

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

**BIANCA DE PAULA E RODRIGUES**

**EFEITO DO SILDENAFIL NA GENOTOXICIDADE INDUZIDA PELO  
ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS**

**Vitória  
2013**

**BIANCA DE PAULA E RODRIGUES**

**EFEITO DO SILDENAFIL NA GENOTOXICIDADE INDUZIDA PELO  
ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.  
Orientador: Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez

**Vitória  
2013**

À minha mãe e à minha irmã que são as pessoas mais importantes da minha vida, e me ensinaram a definir metas e ser perseverante, sem dúvida foram essenciais para que esse sonho se tornasse possível.

Essa vitória também é de vocês!

## AGRADECIMENTOS

Ao Deus imutável em quem deposito toda a minha confiança.

À minha mãe, que me ensinou o valor do estudo e tanto se sacrificou para que eu pudesse chegar até aqui e ao meu pai (*in memoriam*), que acreditou e investiu no meu futuro.

À minha irmã, amiga fiel, que sempre me apoiou, incentivou e lutou junto comigo para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Aos meus sobrinhos pelo amor e ao meu cunhado pela amizade indispensáveis. Aos meus tios e primos queridos pelo apoio e incentivo, em especial ao meu tio Luis Felipe pelo exemplo profissional que me estimulou a seguir essa carreira.

Aos amigos mais do que especiais que sempre caminharam comigo em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez que me concedeu a honra de ser meu orientador, uma pessoa de conhecimento e generosidade imensuráveis e que me proporcionou uma experiência enriquecedora. Sou extremamente grata pela confiança.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvana dos Santos Meyrelles por ter me recebido em seu laboratório, pela confiança, incentivo, apoio e sugestões.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bianca Prandi Campagnaro pela atenção e generosidade em me ensinar e pelo incentivo a prosseguir buscando sempre novos conhecimentos.

Ao CNPq pela bolsa concedida e a FAPES, CAPES e FACITEC pelo apoio financeiro para execução deste projeto.

Aos amigos do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular que se tornaram uma família maravilhosa para mim.

*"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."*

**GALILEU GALILEI**

## RESUMO

Na aterosclerose ocorre aumento de agentes genotóxicos endógenos, como espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem causar danos oxidativos ao DNA. Sabe-se que o sildenafil, inibidor da fosfodiesterase 5 (PDE5), apresenta efeito antioxidante, diminuindo o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica. O objetivo do presente estudo foi analisar o efeito do tratamento crônico com sildenafil sobre a genotoxicidade causada pelo estresse oxidativo em células mononucleares (MNC) do sangue e células hepáticas de camundongos ateroscleróticos apoE *knockout* (apoE<sup>-/-</sup>). Foram utilizados camundongos machos apoE<sup>-/-</sup> com 8 semanas de idade que receberam dieta aterogênica até a 18<sup>o</sup> semana de vida. Com 15 semanas de idade os animais foram divididos em dois grupos: tratado com veículo (apoE<sup>-/-</sup> veículo, n=14) ou sildenafil (Viagra®; 40 mg/Kg/dia; apoE<sup>-/-</sup> sildenafil, n=18), por gavagem. Animais da linhagem C57Black/6 *wild-type* (WT, n=16) foram submetidos ao mesmo protocolo que os animais do grupo apoE<sup>-/-</sup> veículo, exceto pela administração da dieta. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados, as MNC isoladas utilizando gradiente de densidade e células hepáticas extraídas através de ação enzimática. Para análise do estresse oxidativo 10<sup>6</sup> MNC foram diluídas em PBS e incubadas com 160 µM de DHE por 30 minutos a 37°C no escuro e, depois lavadas e ressuspendidas em 0,5 ml de PBS-iSFB. As amostras foram mantidas em gelo até o momento da aquisição dos dados pelo citômetro de fluxo FACSCanto II. Em cada experimento foram avaliadas 30.000 células. A análise de genotoxicidade foi realizada utilizando o ensaio do cometa alcalino que consiste em obter, a partir de células individuais, uma matriz com um halo fluorescente no formato de um cometa correspondendo à quantidade de DNA fragmentado. Foi avaliada a extensão das rupturas das hélices do DNA com método de intensificação de imagem, em 100 células escolhidas aleatoriamente de cada animal. Os parâmetros analisados foram a porcentagem de DNA na cauda (*% tail DNA*) e o momento da cauda (*tail moment*). Além disso, foi realizada a quantificação de cometas com mais de 25% de DNA na cauda (nível moderado-elevado de fragmentação) entre os grupos. Os dados estão expressos como média±EPM. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* de Bonferroni, adotando o nível de significância de 5%. A análise por citometria de fluxo mostrou um aumento de 78% na produção de ânion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) nas MNC de

