

(figura 1). As lesões continuam a crescer pela migração de células do sangue, acompanhadas de proliferação celular, produção de matriz extracelular e acúmulo de lipídios. A aterogênese é uma resposta à injúria causada pelas lipoproteínas e outros fatores de risco(Libby,1999).

Estudos epidemiológicos dos últimos 50 anos revelaram vários fatores de risco para aterosclerose. Estes podem ser agrupados em fatores genéticos, os quais tem grande influência. A abundância relativa de diferentes lipoproteínas no plasma parece ser o fator primário para a elevação de lipoproteínas aterogênicas que são um pré-requisito para a maioria das formas da doença. Com exceção do sexo, o nível de lipoproteína, cada um dos fatores de risco envolve vários genes. Esta complexidade pode ser elucidada por cruzamentos genéticos em animais; estudos em roedores têm revelado vários genes que contribuem para os níveis de lipoproteína, peso corpóreo e outros fatores de risco(Mehrabian et al,1998). A importância dos fatores genéticos e como se comportam nas doenças crônicas cardiovasculares vem sendo estudados em muitas famílias e gêmeos(Goldbourt e Neufeld,1988). Na população estudada, a hereditariedade da aterosclerose tem sido mostrada em vários estudos, frequentemente excedendo 50% em relação à população normal. Estudos em população migrante, por outro lado, mostra claramente que o ambiente influencia na incidência da doença nas populações. Assim, a forma mais comum de doença cardiovascular crônica é resultado da combinação de um ambiente que não é saudável, suscetibilidade genética e hábitos diários (Lusis et al,1998).

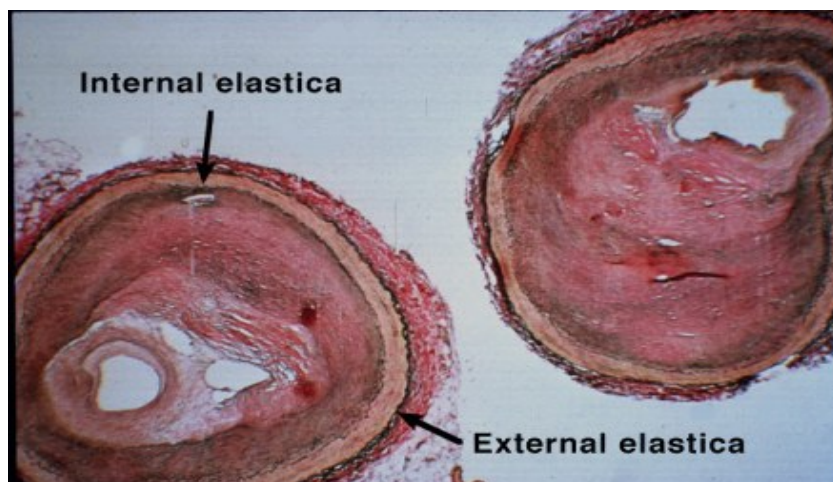


Figura 1- Artérias coronárias seccionadas transversalmente demonstrando as lâminas elásticas interna e externa da parede do vaso.

http://gyalogbodza.freeblog.hu/archives/2005_Jan_gyalogbodza.htm

Interações moleculares e celulares

Estudos patológicos têm revelado várias modificações no vaso durante a aterogênese e mostrou células inflamatórias derivadas do sangue, particularmente monócitos/macrófagos que possuem um papel crucial. Estudos de cultura de tecidos com células vasculares e monócitos/macrófagos sugeriram possíveis modos de iniciação de progressão da doença. Foram fornecidas evidências do principal papel do endotélio na mediação da inflamação, e sugeriram que o acúmulo de LDL oxidada na íntima contribuem para o recrutamento de monócitos e formação de células espumosas. Durante a década passada, o entendimento dos mecanismos moleculares da aterogênese foram melhor entendidos em estudos em animais transgênicos(Smithies e Maeda,1995).

Início da lesão

O endotélio é uma barreira permeável entre o sangue e os tecidos. Possui funções sensoriais e executoras, e pode gerar moléculas efetoras que regulam a trombose, inflamação, tônus vascular e remodelamento. Por exemplo, a remoção do endotélio resulta em uma migração e proliferação de células musculares lisas,

que regeneram o mesmo(Gimbrone,1999). Entre as forças físicas importantes que agem nas células endoteliais está a “shear stress”, a qual tem efeito na morfologia das mesmas (Figura 2). Células nas regiões tubulares das artérias, onde o sangue flui uniforme e laminar, são elipsóides na forma e alinhadas na direção do fluxo. Células nas regiões de curvatura, onde o fluxo é conturbado, possuem formas poligonais e nenhuma orientação particular. Essas áreas apresentam uma maior permeabilidade para as macromoléculas como as de LDL e são os principais locais para a formação de lesão(Gimbrone,1999). O primeiro evento da aterosclerose é o acúmulo de LDL na matriz subendotelial. O acúmulo é maior quando os níveis de LDL circulante aumentam, e o transporte e a retenção do LDL aumentam (figura 2).

Estudos epidemiológicos de populações migrantes com uma dieta rica em gordura, indicaram fortes associações entre o estilo de vida, e a dieta como fator mais importante. Dietas ricas em gordura e em colesterol usualmente são utilizadas em pesquisas em animais de laboratório(Assmann et al,1999). Associações com o fumo também foram observadas em vários estudos, sendo mostrados benefícios quando esse era cessado (Assmann et al,1999). Níveis baixos de antioxidantes não tiveram resultados conclusivos, entretanto antioxidantes solúveis em gordura protegeram animais de experimentação contra a aterosclerose (Steinberg e Witztum,1999). Estudos epidemiológicos de agentes infecciosos sugeriram evidências de associações com agentes infecciosos, como a *Chlamydia pneumoniae* e a formação da lesão em estudos animais (Hu et al,1999).

LDL se difunde passivamente entre as junções das células endoteliais, e sua retenção na parede do vaso parece envolver interações entre a apolipoproteína B, constituinte do LDL e a matriz de proteoglicanos (Boren et al,1998). Em adição ao LDL, outra apoB que faz parte de lipoproteínas, chamada de lipoproteínas e remanescentes, pode se acumular na íntima e promover aterosclerose. A partícula de LDL que contém um polipeptídeo adicional(conhecida como apolipoproteína), que se liga com a ApoB através de ponte de disulfeto, parece ter um efeito aterogênico adicional na fibrinólise e no crescimento de células musculares lisas (Grainger et al,1994). As partículas de LDL que são próprias do organismo são englobadas pelos macrófagos mas não rápidas o suficiente para formarem células espumosas, sendo assim proposto que estas são modificadas na parede do vaso (Goldstein et al,1979). Foi mostrado posteriormente que a molécula de LDL

que se infiltra sofre modificações como oxidação, lipólise, proteólise e agregação, e que essas modificações contribuem para a inflamação assim como para a formação de células espumosas. Uma das modificações mais importantes para a formação da lesão inicial é a oxidação de lipídios, que se transformam em moléculas de LDL minimamente oxidadas e que possuem uma atividade pró-inflamatória, não suficiente para serem reconhecidas por macrófagos. HDL é uma molécula protetora contra a aterosclerose. Um mecanismo importante deste efeito, é que as moléculas de HDL retiram o excesso de colesterol dos tecidos periféricos. Em adição, HDL protege inibindo a oxidação de lipoproteínas. As propriedades anti-oxidantes da HDL, é em parte pela paraoxonase, uma esterase carregada pela molécula de HDL que degrada fosfolipídios oxidados (Hegele,1999)

(Shih et al,2000).

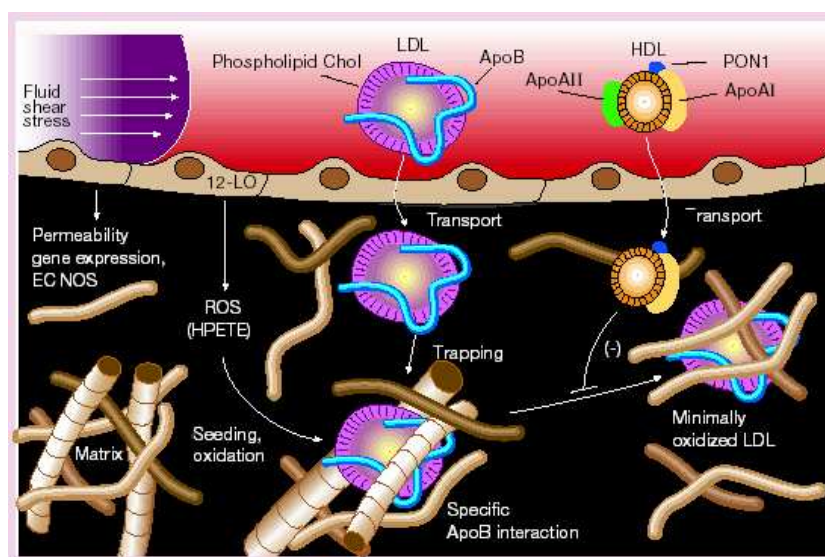


Figura 2- Lesão inicial. Os locais de predileção para a formação de lesões são determinados, em parte pelas forças hemodinâmicas que agem nas células endoteliais. Isto influencia a permeabilidade da barreira endotelial e a expressão dos genes das células endoteliais assim como os de óxido nítrico sintase(NOS). Um evento importante na iniciação da lesão é a retenção de LDL pela ApoB com os componentes da matriz. As moléculas de LDL sofrem oxidação pelas espécies reativas de oxigênio(ROS). A oxidação de LDL é inibida pelas moléculas de HDL, as quais contêm uma proteína antioxidante(PON1) (Lusis,2000).

Inflamação

A aterosclerose é caracterizada pelo recrutamento de monócitos e linfócitos para a parede do vaso. O efeito desencadeador deste processo é o acúmulo de partículas de LDL minimamente oxidadas, as quais estimulam as células endoteliais a produzirem moléculas pró-inflamatórias, incluindo moléculas de adesão e fatores de crescimento, como fator de estimulação de colônia de macrófagos (M-CSF) (Figura 3). A LDL oxidada pode também inibir a produção de óxido nítrico (NO), um mediador químico de várias propriedades anti-aterogênicas, incluindo vasorelaxamento. Em adição à LDL oxidada, vários outros fatores modulam a inflamação como forças hemodinâmicas, níveis de homocisteína, hormônios sexuais e infecção. Diabetes pode promover a inflamação, em parte, pela formação de produtos finais da glicosilação que interage com receptores endoteliais (Hofmann et al,1999). A entrada de tipos específicos de leucócitos pela parede do vaso é mediada por moléculas de adesão e fatores quimiotáticos. Depois das células endoteliais serem expostas ao LDL oxidado, elas se ligam aos monócitos. O primeiro passo para a adesão, é o “rolamento” dos leucócitos pela face endotelial, mediada por selectinas, que ligam os carboidratos ligantes das células endoteliais nos leucócitos. A adesão de monócitos e células T no endotélio podem ser mediadas pela integrina VLA-4 dessas células, que interagem com a VCAM-1 do endotélio e a CS-1 da fibronectina. *In vivo* e *in vitro* estudos têm sugerido que essas interações possuem um papel crucial na aterosclerose (Shih et al,1998). A citocina M-CSF estimula a proliferação e diferenciação de macrófagos, e influencia várias funções dos macrófagos como a expressão de receptores do tipo scavenger (Smith et al,1995).

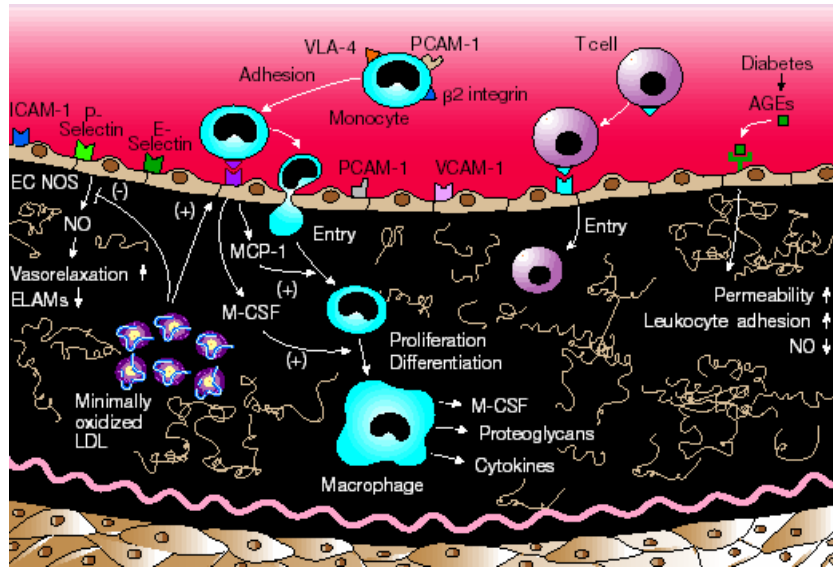


Figura 3- Partículas de LDL oxidadas estimulam as células endoteliais a produzirem moléculas de adesão, proteínas quimiotáticas e fatores de crescimento, resultante do recrutamento de monócitos para a parede do vaso, além de inibirem a produção de NO e a expressão de moléculas de adesão leucocitária.(Lusis,2000).

Formação de células espumosas

As moléculas de LDL antes de serem englobadas por macrófagos, se transformam em moléculas altamente oxidadas. Essa modificação envolve espécies reativas de oxigênio produzidas por células endoteliais e macrófagos e enzimas como a mieloperoxidase, esfingomielinase e fosfolipase secretória. O englobamento de partículas de LDL altamente oxidadas para a formação de células espumosas, é mediada por um grupo de receptores do tipo scavenger (SR-A e CD36)(Suzuki et al,1997) (Febbraio et al,2000). A expressão destes receptores é regulada por um fator de transcrição que pode ser ligado em ácidos graxos oxidados e citocinas como o TNF- α e IFN- γ Tontonoz et al,1998). Os macrófagos secretam apoE e isso promove um efluxo de colesterol para o HDL, inibindo a transformação de macrófagos em células espumosas (Figura 4).