animais apoE<sup>-/-</sup> veículo quando comparados aos animais WT, e o tratamento com sildenafil diminuiu os níveis de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> nos animais apoE<sup>-/-</sup> próximo aos níveis do controle. Todos os parâmetros utilizados para investigar o dano ao DNA (*%tail DNA*, *tail moment* e quantidade de cometas com nível moderado-elevado de dano) demonstraram um aumento da fragmentação do DNA tanto em MNC quanto em células hepáticas dos animais apoE<sup>-/-</sup> veículo quando comparados aos animais WT, sendo que o tratamento com sildenafil foi capaz de diminuir esses valores para os níveis observados no controle. Nossos resultados sugerem que a aterosclerose aumenta a produção de ROS levando ao estresse oxidativo. Assim, as ROS interagem com o DNA das células, fragmentando-o. Sendo que o tratamento com o sildenafil foi capaz de reduzir os níveis de produção de ROS e, conseqüentemente, diminuir o dano ao DNA. Estes resultados são inéditos na literatura e devem contribuir de maneira relevante na busca de novas terapias de prevenção e tratamento da aterosclerose e suas conseqüências.

Palavras-chaves: Camundongos apoE<sup>-/-</sup>, aterosclerose, sildenafil, estresse oxidativo, dano ao DNA, ensaio do cometa.

## ABSTRACT

It is well known that enhanced production of reactive oxygen species (ROS) leads to oxidative stress observed in atherosclerosis and that ROS can also cause damage in cellular macromolecules, including DNA. Considering previous report that sildenafil, an inhibitor of phosphodiesterase 5 (PDE5), have antioxidant effects, in the present study we evaluated the effect of this drug on genotoxicity of blood mononuclear cells (MNC) and liver cells from atherosclerotic apolipoprotein E knockout mice (apoE<sup>-/-</sup>). To accelerate and aggravate the spontaneous hyperlipidemia and atherosclerosis in apoE<sup>-/-</sup> mice, 8-week-old animals were fed a Western-type diet. Animals were randomly distributed into three different groups: (a) apoE<sup>-/-</sup> mice administered with the PDE5 inhibitor sildenafil (apoE<sup>-/-</sup> sildenafil, Viagra<sup>®</sup>, 40 mg/kg/day, for 3 weeks, by oral gavage, n=18), (b) apoE<sup>-/-</sup> mice administered with vehicle (apoE<sup>-/-</sup> vehicle, n=14) and (c) Wild-type C57Black/6 mice (WT, n=16). Then, animals (18-week-old) were euthanized and MNC isolated by density gradient and liver cells extracted by enzymatic action. Oxidative stress was determined by superoxide anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) production using DHE probe.  $10^6$  cells were diluted with 1mL PBS and incubated with 160  $\mu\text{M}$  DHE for 30 min at 37°C in the dark, then washed and resuspended in 0.5ml of PBS-iFBS. A FACSCanto II cytometer was used for the flow cytometric analysis. Measurements were performed in triplicate and 10,000 events were used for each measurement. The genotoxicity analysis was performed using the alkaline comet assay that consists to obtain from individual cells, an array with a fluorescent halo in the format of a comet corresponding to the quantity of the fragmented DNA. The DNA helices ruptures extensions were evaluated by the image intensification method, where 100 cells were randomly selected (50 in each slide) using the analysis program CASP. The measurements of the comets were obtained by the parameters of the tail moment and percentage tail DNA. In addition, comets with more than 25% DNA in the tail (damage level moderate-high) were quantified between groups. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis were performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test ( $p < 0.05$ ). Flow cytometric analysis showed a significant increase (78%) in superoxide anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) production in apoE<sup>-/-</sup> vehicle mice MNC compared to WT and treatment with sildenafil decreases the levels of  $\bullet\text{O}_2^-$  in animals apoE<sup>-/-</sup>. In the DNA damage analysis all parameters used (%tail DNA, tail moment and number of comets with damage level



moderate-high) showed an increase in the DNA fragmentation in both MNC and liver cells of animals apoE<sup>-/-</sup> vehicle when compared to WT control, and sildenafil-administered apoE<sup>-/-</sup> mice exhibited minimal DNA damage in those cells similar to WT mice. Our data shows that atherosclerosis increases ROS production leading to oxidative stress. Apparently, increased ROS interact with the DNA leading to fragmentation and, interestingly, the treatment with sildenafil was able to reduce ROS production inhibiting DNA damage. The novelty of this study is that sildenafil may offer a new perspective to the use of PDE5 inhibitors to protect against DNA damage, in cells involved in the inflammatory and dyslipidemic processes that accompany atherosclerosis.