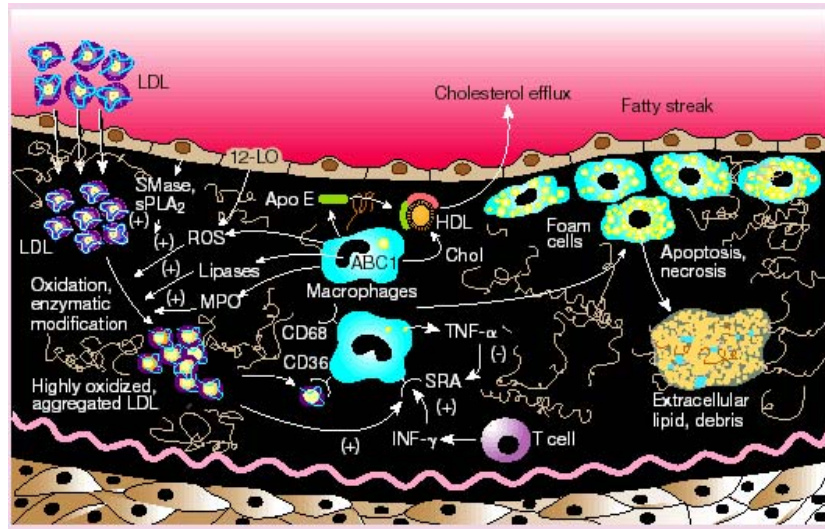


Figura 4- Formação de células espumosas. Agregados de LDL altamente oxidados são formados no vaso como resultado da ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e das enzimas esfingomielinase (Smase), fosfolipase secretória 2 (Spla2), outras lipases e da mieloperoxidase (MPO). O agregado de LDL oxidada é reconhecido por receptores do tipo scavenger dos macrófagos (SR-A, CD36, CD68). A expressão destes receptores são mediadas por citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- α e interferon, IFN- γ). As células espumosas secretam a apolipoproteína E (apoE), que facilita a remoção do colesterol em excesso. A morte das células espumosas formam uma massa juntamente com os lipídios extracelulares e outros debris (Lusis,2000).

Placas fibrosas

As placas fibrosas são caracterizadas pelo crescimento da massa de lipídios extracelulares, a maioria colesterol e éster, e pelo acúmulo de células musculares lisas e células derivadas da matriz extracelular (Figura 5). Citocinas e fatores de crescimento secretados por macrófagos e células T são importantes na migração e proliferação de células musculares lisas e produção de matriz extracelular (Schönbeck et al,2000). Vários fatores de risco parecem contribuir para o desenvolvimento de lesões fibrosas como elevados níveis de homocisteína, hipertensão e hormônios. Elevados níveis de homocisteína aparecem como uma injúria às células endoteliais e proliferação vascular de células musculares lisas (Gerhard e Duell,1999). Alguns dos efeitos mediados pelo aumento da pressão arterial na aterosclerose parece estar ligada à resposta renina-angiotensina.

A angiotensina II estimula diretamente o crescimento das células musculares lisas e produção da matriz extracelular. Estudos em ratos SHR indicam que o aumento da pressão arterial estimulam um fator de crescimento derivado de plaquetas, um potente mitogênico para células musculares lisas (Negoro et al,1995). O estrogênio possui muitas propriedades anti-aterogênicas, incluindo efeitos nos níveis de lipoproteínas no plasma e estimulação de produção de prostaciclina e NO (Nathan e Chaudhuri,1997). Infecção por citomegalovírus também parece estar ligado à aterosclerose e à restenose arterial (Gupta et al,1997). Estudos in vitro estabeleceram uma ligação entre a estimulação da migração das células musculares lisas e um receptor de quimiocina do vírus, US28 (Streblov et al,1999). A infecção por citomegalovírus está também associada com a inativação da proteína p53, que inibe o aumento de proliferação de células musculares lisas e acelera a aterosclerose (Guevara et al,1999).

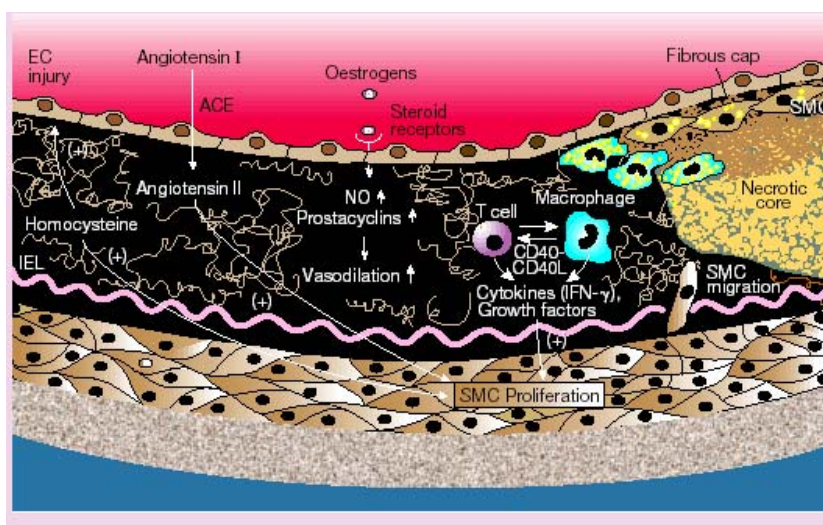


Figura 5- Formação de placas fibrosas. Vários fatores de risco, incluindo elevados níveis de Homocisteína e angiotensina II estimulam a migração e proliferação de células musculares lisas. O estrogênio exerce um papel benéfico nos níveis de lipoproteínas no plasma e estimula a produção de NO e prostaciclina pelas células endoteliais. A interação entre o CD40 e CD40L estimula a expressão de citocinas por linfócitos T e macrófagos como o IFN- γ que influencia na inflamação, crescimento de células musculares lisas e acúmulo de matriz. As células musculares lisas da íntima secretam matriz extracelular e aumentam a capa fibrosa (Lusis,2000).

Lesões avançadas e trombose

Estudos patológicos sugerem que o desenvolvimento do trombo mediado por eventos coronários agudos dependem principalmente da composição e instabilidade da placa. Placas instáveis geralmente possuem uma capa fibrosa fina e um alto número de células inflamatórias. A capa fibrosa é mantida ou não pela produção e degradação da matriz e pelos produtos das células inflamatórias. As células T produzem IFN- γ , que inibe a produção de matriz pelas células musculares lisas, e os macrófagos produzem várias proteases que degradam a matriz extracelular, incluindo a colagenase intersticial e gelatinases (Libby,1999). A ruptura frequentemente ocorre nas bordas das lesões, onde há um acúmulo de células espumosas, sugerindo que fatores que contribuem para a inflamação influenciam também na trombose (Figura 6). A incidência de infarto do miocárdio e derrame aumenta durante infecções agudas. A estabilidade das lesões ateroscleróticas também influenciam na calcificação e neovascularização, fatores comuns nas lesões avançadas. O crescimento de pequenos vasos na lesão podem contribuir para a entrada de células inflamatórias (Moulton e Folkman,1999). A trombogenicidade do núcleo necrótico parece depender da presença de um fator tecidual, uma proteína que inicia a cascata de coagulação. A produção do fator tecidual pelas células endoteliais e macrófagos é aumentada pela entrada de partículas de LDL oxidada, infecção ou a ligação do CD40 das células endoteliais no CD40L das células inflamatórias (Schonbeck et al,2000). A expressão de outras moléculas mediadoras da trombose, como o ativador de plasminogênio, parecem ser importantes.

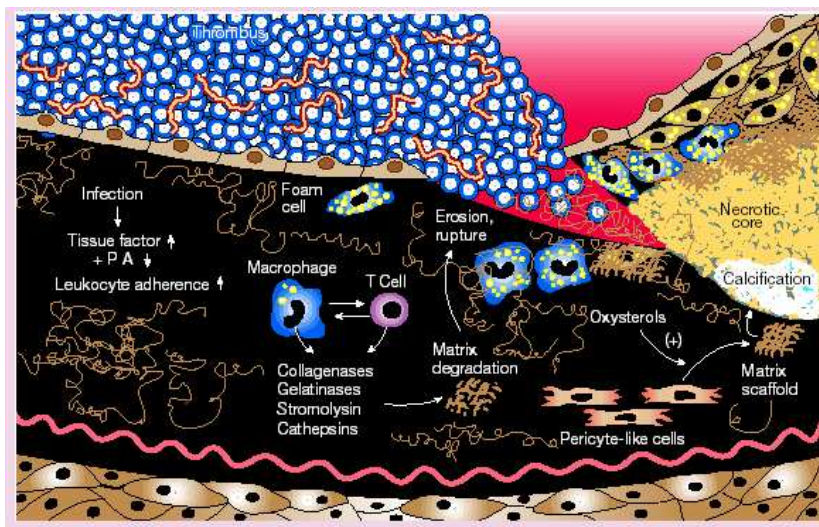


Figura 6- Placas instáveis com finas capas fibrosas são resultantes da degradação da matriz por várias proteinases como as colagenases, gelatinases e catepsinas e pela inibição de secreção de matriz. Vários fatores podem desestabilizar as placas e promover a trombose, como infecção que pode ter efeitos sistêmicos. A calcificação das lesões aparecem com a deposição de fosfato de cálcio. A formação de trombo, consiste na aderência de plaquetas e fibrina, usualmente acarretando a ruptura da placa (Lusis,2000).

Novas terapias

Drogas efetivas na diminuição do colesterol circulante e na pressão arterial vêm sendo desenvolvidas. Em particular, as estatinas, diminuem os níveis de lipoproteínas aterogênicas, os eventos clínicos e a mortalidade por aterosclerose (Assmann et al,1999). Entretanto, doenças cardíacas e infarto permanecem como as causas de morte mais comuns em países do oeste, e novos recursos, particularmente agentes que bloqueiem a doença a nível da parede do vaso ou aumentem o efeito anti-aterogênico do HDL estão sendo buscados. Durante a década passada, vários alvos promissores foram identificados. Por exemplo, a interrupção do sistema CD40-CD40L, poderia ter vários benefícios na estabilidade da placa (Schönbeck et al,2000). A identificação de como é o transporte de lipoproteínas, apresentou novas oportunidades para o tratamento de baixos níveis de HDL. No entanto, estudos preliminares em animais sugeriram que o aumento dos níveis de HDL não bloqueiam a formação da lesão aterosclerótica, mas age apenas na sua regressão

(Desumont et al,2000). Com o intuito de buscar uma droga que além de regredir a lesão aterosclerótica também a prevenisse, foi testado em nosso laboratório um composto inibidor de adenosina quinase (DMA).

Adenosina

A adenosina é um nucleosídeo purinérgico endógeno que formado extracelularmente, difunde na membrana celular circundando as células se ligando por estruturas específicas chamadas de receptores de adenosina (Ralevic e Burnstock,1998) (Fredholm et al, 2001). Existem quatro tipos de receptores de adenosina, os quais são membros de uma família de receptores acoplados à proteína G (Fredholm et al, 2001). Os genes para estes receptores foram designados de A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Embora a adenosina esteja presente no espaço extracelular em baixas concentrações, em condições de estresse estas concentrações aumentam. O papel da adenosina como uma molécula de sinalização extracelular foi visto primeiramente por Drury e Szent-Györgyi em 1929, que demonstrou que a adenosina extraída de músculo cardíaco era um potente agente inotrópico negativo e um vasodilatador coronário. Pela formação extracelular tardia de adenosina nos eventos de hipóxia e coração isquêmico, a hipótese proposta era de que a adenosina tinha uma função de proteção no coração contra as consequências metabólicas do evento, por diminuição da demanda metabólica do miocárdio e aumento do fluxo coronariano sanguíneo (Ralevic e Burnstock,1998). Posteriormente, evidência foi obtida por ações protetoras similares da adenosina em outras células e sistemas orgânicos, incluindo cérebro, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. Baseado nesta evidência, uma hipótese da ação da adenosina foi formulada por Newby em 1984, e o termo metabólito retaliatório foi usado para descrever a função protetora da adenosina. Esta hipótese afirma que a adenosina, lançada em resposta a um estímulo de injúria por estresse, media uma cadeia autorregulatória, cuja função é proteger os órgãos da injúria e do estresse. A adenosina exerce este papel protetor por dois diferentes mecanismos. Primeiramente, a adenosina diminui a demanda energética para o tecido, por um efeito inibitório direto da função do parênquima celular, exemplificado pelo efeito inotrópico negativo da adenosina no músculo cardíaco. Segundo, a adenosina protege indiretamente o tecido fornecendo um ambiente

melhor para o parênquima das células, como por exemplo o maior fornecimento de nutrientes na vasodilatação. Evidências mais recentes indicam que a adenosina ajuda a manter a integridade tecidual através de um caminho indireto: a modulação da função do sistema imune. Embora a resposta imune da injúria tecidual tenha um papel essencial na preservação da homeostase do tecido, a inflamação incontrolada ou a ativação imune podem aumentar o dano aos tecidos afetados. Isto ocorre com a liberação de adenosina seguida pelo reconhecimento dos receptores nas células imune, regulando a resposta do sistema imunológico. Estudos recentes *in vivo* e *in vitro*, confirmam o papel benéfico da adenosina como modulador do sistema imunológico. Primeiramente, a adenosina é lançada ao redor das células imunes em tecidos sujeitos a várias formas de estímulos de injúria, incluindo isquemia e inflamação. Depois, na maioria dos sistemas experimentais, a adenosina é um imunossupressor pela ocupação dos receptores de adenosina nos diversos tipos de células imunitárias. A remoção da sinalização da adenosina endógena exacerba a ativação do sistema imune e conseqüentemente agrava a disfunção tecidual seguida de um estímulo agudo à injúria (Hasko e Cronstein, 2004).

As ações fisiológicas da adenosina resultam quase que exclusivamente de sua ocupação nos receptores que se encontram na superfície das células e na ativação de caminhos intracelulares. Produção, captação celular e metabolismo determinam a biodisponibilidade de adenosina nos seus receptores. Estes processos são interdependentes e altamente regulados. Um bom exemplo desta interdependência é a ação de mecanismos metabólicos intracelulares purinérgicos, que resultam em um aumento das concentrações intracelulares de adenosina durante a hipóxia e isquemia tecidual. Nessas condições, o aumento da desfosforilação do ATP para adenosina pela enzima 5'-nucleotidase é paralela à supressão da atividade da adenosina kinase, a qual previne a refosforilação da adenosina (Fredholm et al,2001). Uma vez que a adenosina alcança altas concentrações dentro da célula, esta é transportada para o meio extracelular através de nucleosídeos transportadores especializados(Pastor-Anglada et al,2001). Outro e provavelmente o mecanismo predominante que contribui para o aumento extracelular dos níveis de adenosina durante o estresse metabólico é o lançamento de precursores de nucleotídeos de adenina(ATP, ADP e AMP) da célula seguida pelo catabolismo extracelular pela cascata de ectonucleotidasas, a qual inclui CD39 (nucleosídeo trifosfato desfosforilase-NTPD) e CD73

(5'-ectonucleotidase) (Figura 7). A biodisponibilidade de adenosina é limitada pelo catabolismo de inosina para adenosina deaminase, a qual mais tarde é degradada e transformada em um produto final do ácido úrico. Ainda não está bem claro quais tipos de células são os produtores mais importantes de adenosina extracelular. No entanto, as células endoteliais e os neutrófilos são constantemente citados por lançar altos níveis de adenosina em locais de estresse, inflamação e infecção (Cronstein,1994). Além disso, Sperlagh e colaboradores em 2000, recentemente documentaram que terminais nervosos são a maior fonte de adenosina extracelular quando o baço for sujeito à isquemia. O ADP lançado por plaquetas em locais que sofreram injúria também podem se desfosforilar para adenosina (Ralevic e Burnstock ,1998). É conhecido que em tecidos normais, a concentração de adenosina está abaixo de 1 mM sendo que em tecido inflamados ou isquêmicos sua concentração é de 100 mM. Por exemplo, um estudo recente mostrou que os níveis de adenosina sistêmica (plasma) alcançam de 4-10 mM em pacientes com sepsis, uma condição associada com isquemia e inflamação sendo que em pacientes saudáveis estes níveis eram de 1 mM (Martin et al,2000). Concentrações de 10-100 mM de adenosine foram encontradas no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (Sottofattori et al,2001). Em geral os níveis de adenosina de 1 mM têm uma pequena influência nos processos imunes, de isquemia e inflamação que representam condições nas quais os níveis de adenosina endógena se tornam altos o suficiente para exercer um papel imunomodulatório e imunossupressivo. Finalmente, é preciso dar ênfase que a sinalização da adenosina no sistema imune, se inicia pelos índices altos ou baixos dos metabólitos de adenosina. É sabido que os nucleotídeos de adenina têm efeitos imunorregulatórios que são mediados pelos P2-purinoreceptores (Di Virgilio et al,2001). Além disso, evidências recentes indicaram que a quebra da adenosina em inosina e ácido úrico pode influenciar em muitos aspectos à resposta imune inata (Hasko et al,2000) (Scott et al,2002). Pelos níveis de produtos purinérgicos refletirem no estado metabólico do tecido, foi proposto que estes produtos poderiam representar um sistema sensorial ideal para a manutenção do sistema imune com a informação essencial sobre a condição saudável do tecido.

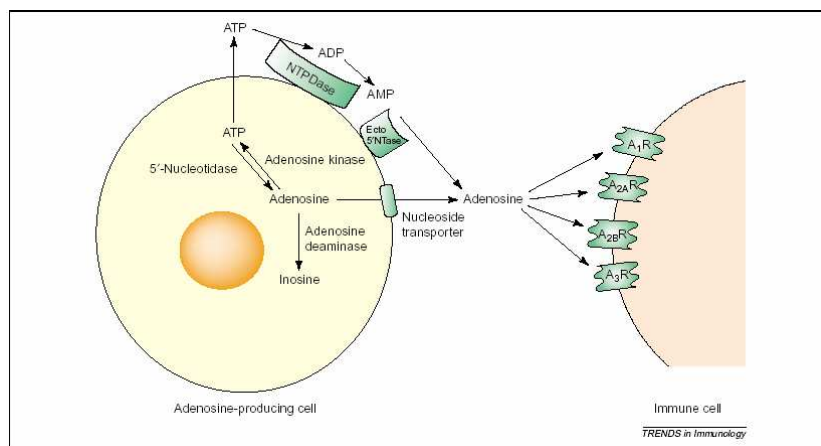


Figura 7- Mecanismos envolvendo o metabolismo de adenosina. A adenosina é formada do precursor ATP nos espaços extra e intracelular. A adenosina intracelular é exportada para o meio extracelular pelos transportadores de membrana dos nucleosídeos. A enzima adenosina quinase refosforila a adenosina, convertendo-a em AMP enquanto que a adenosina desaminase desamina a adenosina para inosina. A formação extracelular de adenosina é resultado de uma cascata enzimática que consiste em NTPDases e ecto-5'-nucleotidase. A adenosina extracelular se liga aos receptores de adenosina 1, 2a, 2b e 3, os quais são expressos na superfície das células imunes. <http://treimm.trends.com>

Tráfego de células imunes entre os compartimentos teciduais é regulado pelos receptores endoteliais de adenosina

Células endoteliais têm múltiplos papéis na inflamação e na imunidade inata. Além disso, os primeiros eventos da inflamação são mediados em sua grande parte pelas células endoteliais. Em resposta aos mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral α e interleucina 1, as células endoteliais expressam moléculas de adesão, as quais são responsáveis pelo recrutamento de leucócitos nos locais inflamados. As células endoteliais também sintetizam e lançam mediadores, como o fator de ativação plaquetária, interleucina 8 e interleucina 6, que possuem papel direto no processo inflamatório conduzindo o movimento dos leucócitos entre os compartimentos celulares. A expressão dos receptores de adenosina A_{2A} e A_{2B} em vários tipos de células endoteliais vasculares é bem documentado, enquanto que os receptores A_1 e A_3 são expressos em

células endoteliais baseados somente na demonstração de RNA mensageiro desses receptores (Montesinos et al,1997) (Feoktistov et al,2002) (Lennon et al,1998) (Eltzschig et al,2003). As células endoteliais têm sido reconhecidas como uma fonte significativa de adenosina pela sua capacidade de desfosforilar nucleotídeos de adenina para adenosina, e a interação entre neutrófilos e células endoteliais parece estar relacionada com este mecanismo (Lennon et al,1998) (Eltzschig et al,2003). Em outros estudos, a adenosina inibiu a secreção de IL-6 e IL-8 e a expressão de moléculas de adesão (E selectina e a VCAM-1) pela imuno estimulação de células endoteliais de veias umbilicais humanas provavelmente pelo mecanismo relacionado com os receptores A_{2A} (Bouma et al,1996). Outros estudos mais tarde indicaram que a adenosina sozinha estimulada pela IL-8 é lançada nas células microvasculares humanas, não nas células endoteliais da veia umbilical humana, um efeito resultado da ocupação dos receptores A_{2B} (Feoktistov et al,2002). Isto parece se dar pela ativação da fosfolipase C pelas proteínas Gq, preferencialmente do que a ativação do mecanismo das Gs-c AMP, responsável por aumentar a produção de IL-8 seguida de estimulação do receptor A_{2B} nas células microvasculares humanas (Feoktistov et al,2002). Deste modo, os receptores A_{2A} e A_{2B} regulam as funções inflamatórias das células endoteliais, embora sua importância relativa varie de acordo com o local das células endoteliais.

Neutrófilos: funções cruciais no efeito protetor da adenosina na injúria isquêmica e inflamação de tecidos

Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas nos locais de injúria e inflamação. Estas células do sistema imune inato, matam os microorganismos, eliminam os debris que restam depois da injúria e lança fatores responsáveis pelo recrutamento de outras células inflamatórias. Mas essas células que são cruciais para prevenção de disseminação de infecções, quando ativadas podem ser responsáveis por uma injúria significativa no tecido. Logo depois que os receptores de adenosina foram descritos, esforços foram feitos para determinar ou não a presença de neutrófilos e a modulação de seu comportamento. Em 1983, Cronstein e colaboradores publicaram um estudo demonstrando que a adenosina suprimia a geração estimulada de ânion super óxido, um efeito que ocorria nos receptores

das superfícies celulares. Depois, estudos estabeleceram que a adenosina, agindo nos receptores A_{2A} , inibiam a adesão de neutrófilos estimulados, e a morte de células endoteliais e outras células, atividade bactericida, apoptose, expressão e emissão de moléculas de adesão, secreção de citocinas, fatores de crescimento e síntese de leucotrieno B4 (Cronstein,1994) (Flamand et al,2000). Generalizando, os efeitos dos receptores A_{2A} são atribuídos à sua capacidade de sinalização aos mecanismos dependentes de cAMP. Embora alguns laboratórios tenham descrito que a influência dos receptores A_{2A} da adenosina nas funções dos neutrófilos seja mediada pelo cAMP (Sullivan et al,1999) (Thibault et al,2002), outros estudos reportaram que a ocupação do receptor de adenosina inibe a geração de ânion super óxido de neutrófilos por mecanismos independentes do cAMP, incluindo a ativação da fosfatase associada à membrana e à não sensibilização de receptores quimioatrativos (Cronstein,1994). Estudos recentes sugeriram que os neutrófilos podem atuar em mais de um tipo de receptor de adenosina (Rose et al,1988). Subsequentemente foi demonstrado que os neutrófilos que expressam receptores A_1 quando ocupados, aumentam a quimiotaxia dos mesmos e a fagocitose (Cronstein,1994). Mesmo assim, em geral, os efeitos anti-inflamatórios da adenosina agindo nos receptores A_{2A} são predominantes aos efeitos nos receptores A_1 (Cronstein,1994). Os neutrófilos parecem expressar receptores A_{2B} que quando ocupados inibem a liberação do fator de crescimento endotelial vascular e a transmigração de neutrófilos através das camadas endoteliais (Wakai et al,2001). A presença de receptores A_3 nos neutrófilos humanos não é confirmada. O primeiro artigo descrevendo sua existência e função não usou ligantes apropriados que caracterizassem os efeitos farmacológicos da adenosina em neutrófilos (Bouma et al,1997). Um estudo recente usando abordagens farmacológicas e moleculares mostraram que os receptores A_3 são expressos em neutrófilos humanos, entretanto, os autores não puderam demonstrar o papel funcional desses receptores (Gessi et al,2002). Deste modo, a adenosina regula a função dos neutrófilos de maneira oposta através da ligação do receptor A_1 (imunoestimulatório) e do receptor A_{2A} (imunossupressivo). Este efeito regulatório sugere que a adenosina aumenta a resposta inflamatória nos locais onde a mesma está presente em pequenas concentrações, tanto que em locais onde o metabolismo é maior que a produção de adenosina, pode ocorrer infecção bacteriana. Uma vez que os neutrófilos tenham chegado no local de injúria tecidual, a adenosina,

gerada em altas concentrações pelos tecidos ou células injuriadas, age como um inibidor das funções inflamatórias dos neutrófilos.

Interação da sinalização do receptor de adenosina e tipo de reconhecimento.

Macrófagos e células dendríticas são fagócitos especializados que possuem um papel importante na eliminação de células apoptóticas e moléculas injuriadas, assim como na defesa do organismo contra a infecção. As células que apresentam antígenos (APCs) estão amplamente dispersas no corpo, até mesmo em locais de entrada de microorganismos. Elas participam da captura inicial e processamento de antígenos e depois na ativação específica de mecanismos efetores de linfócitos. Estes linfócitos ativados juntamente com os macrófagos eliminam os patógenos. Provavelmente, a descoberta mais importante sobre os APCs seja o seu mecanismo de reconhecimento por receptores (PRRs), os quais estão envolvidos no reconhecimento de elementos repetitivos em patógenos (lipopolissacarídeos, RNA viral). Estes incluem os receptores do tipo Toll-like (TLRs), lecitinas e receptores do tipo scavenger (Janeway e Medzhitov,2002). Estudos recentes elucidaram que os sinais iniciados pela ocupação do receptor de adenosina pode interferir nos mecanismos intracelulares ativados pelos PRRs. A ligação do receptor de adenosina nos monócitos e macrófagos suprime a produção de IL-12 através do TLR4 (Hasko et al,1998) (Hasko et al,2000) (Link et al,2000) (Khoa et al,2001). Pela IL-12 ser um instrumento direto da resposta inflamatória, a supressão da produção da mesma pela adenosina é provavelmente um dos mecanismos centrais pelo qual a ocupação do receptor de adenosina previna a inflamação do tecido lesado. Além disso, a estimulação do receptor de adenosina diminui a liberação de TLR-4 induzido por vários outros mediadores pró-inflamatórios incluindo o TNF- α , MIP1 α , óxido nítrico, assim como aumenta a produção do anti-inflamatório IL-10 (Hasko et al,1996) (Sajjadi et al,1996) (Mayne et al,2001) (Szabo et al,1998). O efeito inibitório da adenosina na produção do TNF- α pelos macrófagos não é restrita à indução do TLR-4 e sim pelos agonistas TLR2,3,4,7 e 9 (Pinhal-Enfield et al,2003). Estudos recentes com animais nocauteados para os receptores A_{2A} e A₃, demonstraram que ambos receptores contribuem para a supressão do mediador pró-inflamatório seguido pela estimulação do TLR (Hasko et al,2000) (Salvatore et al,2000) (Ohta e Sitkovsky,2001).

Terapias para as doenças inflamatórias pela adenosina

Nas fases iniciais de lesões a adenosina age a favor da infiltração de neutrófilos, promovendo mecanismos menos sofisticados pra defesa. Nos estágios mais avançados de processos inflamatórios, a adenosina contribui para a resolução da inflamação, diminuindo a ativação de macrófagos e avançando no desenvolvimento celular Th2 versus Th1(Lawrence et al,2002). Deste modo, os receptores de adenosina no sistema imune representam um alvo importante para terapias imunomodulatórias para a inflamação, doenças auto imunes e isquêmicas. O uso na administração de adenosina exógena na terapia de doenças, entretanto, não parece ser prático; sistematicamente a adenosina administrada não é seletiva e a expressão de seus receptores em todas as células, leva a vários efeitos que a previnem quanto a ser uma modalidade terapêutica efetiva. Entretanto, agentes ou compostos estáveis que aumentam as concentrações de adenosina nos locais lesados ou de inflamação com alta seletividade para seus receptores, podem ser usados no tratamento de doenças inflamatórias, isquêmicas agudas e auto imunes. Por fim, é necessário enfatizar que embora o aumento das concentrações de adenosina ou a estimulação de seus receptores possa ser útil no tratamento de algumas inflamações e isquemias agudas, em alguns casos isso não é visto. Por exemplo, em alguns estados de doenças associadas à altos níveis de adenosina endógena, como a asma e a doença pulmonar obstrutiva aguda, assim como a sepse e o choque séptico, pode ser necessário uma sinalização diminuída dos reguladores adenosinérgicos (Blackburn,2003) (Hasko et al,2002).

OBJETIVOS

- 1- Avaliar o efeito do tratamento com o DMA (Cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-*N*(3'-*N,N*-dimetilfenil)aminoquinazolina) na prevenção de lesões ateroscleróticas em camundongos LDLr^{-/-}.

- 2- Avaliar se o DMA (Cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-*N*(3'-*N,N*-dimetilfenil)aminoquinazolina) induz a regressão de lesões ateroscleróticas em camundongos LDLr^{-/-}.

MATERIAIS E MÉTODOS

1.1- Composto quinazolínico

O derivado quinazolínico foi sintetizado pela Dra. Silvana Rocco no Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Utilizamos o composto DMA-Cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-*N*(3'-*N,N* dimetilfenil)aminoquinazolina.

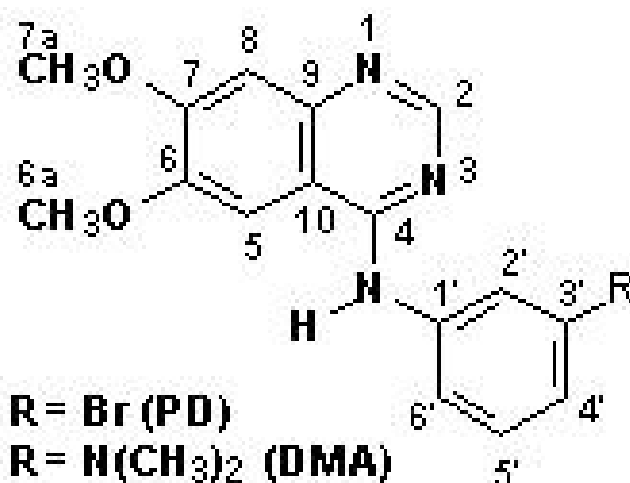


Figura 8- Composto quinazolínico DMA(Cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-*N*(3'-*N,N* dimetilfenil) aminoquinazolina).