Keywords: ApoE<sup>-/-</sup> mice, atherosclerosis, sildenafil, oxidative stress, DNA damage, comet assay

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
<b>Figura 1:</b> Inflamação.	18
<b>Figura 2:</b> Formação das células-espumosas.	19
<b>Figura 3:</b> Formação da placa fibrosa.	20
<b>Figura 4:</b> Esquema hipotético ilustrando o papel de ROS e diminuição da biodisponibilidade de NO• na disfunção vascular em condições de hipercolesterolemia e aterosclerose.	22
<b>Figura 5:</b> Ação do inibidor da fosfodiesterase 5 (sildenafil) sobre o GMPc.	24
<b>Figura 6:</b> Camundongo <i>Mus musculus</i> do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular da UFES.	31
<b>Figura 7:</b> Esquema de tratamento dos animais.	32
<b>Figura 8:</b> Medida do perfil lipídico.	32
<b>Figura 9:</b> Isolamento das MNC do sangue periférico de camundongos.	34
<b>Figura 10:</b> Isolamento das células do fígado de camundongos.	34
<b>Figura 11:</b> Contagem celular e análise de viabilidade em câmara de Neubauer.	36
<b>Figura 12:</b> Congelamento da amostra.	37
<b>Figura 13:</b> Citômetro de fluxo FACSCanto II e software FACSDiva.	38
<b>Figura 14:</b> Primeira camada de agarose.	39

<b>Figura 15:</b> Ensaio cometa.	42
<b>Figura 16:</b> Tabela de resultados fornecida pelo CASP.	43
<b>Figura 17:</b> Produção de ânion superóxido.	47
<b>Figura 18:</b> Gráfico da porcentagem de DNA na cauda.	49
<b>Figura 19:</b> Gráfico do momento da cauda.	50
<b>Figura 20:</b> Fotos de cometas.	51
<b>Figura 21:</b> Gráfico do número de cometas com dano moderado-elevado (>25% de DNA na cauda).	51
<b>Figura 22:</b> Esquema hipotético ilustrando as possíveis vias bioquímicas para a produção de NO• e outras ROS por células endoteliais.	55
<b>Figura 23:</b> Esquema hipotético ilustrando possíveis mecanismos que levam ao desacoplamento da eNOS.	56
<b>Figura 24:</b> Esquema hipotético ilustrando o papel da genotoxicidade induzida no desenvolvimento e progressão da aterosclerose e a inibição dessa via pelo sildenafil.	58
<b>Tabela 1:</b> Perfil lipídico plasmático.	45
<b>Tabela 2:</b> Contagem e viabilidade de MNC e células hepáticas	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

- apoE: apolipoproteína E
- apoE<sup>-/-</sup>: camundongo apoE *knockout*
- BD: Becton, Dickinson and Company
- CAT: catalase
- CEUA-EMESCAM: Comitê de Ética no Uso de Animais
- C57BL/6: camundongos da linhagem C57 black/6
- CML: células musculares lisas
- CPE: células progenitoras endoteliais
- DCV: doenças cardiovasculares
- DHE: dihidroetídio
- dL: decilitro
- DMSO: dimetil sulfóxido
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- eNOS: óxido nítrico sintase endotelial
- EPM: erro padrão da média
- *et al.*: *et alli* – e colaboradores
- FACS: separador celular ativado por fluorescência (fluorescence activated cell sorter)
- FGF: fator de crescimento derivado de fibroblastos
- GMPc: monofosfato cíclico de guanosina
- GSH-Px: glutationa peroxidase
- HDL: lipoproteínas de alta densidade
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio
- HONO<sub>2</sub>: ácido peroxinitroso
- IDL: lipoproteínas de densidade intermediária
- IL-1: interleucina 1
- iNOS: óxido nítrico sintase induzível
- L-arg: L-arginina
- LDL: lipoproteína de baixa densidade

- LMP: *Low Melting Point Agarose*
- LOO•: radical peroxila
- LTCC: Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular
- mg: miligrama
- MIF: mediana da intensidade de fluorescência
- mL: mililitro
- mm: milímetro
- MNC: células mononucleares
- µL: microlitro
- NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- NMP: *Normal Melting Point Agarose*
- NO<sub>2</sub>: dióxido de nitrogênio
- NO•: óxido nítrico
- O<sub>2</sub>: oxigênio molecular
- <sup>1</sup>O<sub>2</sub>: oxigênio *singlet*
- •O<sub>2</sub><sup>-</sup>: ânion superóxido
- •OH: radical hidroxila
- OMS: Organização Mundial da Saúde
- ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito
- oxNADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
- oxLDL: lipoproteína de baixa densidade oxidada
- p: significância estatística
- PBS: solução tampão fosfato salina (*Phosphate Buffered Saline*)
- PDE5: fosfodiesterase tipo 5
- PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
- rpm: rotações por minuto
- RPMI: meio de cultura desenvolvido por Moore et al. no Roswell Park Memorial Institute
- ROS: espécies reativas de oxigênio
- SBF: soro fetal bovino
- SOD: superóxido dismutase
- SUS: Sistema Único de Saúde

- TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa
- TRIS: tris(hidroximetil)aminometano
- UFES: Universidade Federal do Espírito Santo
- VCAM-1: moléculas de adesão celular-vascular-1
- VLDL: lipoproteínas de muito baixa densidade
- WT: *wild-type* (camundongos da linhagem C57BL/6)
- XO: xantina oxidase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 ATEROSCLEROSE .....	17
1.1.1 Epidemiologia.....	17
1.1.2 Aterogênese .....	18
1.1.3 Modelo experimental: apoE <i>knockout</i> .....	20
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO .....	21
1.3 TERAPIA ANTIOXIDANTE .....	23
1.3.1 Inibidor da fosfodiesterase tipo 5 .....	24
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	27
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	29
3.1 OBJETIVOS GERAIS .....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	31
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	31
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	31
4.3 MEDIDA DO PERFIL LIPÍDICO .....	32
4.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS .....	33
4.4.1 Isolamento de células mononucleares do sangue .....	33
4.4.2 Isolamento de células do fígado .....	33
4.5 CONTAGEM DE CÉLULAS NA CÂMARA DE NEUBAUER .....	35
4.6 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR .....	35
4.7 CRIOPRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	36
4.7.1 Congelamento .....	36
4.7.2 Descongelamento .....	37

4.8 MEDIDAS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	37
4.9 ENSAIO DO COMETA ALCALINO .....	38
<b>4.9.1 Preparo das lâminas</b> .....	39
<b>4.9.2 Lise, desenovelamento e eletroforese</b> .....	39
<b>4.9.3 Coloração e análise</b> .....	40
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	43
<b>5 RESULTADOS</b> .....	45
5.1 PERFIL LIPÍDICO .....	45
5.2 CONTAGEM E VIABILIDADE DAS CÉLULAS .....	45
5.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÂNION SUPERÓXIDO NAS CÉLULAS MONONUCLEARES .....	46
5.4 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE FRAGMENTAÇÃO NO DNA PELO ENSAIO DO COMETA .....	47
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	53
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	64
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	66



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ATEROSCLEROSE

### 1.1.1 Epidemiologia

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que as doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no mundo. Estima-se que, em 2008, morreu cerca de 17,3 milhões de pessoas, representando 30% de todas as mortes no mundo, sendo que 7,3 milhões dessas mortes foram devido à doença cardíaca coronária e 6,2 milhões foram por acidente vascular cerebral (1). As mortes por DCV afetam igualmente ambos os sexos, e mais de 80% ocorrem em países de baixa e média renda (1).

As DCV são responsáveis por 31% das mortes em mulheres e homens no Brasil, sendo considerada a principal causa de morte no país (2). Isso gera uma elevada taxa de internação, 30% das internações do Sistema Único de Saúde (SUS) são devido à DCV (2).

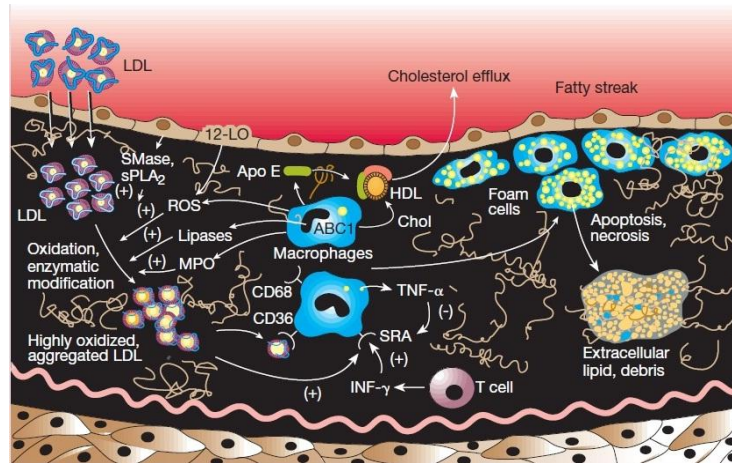
Os fatores de risco que ajudam a montar esse panorama são, principalmente, o tabagismo, hipertensão, *diabetes melitus*, obesidade e dislipidemias (3,4).

As DCV afetam o coração e as artérias, sendo que sua principal característica é a presença da aterosclerose (1). A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (5) e pode ser iniciada e/ou agravada pela hipercolesterolemia (6–8). Vários estudos demonstram que o desenvolvimento dessa doença é resultado de distúrbios metabólicos, estresse oxidativo e ação de mediadores pró-inflamatórios (8–10).

De acordo com as projeções da OMS, há uma tendência de elevação nas mortes causadas por DCV, agravando ainda mais esse quadro de morbidade e mortalidade (1). Assim sendo, estudos sobre a patogênese e formas de tratamento da aterosclerose são extremamente importantes para reverter esse quadro.