1.2- Animais

Foram utilizados camundongos KO LDLr^{-/-}, machos, com aproximadamente 25 gramas e três meses de idade, fornecidos pelo Biotério do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram criados com controle de temperatura e controle de 12 horas no ciclo claro/escuro. Os camundongos foram divididos em grupos:

- Grupo 1-** camundongos nocautes (KO) LDL^{-/-} os quais receberam ração comercial (Nuvital).
- Grupo 2-** camundongos nocautes (KO) LDL^{-/-} os quais receberam ração hipercolesterolêmica contendo 1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico por 15 dias (**HC 15d**).
- Grupo 3-** camundongos nocautes (KO) LDL^{-/-} os quais receberam ração hipercolesterolêmica contendo 1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico por 30 dias (**HC 30d**).
- Grupo 4-** camundongos nocautes (KO) LDL^{-/-} os quais receberam ração hipercolesterolêmica contendo 1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico por 15 dias com gavagem por 15 dias de veículo(propilenoglicol, água, pluoronic) (**PREVENÇÃO**) (**VH 15d**).
- Grupo 5-** camundongos nocautes (KO) LDL^{-/-} os quais receberam ração hipercolesterolêmica contendo 1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico por 15 dias com gavagem por 15 dias de DMA (dose de 30 mg/kg) diluído em veículo(propilenoglicol, água, pluoronic) (**PREVENÇÃO**) (**DMA 15d**).
- Grupo 6-** camundongos nocautes (KO) LDL^{-/-} os quais receberam ração hipercolesterolêmica contendo 1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico por 30 dias com gavagem por 15 dias de veículo(propilenoglicol, água, pluoronic) (**TRATAMENTO**). Os animais foram alimentados com a dieta hipercolesterolêmica por 15 dias para a instalação da doença, só depois a gavagem foi iniciada (**VH 30d**).
- Grupo 7-** camundongos nocautes (KO) LDL^{-/-} os quais receberam ração hipercolesterolêmica contendo 1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico por 30 dias com gavagem por 15 dias de DMA(dose de 30 mg/kg) diluído em veículo(propilenoglicol, água, pluoronic) (grupo de tratamento). Os animais foram alimentados com a dieta hipercolesterolêmica por 15 dias para a instalação da doença, só depois a gavagem foi iniciada (**DMA 30d**).

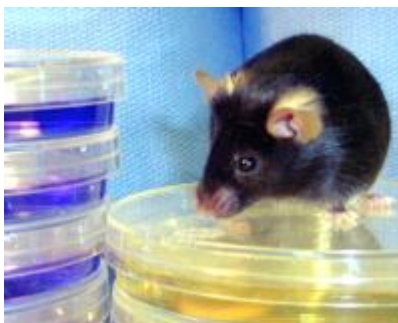


Figura 9- Camundongo LDLr^{-/-}

1.3- Dieta

Foi utilizada além da dieta Chow comercial (Nuvital), a ração hipercolesterolêmica para induzir a formação de placas ateroscleróticas.

Tabela 1- Dieta Hipercolesterolêmica

Ingredientes (1kg)	
Amido de milho	267 g
Caseína(84%)	202 g
Dextrina(90-94%)	113 g
Sacarose	100 g
Óleo de Soja	200 g
Fibra	50 g
Mistura de Minerais	35 g
Mistura de Vitaminas	10 g
L-cistina	3 g
Bitartarato de colina	2,5 g
Colesterol(1,25%)	12,5 g
Ácido Cólico(0,5%)	5 g

1.4- Peso

Todos os animais foram pesados no início do experimento e no dia da coleta.

1.5- Heparinização

Os animais foram heparinizados para a coleta de sangue, com uma solução de 0,1 ml de Heparina 10% .

1.6- Anestesia

Os animais foram anestesiados com 0,2 ml de solução 3% de Ketamina (Parke-Davis), 1% de Xilazina (Bayer AS) e 6 % de salina (dose de 40 mg/kg). A anestesia foi administrada intraperitoneal, na linha média do animal no abdômen.

1.7- Medida das lesões ateroscleróticas

A aterosclerose é uma patologia com desenvolvimento dinâmico e presença de elementos característicos nas diferentes fases do processo. Os diferentes estágios são caracterizados por meio de evidências estruturais e da expressão de fatores indicadores ou marcadores nas lesões, segundo Lusic (Lusic,2000,2004).

Lesão tipo I (Inicial): Caracterizada pela infiltração de LDL na íntima, através das junções endoteliais. O local de maior ocorrência da lesão é em regiões das artérias expostas a fluxo sanguíneo turbulento, baixos fluxos ou ambos (Barakat e Lieu ,2003), e nas áreas onde o estresse de cisalhamento fluxo-induzido é baixo (Knowles e Maeda,2000). Sua retenção na parede do vaso envolve interações entre a fração Apo B (apolipoproteína B) da LDL e proteoglicanos da matriz extracelular. Neste ambiente diferente do plasmático, a LDL sofre modificação, incluindo oxidação, lipólise, proteólise e agregação. As modificações iniciais são caracterizadas pela formação da mmLDL (lipoproteína de baixa densidade minimamente oxidada).

Lesão tipo II (Inflamação): As mmLDL têm atividade pró- inflamatória, mas não são suficientemente modificadas a ponto de serem reconhecidas pelos receptores responsáveis pela remoção da oxLDL (LDL oxidada). Contudo, são eficientes no estímulo às células endoteliais em produzir numerosas moléculas pró-inflamatórias, incluindo moléculas de adesão como ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), VCAM-1 (molécula de adesão vascular), PCAM-1 (molécula de adesão plaqueta-endotelial) e P selectina, as quais exercem efeito quimiotático para os monócitos e células T, bem como fatores de crescimento como o M-CSF (fator estimulante da colônia de macrófagos).

Lesão tipo III (Formação das células espumosas): Agregados de LDLs altamente oxidadas são formados no vaso como resultado da ação das espécies reativas de oxigênio e de algumas enzimas como a esfingomielinase, fosfolipase secretória 2, mieloperoxidase e outras lipases. Este agregado é reconhecido pelos receptores do tipo *scavenger* dos macrófagos (tipo A, CD36 e CD68). A expressão destes receptores são mediados por citocinas como TNF- α (fator de necrose tumoral- α). e IFN- γ (interferon- γ).

Lesão Tipo IV (Formação da placa e fibrose): Caracterizada pelo aumento da massa lipídica extracelular, em sua maioria colesterol e ésteres e pelo acúmulo de células musculares lisas. Citocinas e fatores de crescimento secretado pelos macrófagos e células T são importantes para migração e proliferação das células musculares lisas.

Lesão Tipo V (Lesões complexas e trombose): Este estágio é caracterizado pelo ateroma com múltiplos núcleos de lipídios e centros necróticos na íntima. Evidencia-se tecido altamente desorganizado pela apoptose e presença de áreas de calcificação resultando na placa de fibroateroma com áreas calcificadas. Quando há presença de cápsula fibrosa delgada devido à ação de degradação de matriz por várias

proteínases, tem sido denominada de placa vulnerável e apresenta aumento de células inflamatórias com frequente ruptura de endotélio subjacente a lesão. Assim, com frequência verificam-se vestígios de ruptura de placa e presença de plaquetas e fibrina. Tal ruptura expõe o colágeno e fatores teciduais, formando os trombos que podem ser visualizados na base da membrana da íntima. Vários fatores determinam a desestabilização do ateroma e promovem a trombose, dentre eles, a inflamação e as respostas por ela desencadeada parecem ser as mais relevantes.

Protocolo 1

Após 20 minutos de heparinização, os animais foram anestesiados. O sangue foi coletado pela veia retroorbital com capilares heparinizados e coletados em “eppendorfs” identificados também heparinizados com uma gota de heparina. Após a coleta, o sangue foi centrifugado à 3000 rpm, à 4 graus Celsius por 15 minutos. O plasma foi separado e congelado à -80 graus Celsius para utilização na dosagem de colesterol e triglicérides.

Protocolo 2

As dosagens de triglicérides e colesterol foram feitas pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência por HPLC.

Protocolo 3

Após a retirada do sangue, os animais foram incisionados em sua linha média e tiveram suas aortas descendentes cortadas. Com uma agulha fina, foram aplicados nos corações, mais especificadamente no ventrículo direito, entre as coronárias, 6 ml de salina e 6 ml de formalina. Após a perfusão, os corações foram retirados e colocados em tubos Falcon contendo formalina 10% devidamente identificados por 24 horas.

Após a fixação em formalina 10% por 24 horas, os corações foram lavados durante 2 horas em água corrente. A torneira foi amarrada com gaze e os corações colocados em unicassetes devidamente identificados. Após a lavagem por 3 horas, os corações foram gelatinizados.

Os unicassetes foram mergulhados primeiramente na gelatina (Sigma) 10% por 2 horas em banho-maria. Em seguida, os unicassetes foram retirados da gelatina 10% e colocados por 2 horas na gelatina 15% também em banho-maria. Após as duas horas na gelatina 15%, os unicassetes foram colocados na gelatina 25% overnight em banho-maria.

A gelatina 25% foi utilizada para cobrir os unicassetes em um recipiente de plástico, e os mesmos foram colocados na geladeira por 3 horas. Após as 3 horas, os corações foram retirados dos unicassetes, recortados e colocados para fixação em formalina 10% por 24 horas.

Protocolo 4

Gelatinização das lâminas

-Béquer co 150 ml de água destilada

-0,75 g de gelatina(Sigma)

-0,075g de $KCr(SO_4)_2$ (Sigma)

- 1- Dissolver a gelatina à 70 graus Celsius e depois colocar o outro composto.
- 2- Mergulhar as lâminas uma a uma e colocar para secar na estufa na vertical.
- 3- No dia seguinte, retirar da estufa e guardá-las em papel alumínio.

Protocolo 5

Os corações gelatinizados foram cortados no criostato(HM 505 E Microm) para se obter 480 μ m da extensão total da base da aorta. Os cortes foram de 10 μ m cada, sendo que foram cortadas 6 lâminas de cada animal com 8 cortes em cada uma dessas lâminas.O processamento histológico e coloração dos cortes foram empregados como descrito por Paigen et al em 1987. As lâminas foram gelatinizadas antes de receberem os cortes.

Os cortes dos corações foram corados com Oil Red O (Amresco) e contra corados com Light Green (Amresco) e Hematoxilina de Harris (Sigma), seguindo-se a bateria de corantes abaixo:

- 1- Água- 1 minuto
- 2- Água- 1 minuto
- 3- Isopropanol 60%- 30 segundos
- 4- Oil Red O-18 minutos
- 5- Isopropanol 60%- 30 segundos
- 6- Água- 1 minuto
- 7- Água- 1 minuto
- 8- Hematoxilina de Harris- 1 minuto
- 9- Bluing Solution- 1 minuto
- 10- Água-1 minuto
- 11- Light Green- 30 segundos
- 12- Água- mergulho
- 13- Água- colagem da lamínula

Após a bateria de coloração, foram coladas as lamínulas sobre os cortes com a gelatina cola.

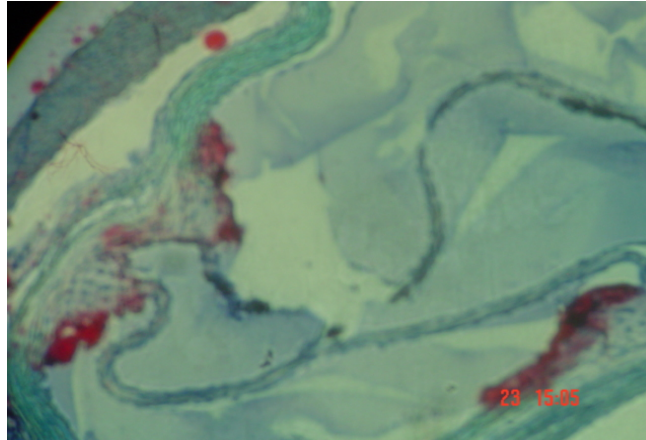


Figura 10- Base da aorta. Lesões ateroscleróticas em vermelho e endotélio em verde (aumento de 20X).

Gelatina-Cola (lâmina/lamínula)

5 g de gelatina

30 ml de água destilada

3,5 ml de glicerina

1,25 ml fenol

Dissolver a gelatina na água destilada à 60 graus Celsius em banho-maria e colocar o fenol por último.

Corantes

OIL RED STOCK SOLUTION(0,4%)

1 g de Oil Red Powder

250 ml de álcool isopropílico

Colocar em um bécker em banho-maria à 50 graus Celsius

OIL RED STAINNING SOLUTION(0,2%)

250 ml de Stock Solution

150 ml de água deionizada

Mexer bem e deixar descansar por 7 minutos. Filtrar à vácuo e com filtro de papel. Bom por 3 horas.

LIGHT GREEN STOCK SOLUTION(1%)

2g de Light Green Powder

198 ml de água deionizada

2ml de ácido acético glacial

LIGHT GREEN STAINNING(0,25%)

50 ml de Stock Solution

150 ml de água Milli Q

HEMATOXILINA DE HARRIS(2,4%)

5g de Hematoxilina

50 ml de álcool 95%

100g de Sulfato de Alumínio e Potássio

2,5g de Óxido de Mercúrio

Dissolver a Hematoxilina no álcool e o Alúmen na água destilada com o auxílio de calor. Misturar as duas soluções e ferver o mais rápido possível. Remover da fonte de calor e juntar o Óxido de Mercúrio aos pouquinhos com cuidado, reaquecer até a fervura e contar um minuto. Afastar da fonte de calor e mergulhar em uma bacia com água e gelo imediatamente. Adicionar 4 ml de Ácido Acético, quando o corante estiver resfriado.

BLUING SOLUTION

1 litro de água Milli Q

40 g de MgSO₄

4 g de KHCO₃ ou NaHCO₃

ISOPROPANOL 60%

600 ml de isopropanol

400 ml de água deionizada

Protocolo 7

As lâminas foram analisadas em um computador, com o software IMAGE PRO PLUS (Leika) que seleciona a área total das lesões ateroscleróticas coradas em vermelho. Foram escolhidos um corte por lâmina(6 cortes- 6 lâminas), sempre em todas as lâminas o corte de mesma localização podendo variar um para frente ou um para trás. As lesões foram contadas e somadas nos seis grupos.

As lesões foram quantificadas como descrito por Rubin e colaboradores em 1991, utilizando-se o programa Image Pro Plus software (versão 3.0) para análise da imagem. As áreas de lesões foram expressas em $\times 10^6 \mu\text{m}^2$. O equipamento para morfometria das áreas de lesão é composto por um computador com o programa Image Pro Plus e uma câmera acoplada a um microscópio. Para a morfometria, as imagens obtidas pela câmera são analisadas. As áreas de lesões são obtidas pela seleção das mesmas com o “mouse” e a somatória dada pelo programa Image Pro Plus da Leika.

RESULTADOS

1- Caracterização do modelo

O camundongo com deleção do receptor de LDL ($LDLr^{-/-}$) utilizado no presente estudo foi desenvolvido por Ishibashi e Colaboradores em 1993 através de recombinação homóloga em células embrionárias de camundongos da cepa C57BL/6. Estes animais apresentam redução do clearance plasmático de VLDL, IDL e LDL. Como resultado, os níveis de IDL e LDL encontram-se aumentados cerca de 7-8 vezes nos camundongos $LDLr^{-/-}$ em relação aos $LDLr^{+/+}$. Isso resulta em aumento de cerca de 2,5 vezes do colesterol plasmático em camundongos $LDLr^{-/-}$. No entanto, diferente de humanos com hipercolesterolemia familiar que apresentam deficiência dos receptores de LDL, camundongos $LDLr^{-/-}$ adultos não apresentam evidências de aterosclerose ou xantomatose significativas espontâneas.

As manifestações patológicas discretas dos camundongos $LDLr^{-/-}$ são atribuídas ao fato de que o colesterol plasmático destes animais não aumenta aos níveis observados em humanos, que chegam a apresentar níveis de 600 a 1000 mg% (Goldstein e Brown,1989). Esta diferença é explicada pelo fato de que o camundongo produz no fígado dois tipos de apolipoproteína B, apoB-100 e apoB-48, sendo que ambas se incorporam às VLDL (Higuchi et al,1992) (Scott,1992), enquanto o fígado de seres humanos produz apenas a apoB-100. Em seres humanos e camundongos, as VLDLs dão origem a uma partícula de lipoproteína residual conhecida como IDL. Estas partículas são clareadas do plasma quase que inteiramente por receptores de LDL (Brown e Goldstein,1993) (Havel,1997). Em indivíduos com deficiência de receptores LDL, as IDL permanecem no plasma e são convertidas em LDL.

O fígado de camundongos produz VLDLs com apoB-100 e apoB-48. Em seres humanos esta apoproteína é secretada apenas nos quilomícrons intestinais (Higuchi et al,1992) (Scott,1992). VLDLs com apoB-48, assim como os quilomícrons geram partículas remanescentes que podem se ligar a receptores LRP (receptor relacionado ao receptor de LDL) (Brown e Goldstein,1993). Remanescentes de quilomícrons e de VLDL que contêm B-48 são clareados do plasma rapidamente, mesmo quando o receptor LDL está ausente ou reduzido (Kita,1982) (Rubinsztein,1990). Sendo assim, em camundongos, remanescentes de quilomícrons e de VLDLs não dão origem a

quantidades significativas de LDL (Van't Hooft,1982). A capacidade de partículas de lipoproteínas que contêm apoB-48 de se ligarem aos receptores LRP é atribuída ao fato de as mesmas poderem aceitar grandes quantidades de apoE, que na verdade é o ligante do receptor LRP, assim como do receptor LDL. Em camundongos adultos ~70% da apoB hepática é do tipo B-48 (Ishibashi,1993) sendo esta, provavelmente, a razão pela qual os camundongos LDLr^{-/-} apresentam alterações discretas da quantidade de LDL.

Em contraste com os controles C57BL/6, camundongos LDLr^{-/-} apresentam níveis de colesterol bastante elevados quando alimentados com quantidades relativamente modestas de colesterol e gorduras saturadas (Libby,2002). Dietas contendo 0.2% de colesterol e 10% de óleo de coco aumentam o colesterol sérico cerca de 3 vezes mais nos camundongos LDLr^{-/-} que nos controles C57BL/6. Estes resultados indicam que os camundongos normais alimentados com colesterol têm receptores de colesterol em número suficiente para clarear a produção aumentada de VLDL que ocorre em consequência da dieta rica em colesterol e gorduras saturadas. Por outro lado, os camundongos LDLr^{-/-} não podem clarear estas partículas. A capacidade que os camundongos normais têm de clarear grandes quantidades de lipoproteínas do plasma pode explicar a resistência ao desenvolvimento de aterosclerose e xantomatose induzida por dieta rica em colesterol.

Em estudos nos quais a dieta oferecida continha 1,25% de colesterol, camundongos LDLr^{-/-} desenvolveram todas as manifestações apresentadas por seres humanos homozigotos para hipercolesterolemia familiar em acompanhamento de cerca de 6 meses. Com esta dieta oferecida por períodos prolongados os níveis de colesterol aumentaram cerca de 6 vezes(Ishibashi,1993).

No presente estudo, camundongos LDLr^{-/-} foram alimentados com dieta com concentração de colesterol de 1,25%. Como indicado no gráfico da Figura 11, os camundongos LDLR^{-/-} alimentados com esta dieta por 15 dias apresentaram níveis de colesterol plasmático cerca de 3,2 vezes maior que aqueles dos camundongos alimentados com dieta regular (694 vs 223 mg/dl, respectivamente).

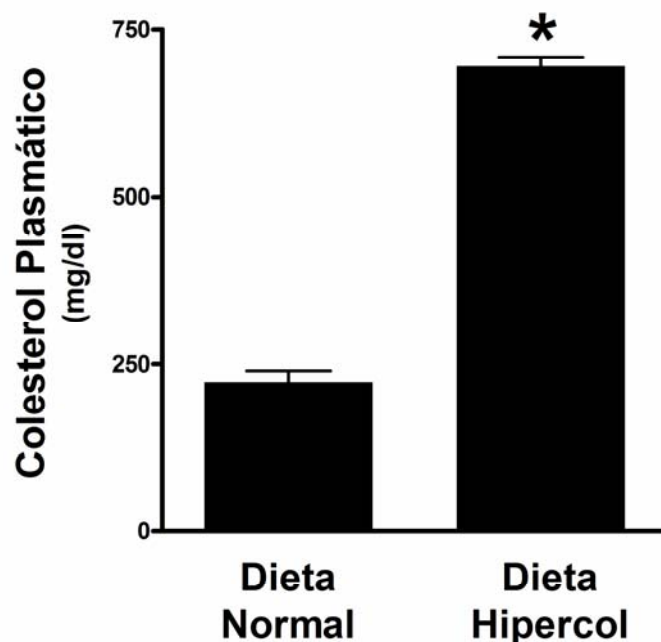


Figura 11- Nível de colesterol plasmático em camundongos LDLR^{-/-} alimentados com dieta normal ou comercial e com dieta hipercolesterolêmica ambas por 15 dias (Ishibashi,1993).

Nos camundongos LDLr^{-/-} utilizados no presente estudo, a avaliação da presença de lesões ateroscleróticas foi feita após quinze e trinta dias de dieta hipercolesterolêmica. Em geral os trabalhos que utilizaram este modelo avaliaram a presença de lesão aterosclerótica após períodos de meses em dieta hipercolesterolêmica (Paigen,1987). Nestes casos, as lesões são exuberantes e localizadas na raiz da aorta, óstio das coronárias, com a formação de placas xantomatosas nos folhetos da válvula aórtica. Verificamos que após quinze dias de dieta os camundongos LDLr^{-/-} apresentaram lesões microscópicas, mas consistentes nos folhetos da válvula aórtica e na raiz da aorta. Na figura 12, são mostrados exemplos representativos de fotomicrografias de amostras da raiz da aorta obtidas de camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hipercolesterolêmica por 30 (Fig 12A) e 15 dias (Fig 12B). As amostras foram coradas com *Oil Red O*, que destaca a presença de células espumosas nas regiões de formação das lesões ateroscleróticas.

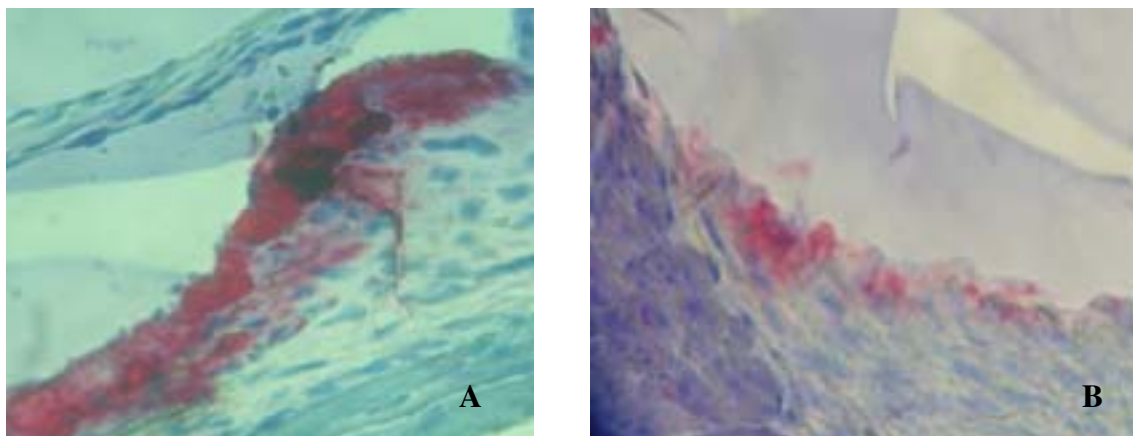


Figura 12- Lesão aterosclerótica em camundongo alimentado com dieta hipercolesterolêmica por 30 dias(12A) e 15 dias (12B) (aumento de 20X).

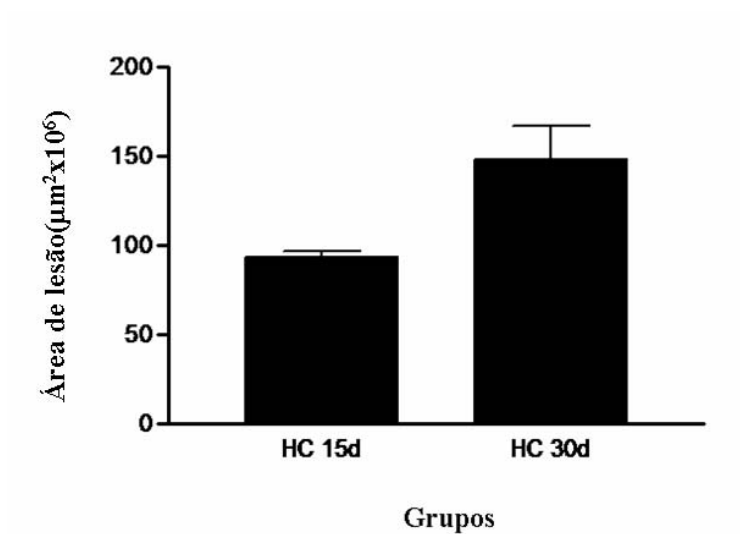


Figura 13- Área de lesões ateroscleróticas em camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hipercolesterolêmica por 15 dias e 30 dias. Os camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta comercial não possuem formação de placas.

O gráfico da Figura 13 indica a distribuição das áreas de lesão avaliadas por planimetria em 10 camundongos alimentados por 15 dias e 8 alimentados por 30 dias com dieta hipercolesterolêmica. Após 30 dias de dieta hipercolesterolêmica as lesões

apresentaram área média de 199 ± 30 contra $100 \pm 10 \mu\text{m}^2 \times 10^6$ daqueles alimentados com dieta hipercolesterolêmica por 15 dias.

A aterosclerose em $\text{LDLr}^{-/-}$ é geralmente avaliada apenas períodos prolongados de dieta hipercolesterolêmica. Neste modelo animal não há formação espontânea de lesão aterosclerótica, pois somente a deleção do receptor de LDL não faz com que circule lipídios suficiente para formação da mesma. Este camundongo $\text{LDLr}^{-/-}$, tem como background o animal C57BL/6 que também foi utilizado nos experimentos. Utilizamos a dieta hipercolesterolêmica por um período de até trinta dias de tratamento, pois constatamos que esses animais já possuem lesão com quinze dias de dieta rica em colesterol.

2- Peso Corporal

Os grupos de animais, tanto os de prevenção quanto os de tratamento foram pesados um dia antes de começarem a se alimentar com a dieta HC e no final no dia do sacrifício dos mesmos. Constatamos nos dois tratamentos que os animais perderam peso significativo em relação ao início dos tratamentos, com exceção do grupo de animais do tratamento com veículo que observamos em alguns animais a manutenção e aumento de peso corpóreo (Figuras 14 e 15)

2.1- Prevenção

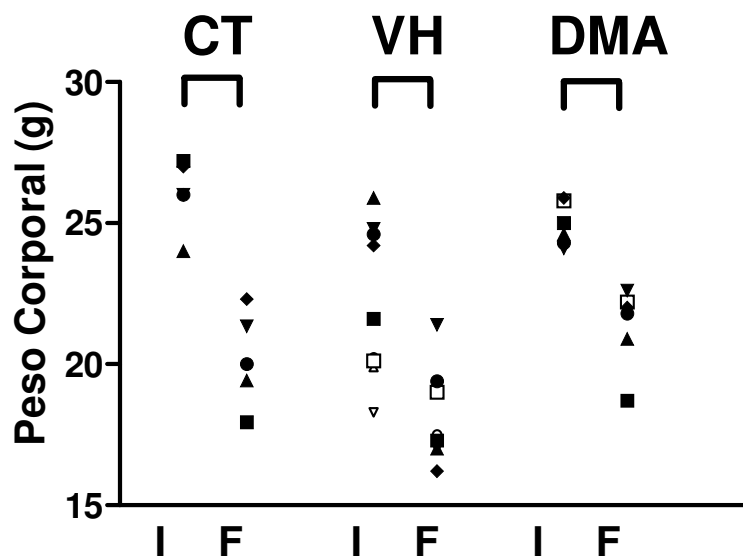


Figura 14- Peso corporal do animais.I(peso inicial: no dia 1 de tratamento), F (peso final: no dia 15 de tratamento). CT(HC 15 dias), VH(veículo por gavagem com dieta HC) e DMA(DMA por gavagem diluído em veículo com dieta HC).

2.2- Tratamento

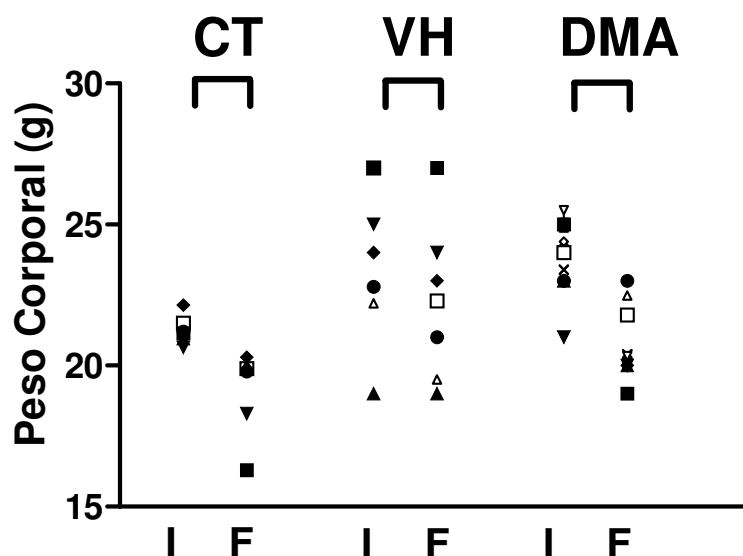


Figura 15- Peso corporal do animais.I(peso inicial: no dia 1 de tratamento), F (peso final: no dia 30 de tratamento).