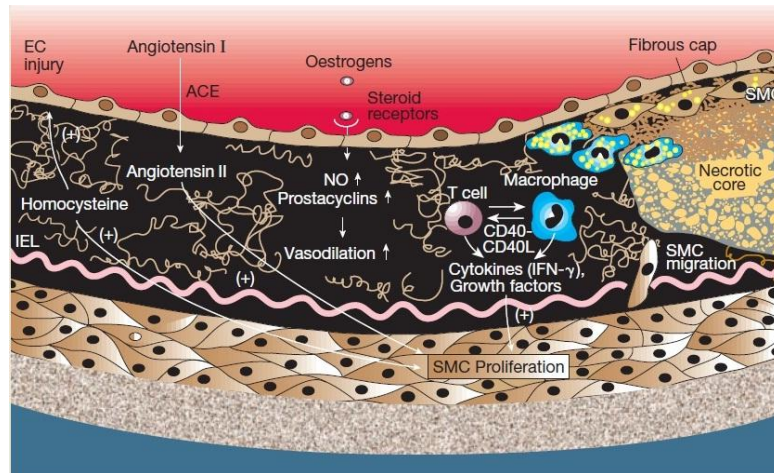


Na íntima os monócitos são transformados em macrófagos que possuem receptores especiais chamados *scavengers* (sequestradores) que fagocitam as moléculas de oxLDL originando as chamadas células espumosas, que são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (5,11,12) (figura 2).



**Figura 2:** Formação das células-espumosas: macrófagos fagocitam oxLDL (3).

Com a evolução da placa aterosclerótica, os macrófagos e os linfócitos T são estimulados a secretar alguns mediadores da inflamação como, por exemplo, interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que aumentam o recrutamento de leucócitos para o local da placa (3,11). Ocorre, também, a secreção de fatores do crescimento, como por exemplo, fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e de fibroblastos (FGF) que estimulam a migração e proliferação das células musculares lisas (CML) da camada média arterial para a íntima. Essas células passam a produzir não só citocinas e fatores de crescimento, como também matriz extracelular que formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica e a partir desse estágio a placa passa a ser considerada ateromatosa (5,11) (figura 3).



**Figura 3:** Formação da placa fibrosa: migração e proliferação de células musculares lisas, secreção de matriz extracelular (3).

### 1.1.3 Modelo experimental: apolipoproteína E *knockout*

Durante as últimas décadas, a compreensão dos mecanismos moleculares da aterogênese foi revolucionada por estudos em modelos animais, incluindo coelhos, porcos, primatas não humanos e roedores (3). O modelo murino para estudo da aterosclerose pela inativação do gene da apolipoproteína E (apoE) por recombinação homóloga desenvolve lesões avançadas e é um dos modelos mais utilizados em estudos genéticos e fisiológicos (8).

O processo de transporte dos lipídeos do intestino para os hepatócitos e entre estes e os tecidos periféricos é bastante dependente das apolipoproteínas, podendo na ausência destas haver um desequilíbrio impedindo a remoção das lipoproteínas-colesterol da circulação. Assim, qualquer mutação em uma apolipoproteína pode resultar em padrões lipoprotéicos anormais e contribuir para o aparecimento de doenças, como a aterosclerose (13,14).

A apoE é uma glicoproteína sintetizada, principalmente, no fígado e no cérebro e, sendo um componente das lipoproteínas, tem a função de retirar do plasma as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e de densidade intermediária (IDL) via receptor de LDL (15,16). A apoE é também sintetizada por monócitos e macrófagos nos vasos, e tem efeitos locais na homeostase do colesterol e em reações inflamatórias nos vasos ateroscleróticos (15).

A ausência da apoE impede que as lipoproteínas VLDL e IDL se liguem

aos receptores hepáticos e sejam retiradas da circulação (13,15). Dessa forma, observa-se um aumento nos níveis de VLDL no plasma e, conseqüentemente, de LDL. O camundongo apoE *knockout* (apoE<sup>-/-</sup>) apresenta níveis de colesterol plasmático 5-6 vezes maior que os camundongos controle da linhagem C57 black/6 (C57BL/6) (7,8,15,17). Assim como, nesses animais o uso de dieta do tipo ocidental (rica em lipídios) acelera a progressão da doença (8,15,18,19).

Considerando que camundongos apoE<sup>-/-</sup> e seres humanos possuem, com poucas exceções, o mesmo conjunto de genes responsáveis pelo controle do metabolismo de lipoproteínas, a utilização destes animais em estudos experimentais *in vivo* tem apresentado resultados importantes (13), contribuindo para o entendimento da aterogênese e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

## 1.2 ESTRESSE OXIDATIVO

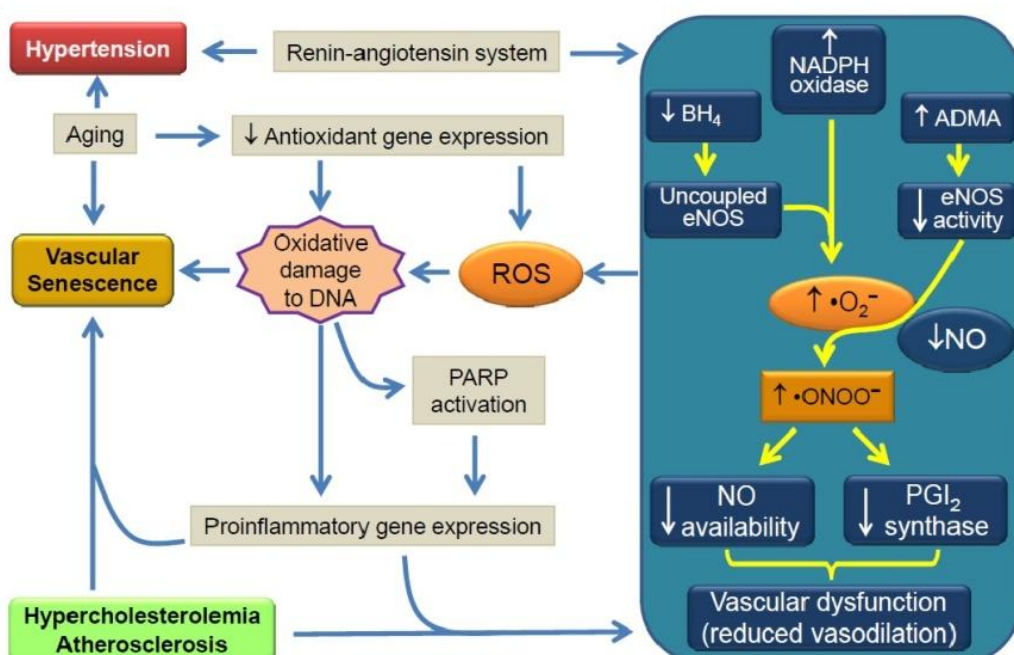
O estresse oxidativo é o resultado de um desequilíbrio entre moléculas antioxidantes e oxidantes, predominando a ação danosa das espécies reativas de oxigênio (ROS) sobre as células (20).

As ROS incluem os radicais livres, como o ânion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ), radicais hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) e peroxila ( $\text{LOO}\bullet$ ), bem como espécies não radicalares, como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e oxigênio *singlet* ( $^1\text{O}_2$ ). As ROS são produzidas continuamente na cadeia respiratória das mitocôndrias com a redução de um elétron do oxigênio molecular. A oxNADPH, xantina oxidase (XO), mieloperoxidase, cicloxigenase e lipoxigenase são grandes fontes enzimáticas de ROS em células de mamíferos (21).

Um dos mecanismos mais estudados na doença aterosclerótica está relacionado com a peroxidação lipídica. De acordo com a hipótese de modificação oxidativa a ativação das células inflamatórias durante a aterogênese resulta no aumento dos leucócitos no sangue, que liberam metabólitos do oxigênio, promovendo a oxidação da LDL acumulada na matriz subendotelial (3,11,22).

Outro mecanismo muito estudado nessa doença é o da biodisponibilidade do  $\text{NO}\bullet$ . Na aterosclerose o equilíbrio normal entre a formação de  $\text{NO}\bullet$  e outras

ROS é interrompido, pois a ativação das células inflamatórias durante a aterogênese promove um aumento na atividade dos complexos enzimáticos oxNADPH e XO, entre outros, levando ao aumento nos níveis de ROS (23,24, 25). Esse excesso de ROS promove o desacoplamento da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) o que resulta na diminuição da síntese de NO• e aumento da produção de  $\cdot\text{O}_2^-$  (26). Concomitantemente, essa superprodução de  $\cdot\text{O}_2^-$  também contribui para a diminuição da biodisponibilidade de NO•, pois reage com ele para formar ONOO<sup>-</sup>, um intermediário altamente reativo e prejudicial às biomoléculas (27) (figura 4).



**Figura 4:** Esquema hipotético ilustrando o papel de ROS e diminuição da biodisponibilidade de NO• na disfunção vascular em condições de hipercolesterolemia e aterosclerose (8).

Além disso, é razoável que o aumento da regulação dos sistemas antioxidantes, devido ao excesso de ROS, desencadeie um contínuo processo inflamatório, o que conduz a uma diminuição na capacidade antioxidante (21). Todo esse processo em conjunto promove um comprometimento da função endotelial, o que é um indicador precoce da aterosclerose.

Os altos níveis de ROS encontrados na aterosclerose são importantes mediadores de danos nos componentes celulares, tais como hidratos de carbono, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (28). Os radicais livres são

capazes de causar vários tipos de danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) (figura 4), os principais tipos são quebras de fitas simples ou duplas, modificação de bases, sítios abásicos, *crosslinks* de DNA com DNA e proteínas (29).

Portanto, o alto nível de ROS é um agente genotóxico devido a sua capacidade de causar danos, podendo alterar informações codificadas no DNA. A genotoxicidade ocorre quando a célula é exposta a um agente genotóxico, o que pode levar a alterações na estrutura ou no conteúdo de cromossomos (clastogenicidade) ou da sequência de pares de bases do DNA (mutagenicidade) (30). Desse modo, o aumento nos níveis de ROS pode levar a genotoxicidade, contribuindo, assim, para o agravamento da patogênese da aterosclerose.