3- Triglicérides e colesterol plasmático

3.1- Triglicérides

As medidas foram baseadas na quantidade normal de triglicérides no plasma (+ ou – 70mg/dl). Com isso os resultados demonstraram que o tratamento com o DMA nos dois grupos aumenta o nível sérico de triglicérides no plasma em comparação ao grupo CT (figura 15)

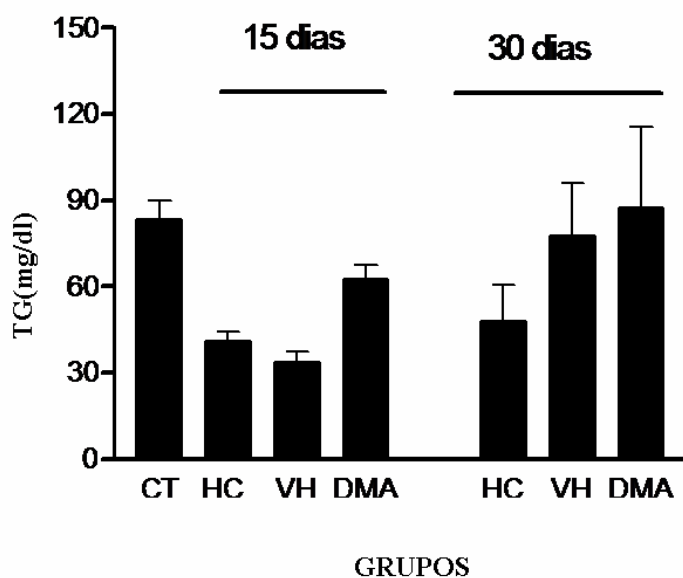


Figura 16- Nível de triglicérides plasmático nos animais controle, alimentados com dieta comercial (CT), HC (dieta hipercolesterolêmica) por 15 e 30 dias, VH (veículo por gavagem com dieta HC) por 15 e 30 dias e DMA (DMA diluído em veículo com dieta HC) por 15 e 30 dias.

3.2- Colesterol

As medidas foram baseadas na quantidade normal de colesterol no plasma (+ ou – 200mg/dl). Com isso os resultados demonstraram que o tratamento com o DMA nos dois grupos aumenta o nível sérico de colesterol no plasma em comparação ao grupo CT.

CT= DIETA CHOW

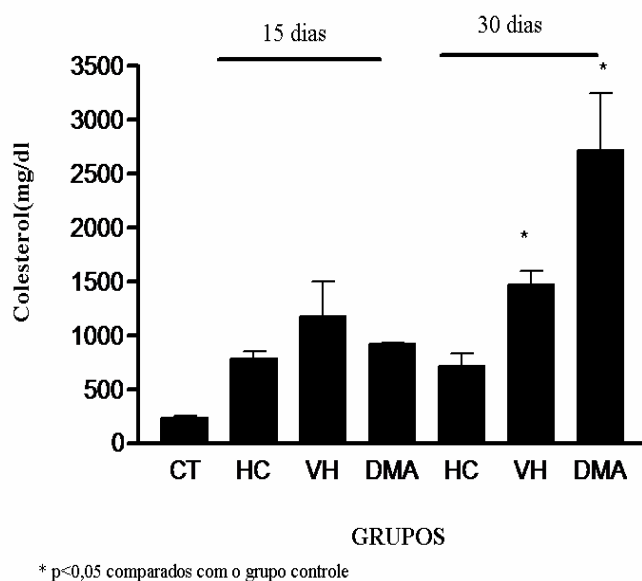


Figura 17- Dosagem do colesterol plasmático nos grupos CT(dieta chow ou comercial), HC 15 e 30 dias, VH prevenção e tratamento e DMA prevenção e tratamento.

Após a mensuração do colesterol plasmático, fizemos a mensuração do colesterol fracionado, sendo que os resultados demonstraram um aumento da concentração de HDL plasmático em animais tratados com o composto DMA.

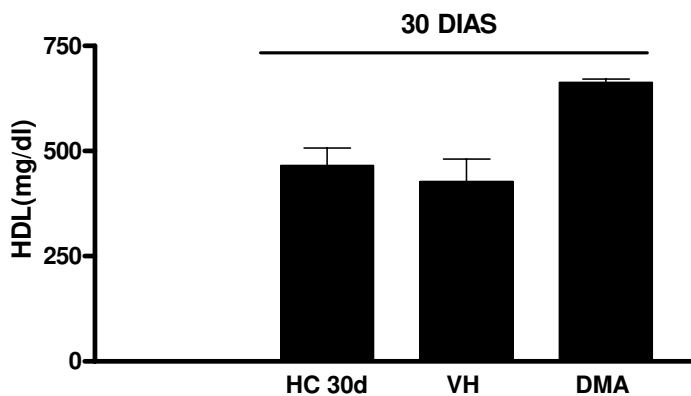


Figura 18- Nível de HDL plasmático nos animais HC 30d (dieta HC 30 dias), VH tratamento e DMA tratamento.

4- Área de lesão

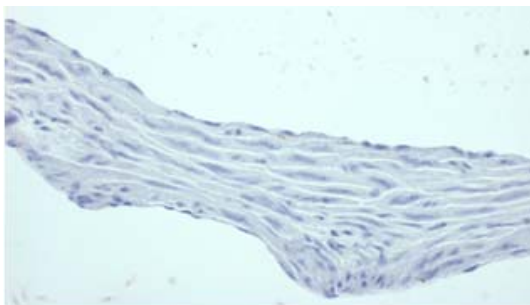
Efeito do composto quinazolínico DMA sobre a área de lesão aterosclerótica na base da artéria aorta de camundongos LDLr-/-.

4.1- Prevenção

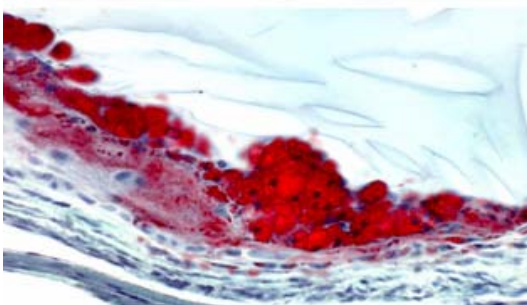
As áreas de lesão foram medidas nos três grupos:CT(dieta HC 15 dias),VH(dieta HC 15 dias + VH gavagem) e DMA(dieta HC 15 dias +DMA gavagem). Os resultados demonstraram que houve uma diminuição na área de lesão do grupo VH em relação ao grupo CT e uma diminuição significativa da área de lesão do grupo DMA em relação ao grupo CT. A dose utilizada do composto foi de 30mg/kg.

A GAVAGEM FOI INICIADA CONCOMITANTEMENTE À DIETA HC.

Controle



**Veículo
+
Dieta**



**DMA
+
Dieta**

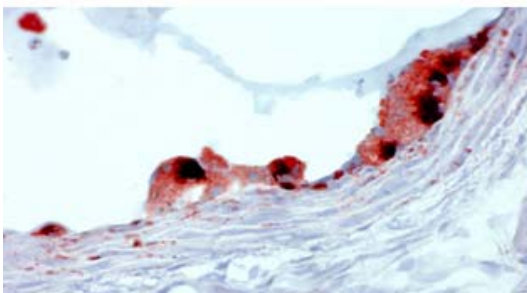
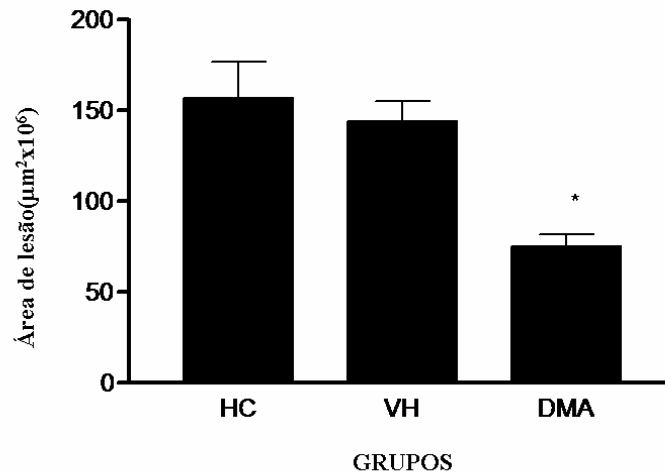


Figura 19- Base da artéria aorta. O grupo controle foi alimentado com dieta Chow por 15 dias. O grupo VH foi alimentado com dieta hipercolesterolêmica por 15 dias e gavado por 15 dias com o veículo. O grupo DMA foi alimentado com dieta hipercolesterolêmica por 15 dias e gavado por 15 dias com DMA diluído em veículo. (azul-endotélio/vermelho-placa aterosclerótica) (aumento de 20X).



*p<0,05 comparado ao grupo HC

Figura 20- Área de lesão aterosclerótica nos animais no tratamento preventivo(HC 15 dias, VH 15 dias e DMA 15 dias).

4.2- Tratamento

As áreas de lesão foram medidas nos três grupos:CT(dieta HC 30 dias), VH(dieta HC 30 dias + VH) e DMA(dieta HC 30 dias + DMA). Os resultados demonstraram que houve uma diminuição substancial da área de lesão do grupo DMA em relação ao grupo CT. A dose utilizada do composto foi de 30mg/kg.

A GAVAGEM FOI INICIADA NO DÉCIMO SEXTO DIA DE DIETA HC.

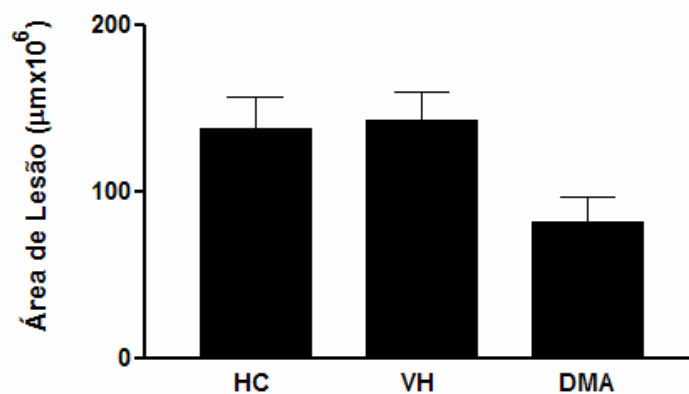


Figura 21- Área de lesões ateroscleróticas no tratamento com DMA (HC 30 dias, VH 15 dias+dieta, DMA 15 dias+dieta).

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram evidências de que o tratamento com o composto quinazolinico DMA atenua a aterosclerose induzida por dieta hipercolesterolêmica em camundongos LDLr^{-/-}. Este efeito foi observado tanto quando o tratamento foi aplicado de forma preventiva como quando foi aplicado em camundongos com lesões pré-estabelecidas. Outro resultado importante do tratamento com DMA, com possíveis implicações no seu efeito sobre as placas ateroscleróticas, foi o aumento dos níveis séricos de HDL observado nos camundongos que receberam o composto e foram alimentados com dieta hipercolesterolêmica, em comparação com os camundongos que foram tratados com veículo apenas. De maneira geral, estes resultados indicam ser o DMA um potente agente anti-aterogênico, com potencial para aplicações na prevenção, bem como no tratamento secundário da aterosclerose.

Modelo de Aterosclerose

A proposta de que os efeitos anti-aterogênicos do DMA observados no presente estudo tem potencial para ser aplicado no tratamento da aterosclerose, tem suporte no fato de que o modelo de aterogênese do camundongo LDLr^{-/-} reproduz vários dos mecanismos patogênicos da doença natural em seres humanos.

Nosso entendimento atual é que o desenvolvimento das placas de aterosclerose resulta do acúmulo de LDL na íntima das artérias, seguido de diapedese de leucócitos, formação de células espumosas, proliferação de células musculares lisas e proliferação de tecido conjuntivo (Hansson, 2005; Ross, 1999; Lusis, 2002).

Remonta às primeiras décadas do século passado, a idéia de que o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas está associado ao excesso de lípidos circulantes, particularmente do colesterol (Ignatowski, 1908). A doença natural em seres humanos é multifatorial, sendo influenciada por fatores de origem genética ainda pouco conhecidos e fatores adquiridos como dislipidemias, diabetes e inflamação sistêmica crônica (Lusis, 2002). No entanto, está bem estabelecida a associação entre hipercolesterolemia e aumento da concentração sérica de lipoproteína de baixa densidade

(LDL - hiperlipoproteinemia) e a incidência de aterosclerose e/ou de suas conseqüências clínicas como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (Lusis, 2002). Hiperlipoproteinemias podem ocorrer em conseqüência de excesso de síntese ou deficiência na remoção e metabolização de LDL. São conhecidas várias formas de hiperlipoproteinemias de origem genética, tanto monogênicas como poligênicas. No entanto, as hiperlipoproteinemias mais comuns são as secundárias que acompanham outras doenças como o diabetes, insuficiência renal, alcoolismo, hipotireoidismo e obesidade. É importante salientar que o conhecimento das formas genéticas de hiperlipoproteinemias, apesar de raras, permitiram grandes avanços no entendimento da aterogênese e forneceram a base para o desenvolvimento de modelos de camundongos geneticamente modificados utilizados largamente nos dias de hoje em estudos de mecanismos de aterogênese.

Pacientes com hipercolesterolemia familiar representam um dos exemplos mais ilustrativos da capacidade de hipercolesterolemia e hiperlipoproteinemia de induzir o aparecimento de aterosclerose. Nesta doença, os níveis plasmáticos de colesterol e LDL são bastante elevados devido à ausência ou disfunção dos receptores de LDL. Normalmente, a ligação do LDL ao seu receptor ocorre supressão da atividade da enzima HMG-CoA-redutase que é o passo limitante da síntese endógena de colesterol no fígado e outros tecidos, o que resulta em controle adequado dos níveis circulantes de colesterol e LDL. Em indivíduos com hipercolesterolemia familiar o fígado e os demais tecidos continuam a produzir grandes quantidades de colesterol em conseqüência da ausência de supressão da síntese endógena. Nesta situação a aterosclerose se desenvolve precocemente levando rapidamente ao estabelecimento de lesões ateroscleróticas obstrutivas.

A hipercolesterolemia causa alteração focal do endotélio das artérias de grande e médio calibre. Este fenômeno parece ser permissivo para a infiltração de LDL na parede das artérias, sendo que a retenção destas macromoléculas na camada íntima inicia uma resposta inflamatória local (Skalen et al, 2002;Leitinger, 2003). A modificação dos complexos lipoprotéicos das LDL retidas na íntima, devida a sua oxidação ou ataque enzimático, leva à liberação de fosfolípidos que podem produzir alterações das células

endoteliais caracterizadas pelo aumento da expressão de moléculas de adesão e genes pró-inflamatórios (Dai et al, 2004).