Muitos estudos mostram a presença de danos na molécula de DNA tanto nos linfócitos da circulação quanto nas placas ateroscleróticas de indivíduos doentes (31,32). A maior parte dos danos é causada pelas ROS, o dano oxidativo ao DNA pode ocorrer de diferentes formas, causando oxidação de bases específicas ou quebras de cadeia (33), que conduz a instabilidade genômica e alterações permanentes no material genético.

Desta forma, em condições de aumento do estresse oxidativo, como observado na aterosclerose, um tratamento antioxidante pode ser conveniente para reduzir a produção de ROS, surgindo como uma alternativa útil para evitar o dano ao material genético.

### 1.3 TERAPIA ANTIOXIDANTE

Em condições fisiológicas existe um equilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos de defesas antioxidantes. Esse estado de equilíbrio protege os tecidos e líquidos corporais da lesão causada pelos oxidantes produzidos pelo metabolismo normal (34).

As defesas antioxidantes permitem ao organismo tolerar o estresse oxidativo leve e moderado. No entanto, na presença de alguma doença, como a aterosclerose, esse equilíbrio é interrompido, ocorrendo aumento do estresse oxidativo. Essa alteração no metabolismo do oxigênio pode levar a lesão ao DNA (8–10,35,36). Assim sendo, compostos com propriedades antioxidantes

podem prevenir a injúria causada pelas ROS na aterosclerose.

### 1.3.1 Inibidor da fosfodiesterase tipo 5

O sildenafil é uma droga vasoativa amplamente utilizada no tratamento de disfunção erétil e hipertensão pulmonar (34,37). Adicionalmente, um recente trabalho do nosso laboratório demonstrou que essa droga também tem a capacidade de restaurar a função endotelial (38).

Ele é um inibidor potente e seletivo da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), encontrada em CML dos corpos cavernosos do pênis, de vasos periféricos arteriais e venosos, bem como na circulação coronária e pulmonar, e nas plaquetas (39).

A PDE5 hidrolisa especificamente o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), e, conseqüentemente, sua inibição promove a diminuição da degradação desse nucleotídeo (34,38–40). Como os níveis de GMPc circulantes modulam a atividade endógena do NO• e conseqüentemente o tônus vascular, o seu aumento altera a sinalização mediada NO•/GMPc (34,37–39,41) (figura 5).

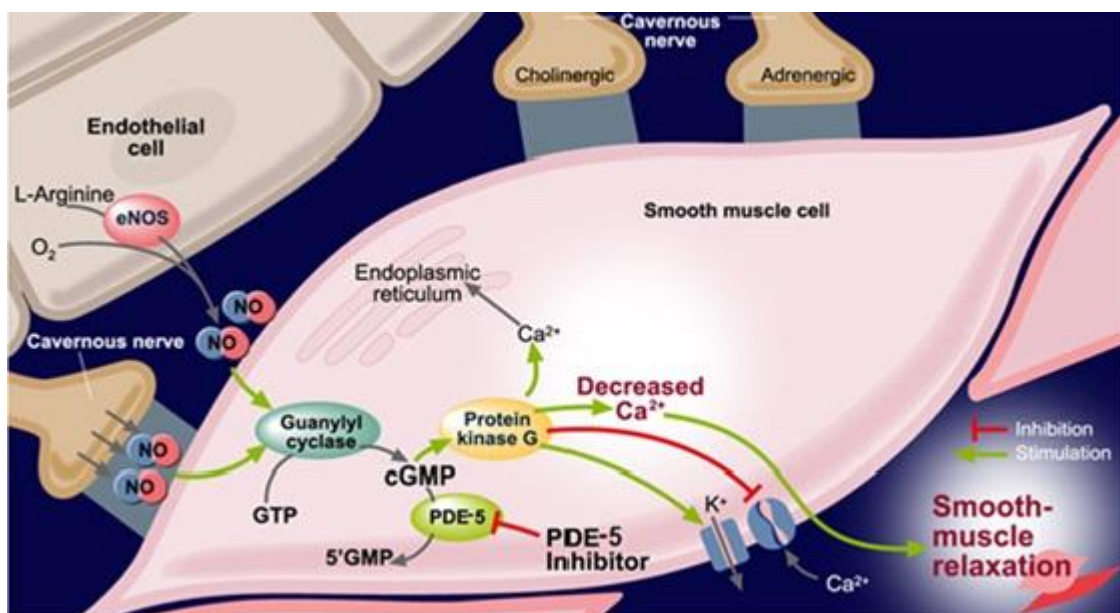


Figura 5: Ação do inibidor da fosfodiesterase 5 (sildenafil) sobre o GMPc (7).

Além da capacidade de restaurar a função endotelial (38) existem evidências experimentais de que o sildenafil pode diminuir o estresse oxidativo



e a peroxidação lipídica (20,34,39,40,42–44). Destarte, seria razoável propor seu uso para prevenir os prejuízos causados pelo aumento da produção de ROS. À vista disso, a hipótese desse trabalho é que o tratamento com sildenafil seja uma alternativa terapêutica promissora para impedir o dano ao DNA induzido pelas ROS na aterosclerose.