Camundongos são, em geral, resistentes ao desenvolvimento de aterosclerose, principalmente devido a peculiaridades do metabolismo de lípidos (Trojan et al, 2004). Nesta espécie, a maior parte do colesterol é transportado na fração de lipoproteínas de alta densidade (HDL), que sabidamente protegem contra o desenvolvimento de aterosclerose, sendo relativamente baixas as concentrações de VLDL e LDL (Trojan et al, 2004). Isto se deve ao fato de que o fígado murino tem alta capacidade de clearance de LDL, o que contribui para manter os níveis de colesterol em níveis relativamente baixos em relação àqueles observados em seres humanos (Trojan et al, 2004).

O camundongo LDLr^{-/-} foi concebido como um modelo para estudo da hipercolesterolemia familiar e, de fato, reproduz diversas características da aterogênese natural observada em seres humanos, sendo, nos dias de hoje o modelo murino mais frequentemente utilizado no estudo dos efeitos da dieta na aterosclerose. Comparados com o tipo selvagem da cepa C57BL/6, camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta regular exibem elevados níveis de LDL e colesterol e desenvolvem lesões ateroscleróticas lentamente (Sehayek et al, 2001; Moore e Kawashiri, 2003). Contudo, a adição de colesterol à dieta resulta em expressivo aumento dos níveis de VLDL e de LDL, juntamente com desenvolvimento de lesões ateroscleróticas avançadas em cerca de 2 a 3 meses (Ishibashi et al, 1994). Em acordo com estes resultados, no presente estudo encontramos aumento expressivo do colesterol (4 vezes e 2 vezes respectivamente) e triglicérides (25%) após 15 e 30 dias de dieta hipercolesterolêmica.

As lesões no modelo de camundongos LDLr^{-/-} iniciam-se na base da aorta, mas evoluem para atingir grande parte da mesma e seus ramos principais, sendo que as lesões progridem do acúmulo de células espumosas em estrias gordurosas para placas fibro-proliferativas com núcleos lipídico/necróticos, semelhante ao espectro de lesões observados na doença aterosclerótica em seres humanos (Reardon et al, 2003).

Neste modelo, também é encontrada disfunção endotelial, expressão de moléculas de adesão e pró-inflamatórias, acúmulos de LDL oxidada na parede dos vasos e elevados títulos de auto-anticorpos para epítomos da LDL oxidada e este aumento,

assim como na doença natural dos seres humanos, se correlaciona com a extensão da aterosclerose (Palinski et al, 1995). Além disso, esses animais em poucos dias de indução por dieta hipercolesterolêmica, possuem uma grande capacidade de formação de placas ateroscleróticas (Krieger et al, 2006).

O modelo LDLr^{-/-} também tem sido utilizado para o estudo dos efeitos de agentes farmacológicos anti-aterogênicos já avaliados no tratamento de pacientes. Por exemplo, o tratamento de camundongos LDLr^{-/-} com estatinas tem permitido constatar a prevenção e regressão da aterosclerose experimental, mas também, decifrar possíveis mecanismos envolvidos no efeito anti-aterogênico daqueles compostos (Kawak et al, 2003). Portanto, o uso deste modelo poderá, em estudos futuros que utilizem o tratamento com DMA, indicar novos mecanismos não suspeitados, envolvidos na aterogênese.

Um aspecto importante dos nossos resultados foi a indicação de que o DMA pode ser efetivo não apenas na prevenção primária da aterogênese, mas também no tratamento secundário de lesões já estabelecidas. Esta conclusão teve base no fato de que camundongos LDLr^{-/-} alimentados previamente com dieta hipercolesterolêmica por 15 dias e tratados com DMA por mais 15 dias, e mantidos em dieta hipercolesterolêmica apresentaram dimensões das placas ateroscleróticas significativamente menores do que camundongos LDLr^{-/-} que receberam a dieta por 15 ou 30 dias e foram tratados com o veículo. Esta possibilidade é estimulante, já que as evidências de regressão da aterosclerose são ainda escassas e a procura por agentes farmacológicos que eficazmente reduzam as dimensões e complicações de placas ateroscleróticas sendo o foco de grande esforço na pesquisa em aterosclerose.

Neste contexto é preciso salientar que, apesar de os dados indicativos de que o DMA possa atuar no tratamento secundário da aterosclerose no modelo de camundongo LDLr^{-/-}, são ainda necessários estudos que avaliem a involução das placas de aterosclerose in vivo, já que nosso estudo, realizado com exames morfométricos post-mortem, não permitiram o acompanhamento do curso temporal do efeito do DMA.

Portanto, de maneira geral, o modelo utilizado neste estudo preenche vários requisitos para o estudo da aterogênese, bem como para testes de agentes farmacológicos com propriedades antiaterogênicas, sugerindo que nossos resultados com o DMA podem

dar suporte ao uso deste tipo de composto no tratamento de indivíduos com aterosclerose primária e secundária.

Mecanismo de Ação

Os resultados que demonstraram mudança no perfil das lipoproteínas séricas, com aumento da concentração plasmática de HDL sugerem que o efeito anti-aterogênico do DMA pode ser relacionado a uma ação primária ou secundária no metabolismo de lipoproteínas. De fato, aumento nos níveis circulantes de HDL se associam com proteção ao aparecimento da aterosclerose e também regressão de lesões estabelecidas (Parolini et al, 2005). De acordo com esta idéia, estudos anteriores em camundongos sugeriram que o aumento dos níveis de HDL não bloqueiam a formação da lesão aterosclerótica mas age apenas na sua regressão (Desumont et al, 2000).

No entanto, os resultados do nosso estudo não esclareceram quais os mecanismos responsáveis por este efeito do DMA no perfil lipídico. Neste contexto, é preciso salientar que os derivados anilinoquinazolínicos foram inicialmente idealizados e sintetizados (Fry et al, 1994; Rocco et al, 2004) como inibidores de tirosino quinases. Estes compostos orgânicos sintéticos guardam algum grau de homologia com o ATP e foram propostos inicialmente como antagonistas de tirosino-quinases que são moléculas de sinalização com diversas funções celulares. Assim, na aterogênese, vale mencionar que receptores de fatores de crescimento como PDGF, VEGF e IGF são tirosino quinases e contribuem para função de fibroblastos, células endoteliais, leucócitos, células musculares lisas, plaquetas e fibroblastos, todas com potencial envolvimento na aterogênese. A inibição de tirosina quinases pode, como consequência, influenciar diversos aspectos da aterogênese. Há na literatura, indicações de que inibidores de tirosino-quinases podem exercer efeitos pró ou anti-aterogênico, dependendo do modelo experimental utilizado e da especificidade do inibidor. Os receptores de tirosina kinases são glicoproteínas transmembrânicas ativadas por peptídeos específicos (fatores de crescimento) e mantêm a função da proteína tirosina quinase que cataliza a transferência do fosfato de ATP para os resíduos de substratos de proteínas tirosina, envolvidos em funções celulares como a

proliferação, diferenciação, migração ou apoptose ([Hubbard e Till, 2000](#)). Os receptores (EGFR, PDGFR) possuem um papel crucial na regulação da proliferação celular e sua sobrevivência. Sua expressão é baixa em vasos normais, aumentando em lesões ateroscleróticas, devido ao aumento da expressão de seus ligantes (Ross, 1993). A ativação do PDGFR pode estimular a migração e proliferação de células musculares lisas e na área da íntima do vaso, e sintetizar moléculas da matriz na formação da capa fibrosa (Pompili et al, 1995). PDGF está muito expresso em lesões ateroscleróticas, sendo considerado um mecanismo de reparo, contrabalanceando a apoptose de células musculares lisas induzidas por lesão local e prevenindo a ruptura de placa e eventos subsequentes de trombose (Waltenberger, 1997). Por outro lado, o PDGF pode participar da proliferação celular que ocorre nas áreas ateroscleróticas sendo importante no desencadeamento da restenose (Pompili et al, 1995).

Experimentos feitos em nosso laboratório, demonstraram que um dos mecanismos do composto poderia ser de inibição da adenosina kinase, aumentando a biodisponibilidade de adenosina em animais que receberam o composto DMA por via oral (Marin e Franchini, 2005).

Estudos recentes indicaram que a adenosina, agindo nos receptores A_{2A} , pode inibir a inflamação. Estes receptores são encontrados na maioria das células provenientes da medula óssea (Linden, 2005). A resposta celular parece ser mediada predominantemente pelo AMP cíclico e resulta na diminuição de $TNF\alpha$ liberado pelos monócitos (Link et al, 2000), redução da ativação plaquetária (Lappas et al, 2005) e inibição da oxidação de neutrófilos (Fredholm et al, 1996). Além do mais, estas respostas previnem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e radicais de oxigênio, previnem a ativação das células endoteliais, e diminuem a oclusão microvascular (Linden, 2005). Ohta e Sitkovsky em 2001, demonstraram que a adenosina está fisiologicamente envolvida na ativação das células imunes e na proteção tecidual na inflamação aguda in vivo. A adenosina extracelular acumulada em áreas inflamadas com danos na microcirculação, diminui o suprimento sanguíneo e a tensão da baixa taxa de oxigênio (Sitkovsky, 2003).

Estudos realizados em nosso laboratório, ainda não publicados indicam que o aumento de adenosina induzido por DMA reduz a atividade de células inflamatórias em modelo de peritonite por tioglicolato, efeito este acompanhado por redução nos níveis

locais e circulantes de citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, em macrófagos isolados em cultura demonstramos que a adenosina e o DMA promovem a redução da expressão do fator de transcrição pró-inflamatório NF-kB, sugerindo que o efeito anti-inflamatório do DMA está, provavelmente ligado à ação da adenosina nas células inflamatórias.

A hipercolesterolemia pode ser a causa direta ou indireta da disfunção cardíaca. Os efeitos diretos dos altos níveis de colesterol são associados com mudanças nas atividades das enzimas do sarcolema cardíaco como, por exemplo, a ATPase (Saini et al,2004). Além do mais, colesterol alto induz mudanças de composição, estruturais e funcionais nas células musculares lisas das artérias que participam na progressão da aterosclerose (Chen et al, 1995) (Tulenکو et al,1998). A disfunção endotelial mediada pela redução da síntese e aumento da destruição do óxido nítrico (NO), um agente vasodilatador, também tem sido vista em resposta aos altos níveis de colesterol (Saini et al, 2004). Por outro lado, os efeitos indiretos do colesterol estão ligados à conversão ao LDL oxidado, o qual é visto como o maior estimulante da proliferação de células musculares lisas, adesão e migração de monócitos assim como a formação de células espumosas (Berliner e Heinecke, 1996).

Apesar de termos demonstrado o efeito anti-aterogênico do DMA, não realizamos estudos aprofundados no sentido de esclarecer os mecanismos pelos quais o DMA reduz a aterosclerose no modelo de camundongo LDLr-/.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que o DMA é eficaz no tratamento preventivo bem como no tratamento de lesões estabelecidas no modelo de aterosclerose induzida por dieta hipercolesterolêmica em camundongos LDLr $-/-$. Tendo em vista que, o DMA por inibir a atividade da adenosina quinase, aumenta a biodisponibilidade da adenosina nos tecidos, o efeito anti-aterogênico do DMA resulta, presumivelmente, da ação anti-inflamatória da adenosina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Assmann G, Cullen P, Jossa F, Lewis B, et al. Coronary heart disease: reducing the risk. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 1999; 19, 1819–1824.

Bathon JM, Martin RW, Fleischmann RM, Tesser JR, et al. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343, 1586–1593.

Blackburn MR, Volmer JB, Thrasher JL, Zhong H, et al. Metabolic consequences of adenosine deaminase deficiency in mice are associated with defects in alveogenesis, pulmonary inflammation, and airway obstruction. *J. Exp. Med.* 2000; 192, 159–170.

Blackburn MR, Lee CG, Young HW, Zhu Z, et al. Adenosine mediates IL-13-induced inflammation and remodeling in the lung and interacts in an IL-13- adenosine amplification pathway. *J. Clin. Invest.* 2003; 112, 332–344.

Blackburn MR. Too much of a good thing: adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. *Trends Pharmacol. Sci.* 2003; 24, 66–70.

Boren J et al. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J. Clin. Invest.* 1998; 101, 2658–2664.

Bouma MG, van den Wildenberg FA, Buurman WA. Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1996; 270, C522–C529.

Bouma MG, Jeunhomme TM, Boyle DL, Dentener MA, et al. Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood; involvement of adenosine A2 and A3 receptors. *J. Immunol.* 1997; 158, 5400–5408.

Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein receptors in the liver Control signals for plasma cholesterol traffic. *J. Clin. Invest.* 1993; 72:743-747.

Chan L. Apolipoprotein B, the major protein component of triglyceride-rich and low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:25621-25624.

Chunn JL, Young HW, Banerjee SK, Colasurdo GN, et al. Adenosine-dependent airway inflammation and hyperresponsiveness in partially adenosine deaminase-deficient mice. *J. Immunol.* 2001; 167, 4676–4685.

Cronstein BN, Kramer SB, Weissmann G, Hirschhorn R . Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. *J. Exp. Med.* 1983; 158, 1160–1177.

Cronstein BN, Eberle MA, Gruber HE, Levin RI. Methotrexate inhibited neutrophil function by stimulating adenosine release from connective tissue cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991; 88, 2441–2445.

Cronstein BN, Naime D, Ostad E. The anti-inflammatory mechanism of methotrexate: increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *J. Clin. Invest.* 1993; 92, 2675–2682.

Cronstein BN. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J. Appl. Physiol.* 1994; 76, 5–13.

Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, et al. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:14871-14876.

Desumont C et al. Complete atherosclerosis regression after human apoE gene transfer in apoE deficient/nude mice. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20, 435–442.

Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001; 97, 587–600.

Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* 1929; 68, 213–237.

Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, et al. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J. Exp. Med.* 2003; 198, 783–796.

Febbraio M et al. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerosis lesion development in mice. *J. Clin. Invest.* 2000; 105, 1049–1056.

Feger F, Varadaradjalou S, Gao Z, Abraham SN, et al. The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens. *Trends Immunol.* 2002; 23, 151–158.

Feoktistov I, Goldstein AE, Ryzhov S, Zeng D, et al. Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation. *Circ. Res.* 2002; 90, 531–538.

Feoktistov I, Ryzhov S, Goldstein AE, Biaggioni I. Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A2B and A3 adenosine receptors. *Circ. Res.* 2003; 92, 485–492.

Flamand N, Boudreault S, Picard S, Austin M, et al. Adenosine, a potent natural suppressor of arachidonic acid release and leukotriene biosynthesis in human neutrophils. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161, S88–S94.

Fossetta J, Jackson J, Deno G, Fan X, et al. Pharmacological analysis of calcium responses mediated by the human A3 adenosine receptor in monocyte-derived dendritic cells and recombinant cells. *Mol. Pharmacol.* 2003;63, 342–350.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, et al. International union of pharmacology XXV Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol.* 2001; Rev. 53, 527–552.

Fry DW, Kraker AJ, McMichael A, Ambroso LA, et al. A Specific Inhibitor of the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase. *Science* Aug 19,1994;265,5175:1093.

Gadangi P, Longaker M, Naime D, Levin RI, et al. The anti-inflammatory mechanism of sulfasalazine is related to adenosine release at inflamed sites. *J. Immunol.* 1996; 156, 1937–1941.

Gerhard GT, Duell PB. Homocysteine and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 1999; 10, 417–429.

Gessi S, Varani K, Merighi S, Cattabriga E, et al. A₃ adenosine receptors in human neutrophils and promyelocytic HL60 cells: a pharmacological and biochemical study. *Mol. Pharmacol.* 2002; 61, 415–424.

Gimbrone MA Jr. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am. J. Pathol.* 1999; 155, 1–5.

Goldbourt U, Neufeld HN. Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 6, 357–377.

Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding sites on macrophages that mediate uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1979; 76, 333–337.

Goldstein JL, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, editors. McGraw-Hill Inc., New York 1989; 1215-1250.

Grainger DJ, Kemp PR, Liu AC, Lawn RM, et al. Activation of transforming growth factor- β is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. *Nature* 1994; 370, 460–462.

Guevara NV, Kim H-S, Antonova EL, Chan L. The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. *Nature Med.* 1999; 5, 335–339.

Gupta S et al. IFN- γ potentiates atherosclerosis in apoE knock-out mice. *J. Clin. Invest.* 1997; 99, 2752–2761.

Hannon JP, Pfannkuche HJ, Fozard JR. A role for mast cells in adenosine A₃ receptor mediated hypotension in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 115, 945–952.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685–1695.

Hasko G, Szabo C, Nemeth ZH, Kvetan V, Pastores SM, et al. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- α , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J. Immunol.* 1996; 157, 4634–4640.

Hasko G, Nemeth ZH, Vizi ES, Salzman AL, et al. An agonist of adenosine A3 receptors decreases interleukin-12 and interferon-g production and prevents lethality in endotoxemic mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1998; 358, 261–268.

Hasko G, Kuhel DG, Chen JF, Schwarzschild MA, et al. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-alpha production via adenosine A2A receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J.* 2000; 14, 2065–2074.

Hasko G, Kuhel DG, Nemeth ZH, Mabley JG, et al. Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *J. Immunol.* 2000;164, 1013–1019.

Hasko G, Deitch EA, Szabo C, Nemeth ZH, et al. Adenosine: a potential mediator of immunosuppression in multiple organ failure. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2002; 2, 440–444.

Havel RJ. Lipid transport function of lipoproteins in blood plasma. *Am. J. Physiol.* 1997; 253: E1-E5.

Hegele RA. Paraoxonase—genes and disease. *Ann. Med.* 1999; 31, 217–224.

Higuchi K, Kitagawa K, Kogishi K, Takeda T. Developmental and age-related changes in apolipoprotein B mRNA editing in mice. *J. Lipid Res.* 1992; 33:1753-1764.

Hofmann MA et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 1999; 97, 889–901.

Hu H, Pierce GN, Zhong G. The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to *Chlamydia pneumoniae*. *J. Clin. Invest.* 1999; 103, 747–753.

Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:373-98.

Hwang KK, Hall CS, Spielman WS, Sparks HV. FK506 promotes adenosine release from endothelial cells via inhibition of adenosine kinase. *Eur. J. Pharmacol.* 2001; 425, 85–93.

Ignatowski AC. Influence of animal food on the organism of rabbits. S Peterb Izviest ImpVoyenno-Med. Akad 1908; 16: 154-173.

Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, et al. Hypercholesterolemia in Low Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice and its Reversal by Adenovirus-mediated Gene Delivery. J Clin Investigation 1993; 92: 883-893.

Janeway CA. Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu. Rev. Immunol. 2002; 20, 197–216.

Jin X, Shepherd RK, Duling BR, Linden J. Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. J. Clin. Invest. 1997; 100, 2849–2857.

Khoa ND, Montesinos MC, Reiss AB, Delano D, et al. Inflammatory cytokines regulate function and expression of adenosine A2A receptors in human monocytic THP-1 cells. J. Immunol. 2001; 167, 4026–4032.

Kita T, Goldstein JL, Brown MS, Watanabe Y, et al. Hepatic uptake of chylomicron remnants in WHHL rabbits: a mechanism genetically distinct from the low density lipoprotein receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1982; 79:3623-3627.

Krieger MH, Santos KF, Shishido SM, Wanschel AC, et al. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. Nitric Oxide. 2006; 14(1):12-20.

Kwak BR, Veillard N, Pelli G, Mulhaupt F, et al. Reduced Connexin43 Expression Inhibits Atherosclerotic Lesion Formation in Low-Density Lipoprotein Receptor–Deficient Mice. Circulation 2003; 107: 1033 – 1039.

Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. Nat. Rev. Immunol. 2002; 2, 787–795.

Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 2003;14:421-430.

Lennon PF, Taylor CT, Stahl GL, Colgan SP. Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J. Exp. Med.* 1998; 188, 1433–1443.

Libby, P. Changing concepts of atherogenesis. *J. Intern. Med.* 1999; 247, 349–358.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868–874.

Link AA, Kino T, Worth JA, McGuire JL, et al. Ligand-activation of the adenosine A2A receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J. Immunol.* 2000; 164, 436–442.

Lusis AJ, Weinreb A, Drake TA. in *Textbook of Cardiovascular Medicine* (ed. Topol, E. J.) 2389–2413 (Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998).

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407: 233–241.

Majumdar S, Aggarwal BB. Adenosine suppresses activation of nuclear factor-kB selectively induced by tumor necrosis factor in different cell types. *Oncogene* 2003; 22, 1206–1218.

Marin RM, Franchini KG. Reduced oxygen supply explains the negative force-frequency relation and the positive inotropic effect of adenosine in buffer-perfused hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Jul;289(1):H131-6.

Martin C, Leone M, Viviani X, Ayem ML, et al. High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock. *Crit. Care Med.* 2000; 28, 3198–3202.

Mayne M, Fotheringham J, Yan HJ, Power C, et al. Adenosine A2A receptor activation reduces proinflammatory events and decreases cell death following intracerebral hemorrhage. *Ann. Neurol.* 2001; 49, 727–735.

Mehrabian M, Wen PZ, Fisler J, Davis RC, et al. Genetic loci controlling body fat, lipoprotein metabolism, and insulin levels in a multifactorial mouse model. *J. Clin. Invest.* 1998; 101, 2485–2496.

Montesinos MC, Gadangi P, Longaker M, Sung J, et al. Wound healing is accelerated by agonists of adenosine A₂ (G a s-linked) receptors. *J. Exp. Med.* 1997; 186, 1615–1620.

Montesinos MC, Yap JS, Desai A, Posadas I, et al. Reversal of the antiinflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists theophylline and caffeine. Evidence that the anti-inflammatory effects of methotrexate are mediated via multiple adenosine receptors in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43, 656–663.

Montesinos MC, Desai A, Delano D, Chen JF, et al. Adenosine A_{2A} or A₃ receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. *Arthritis Rheum.* 2003 48, 240–247.

Moore RE, Kawashiri M, Secreto A, Millar JS, et al. Apolipoprotein A-I deficiency results in markedly increased atherosclerosis in mice lacking the LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1914–1920.

Moultan KS, Folkman J. in *Molecular Basis of Cardiovascular Disease* (ed. Chien, K. R.) 393–410(Saunders, Philadelphia, 1999).

Nathan, L. & Chaudhuri, G. Estrogens and atherosclerosis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997; 37, 477–515.

Negoro N et al. Blood pressure regulates platelet-derived growth factor A-chain gene expression in vascular smooth muscle cells in vivo. An autocrine mechanism promoting hypertensive vascular hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 1995; 95, 1140–1150.

Nemeth ZH, Leibovich SJ, Deitch EA, Vizi ES, et al. cDNA microarray analysis reveals a NF- κ B independent regulation of macrophage function by adenosine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003; 306, 1042–1049.

Nesher G, Mates M, Zevin S. Effect of caffeine consumption on efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003; 48, 571–572.

Newby AC. Adenosine and the concept of retaliatory metabolites. *Trends Biochem. Sci.* 1984; 9, 42–44.

Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2000; 414, 916–920.

Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, et al. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*. 1987 Dec; 68(3):231-40.

Palinski W, Tangirala RK, Miller E, Young SG, et al. Increased autoantibody titers against epitopes of oxidized LDL in LDL receptor-deficient mice with increased atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15: 1569–1576.

Panther E, Idzko M, Herouy Y, Rheinen H, et al. Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *FASEB J*. 2001; 15, 1963–1970.

Panther E, Corinti S, Idzko M, Herouy Y, et al. Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood* 2003; 101, 3985–3990.

Parolini C, Chiesa G, Gong E, Caligari S, et al. Apolipoprotein A-I and the molecular variant apoA-I(Milano): evaluation of the antiatherogenic effects in knock-in mouse model. *Atherosclerosis*. 2005 Dec;183(2):222-9.

Pastor-Anglada M, Casado FJ, Valdes R, Mata J, et al. Complex regulation of nucleoside transporter expression in epithelial and immune system cells. *Mol. Membr. Biol.*2001; 18, 81–85.

Pinhal-Enfield G, Ramanathan M, Hasko G, Vogel SN, et al. An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A2A receptors. *Am. J. Pathol.* 2003; 163, 711–721.

Pompili VJ, Gordon D, San H, Yang Z, et al. Expression and function of a recombinant PDGF B gene in porcine arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995 Dec; 15(12):2254-64.

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 1989; 50, 413–492.

Ramkumar V, Stiles GL, Beaven MA, Ali H. The A3 adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J. Biol. Chem.* 1993; 268, 16887–16890.

Reardon CA, Blachowicz L, Lukens J, Nissenbaum M, et al. Genetic background selectively influences innominate artery atherosclerosis: immune system deficiency as a probe. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1449–1454.

Rocco SA, Barbarini JE, Rittner R. Syntheses of Some 4-Anilinoquinazoline Derivatives. *Synthesis* 2004; 3,429.

Rose FR, Hirschhorn R, Weissmann G, Cronstein BN. Adenosine promotes neutrophil chemotaxis. *J. Exp. Med.* 1998; 167, 1186–1194.

Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362, 801–809.

Ross R. Rous-Whipple Award Lecture. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. *Am J Pathol.* 1993 Oct; 143(4):987-1002.

Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115–126.

Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, et al. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature* 1991; 353:265-267.

Rubinsztein DC, Cohen JC, Berger GM, Van der Westhuyzen DR, et al. Chylomicron remnant clearance from the plasma is normal in familial hypercholesterolemic homozygotes with defined receptor defects. *J. Clin. Invest.* 1990; 86:1306-1312.

Sajjadi FG, Takabayashi K, Foster AC, Domingo RC, et al. Inhibition of TNF-alpha expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors. *J. Immunol.* 1996; 156, 3435–3442.

Salvatore CA, Tilley SL, Latour AM, Fletcher DS, et al. Disruption of the A3 adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *J. Biol. Chem.* 2000; 275, 4429–4434.

Schonbeck U et al. CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am. J. Pathol.* 2000; 156, 7–14.

Schönbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, et al. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000; 97, 7458–7463.

Scott GS , Spitsin SV, Kean RB, Mikheeva T, et al. Therapeutic intervention in experimental allergic encephalomyelitis by administration of uric acid precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002; 99, 16303–16308.

Scott J. The molecular and cell biology of apolipoprotein-B. *Mol.Biol. Med.* 1989; 6:65-80.

Sehayek E, Ono JG, Duncan EM, Batta AK, et al. Hyodeoxycholic acid efficiently suppresses atherosclerosis formation and plasma cholesterol levels in mice. *J Lipid Res.* 2001; 42: 1250–1256.

Shih DM et al. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 2000; 276, 17527–17535.

Shih PT et al. Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. *Circ. Res.* 1998; 84, 345–351.

Silke, C. et al. The effects of caffeine ingestion on the efficacy of methotrexate. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40, 34.

Skålén K, Gustafsson M, Rydberg EK, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 2002;417:750-754.

Smith JD et al. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1995; 92, 8264–8268.

Smith SR, Denhardt G, Terminelli C. A role for histamine in cytokine modulation by the adenosine A(3) receptor agonist, 2-CI-IB-MECA. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 457, 57–69.

Smithies O, Maeda N. Gene targeting approaches to complex diseases: atherosclerosis and essential hypertension. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1995; 92, 5266–5272.

Sottofattori E, Anzaldi M, Ottonello L. HPLC determination of adenosine in human synovial fluid. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001; 24, 1143–1146.

Sperlagh B, Doda M, Baranyi M, Hasko G. Ischemic-like condition releases norepinephrine and purines from different sources in superfused rat spleen strips. *J. Neuroimmunol.* 2000; 111, 45–54.

Steinberg, D. & Witztum, J. L. in *Molecular Basis of Cardiovascular Disease* 1999; 458–475.

Streblow DN et al. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell* 1999; 99, 511–520.

Sullivan GW, Linden J, Buster BL, Scheld WM. Neutrophil A2A adenosine receptor inhibits inflammation in a rat model of meningitis: synergy with the type IV phosphodiesterase inhibitor, rolipram. *J. Infect. Dis.* 1999; 180, 1550–1560.

Suzuki H et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 1997; 386, 292–296.

Szabo C, Scott GS, Virag L, Egnaczyk G, et al. Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonists. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 125, 379–387.

Tamminen M, Mottino G, Qiao JH, Breslow J L, et al. Ultrastructure of early lipid accumulation in apoE-deficient mice. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 1998; 19, 847–853 (1999).

Thibault N, Burelout C, Harbour D, Borgeat P, et al. Occupancy of adenosine A2A receptors promotes fMLP-induced cyclic AMP accumulation in human neutrophils: impact on phospholipase D activity and recruitment of small GTPases to membranes. *J. Leukoc. Biol.* 2002; 71, 367–377.

Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JL, Thomazy VA, et al. PPAR gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998; 93, 241–252.

Trogan E, Fayad ZA, Itskovich VV, Aguinaldo JG, et al. Serial studies of mouse atherosclerosis by in vivo magnetic resonance imaging detect lesion regression after correction of dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Sep; 24(9):1714-9.

Van't Hooft FM, Hardman DA, Kane JP, Havel RJ. Apolipoprotein B (B-48) of rat chylomicrons is not a precursor of the apolipoprotein of low density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982; 79:179-182.

Wakai A, Wang JH, Winter DC, Street JT, et al. Adenosine inhibits neutrophil vascular endothelial growth factor release and transendothelial migration via A2B receptor activation. *Shock* 2001; 15, 297–301.

Waltenberger J. Modulation of growth factor action: implications for the treatment of cardiovascular diseases. *Circulation.* 1997 Dec 2; 96(11):4083-94.

Xaus J, Mirabet M, Lloberas J, Soler C, et al. IFN-gamma up-regulates the A2B adenosine receptor expression in macrophages: a mechanism of macrophage deactivation. *J. Immunol.* 1999; 162, 3607–3614.