## 2 JUSTIFICATIVA

A aterosclerose é uma doença cardiovascular inflamatória cujo desenvolvimento é resultado de distúrbios metabólicos, estresse oxidativo e ação de mediadores pró-inflamatórios. O aumento na produção de ROS tem um papel importante na diminuição da biodisponibilidade de NO• e na disfunção vascular em condições de hipercolesterolemia e aterosclerose. E essa condição de estresse oxidativo pode causar danos em várias macromoléculas, incluindo o DNA.

Existem muitos estudos que investigam os danos oxidativos ao DNA relacionados à poluição, nutrição, drogas de abuso, entre outros, em células de órgãos ou tecidos específicos como rins, cérebro, pulmão, fígado e sangue, visto que o dano ao DNA causado pelo excesso de ROS é tecido-específico.

Entretanto, poucos estudos demonstram interesse em caracterizar os prejuízos de doenças com alto índice de morbi-mortalidade, como a aterosclerose, sobre o DNA, e, conseqüentemente, possíveis terapias protetoras. O dano ao DNA pode ser avaliado usando uma técnica extremamente sensível e versátil o ensaio do cometa alcalino, uma metodologia pouco difundida em fisiologia cardiovascular.

Portanto, existe uma grande necessidade de estudos que avaliem a genotoxicidade causada por doenças cardiovasculares, que atingem grande parte da população, bem como, possíveis terapias para a proteção contra o dano ao DNA.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVOS GERAIS**

Testar a hipótese de que o tratamento crônico com sildenafil diminui a genotoxicidade gerada pelo estresse oxidativo em camundongos ateroscleróticos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar se o tratamento com sildenafil interfere no perfil lipídico plasmático;
- Avaliar por meio da citometria de fluxo em MNC se o tratamento com sildenafil diminui a produção de ânion superóxido;
- Avaliar por meio do ensaio do cometa alcalino em MNC e do fígado se o tratamento com sildenafil reduz o dano oxidativo ao DNA.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados para as análises desse estudo 48 camundongos *Mus musculus* (figura 6), machos e isogênicos de um total de 71. Os animais provieram do biotério do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular (LTCC), pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Os animais foram mantidos em gaiolas, forradas com maravalha, substituída duas vezes por semana, acondicionadas em estantes ventiladas com exaustão contínua do ar (Alesco Indústria e Comércio Ltda, São Paulo). Durante os experimentos receberam água filtrada e ração *ad libitum*, em uma sala com temperatura a 22°C, umidade relativa controlada (60%) e ciclo de luz de 12 horas claro/escuro.

Os procedimentos empregados no estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-EMESCAM), protocolo nº 007/2010, estando de acordo com normas estabelecidas por entidades científicas nacionais e internacionais.

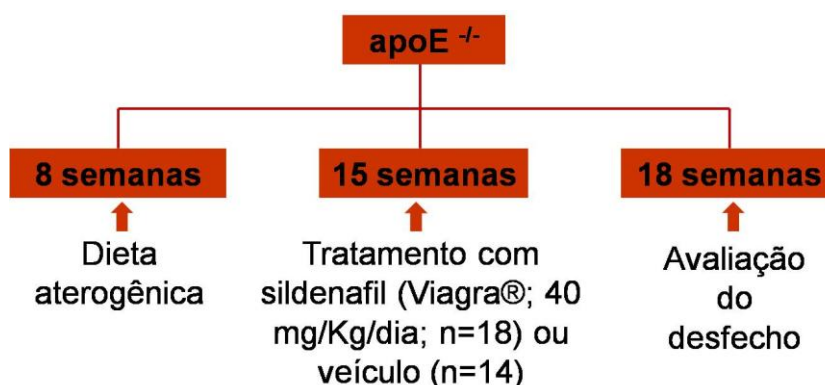


**Figura 6:** Camundongo *Mus musculus* do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular da UFES.

### 4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As linhagens usadas foram C57BL/6 *wild-type* (WT) e apoE<sup>-/-</sup>, com 8 semanas de vida. Para acelerar o processo de hiperlipidemia e aterosclerose espontânea os animais apoE<sup>-/-</sup> de 8 semanas de idade receberam dieta aterogênica (AIN93G dieta modificada, Rhoister, Brasil) até a 18ª semana de

vida. Com 15 semanas de idade os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: (a) apoE<sup>-/-</sup> tratado com o inibidor de PDE5 sildenafil (apoE<sup>-/-</sup> sildenafil, Viagra<sup>®</sup>, 40 mg/kg/dia, durante 3 semanas, por meio de gavagem oral; n=18), (b) apoE<sup>-/-</sup> tratado com o veículo (apoE<sup>-/-</sup> veículo, água, durante 3 semanas; n=14) e (c) C57 controle WT que não receberam a dieta e foram tratados com o veículo (n=16). A figura 7 representa o esquema de tratamento dos animais apoE<sup>-/-</sup>.



**Figura 7:** Esquema de tratamento dos animais

#### 4.3 MEDIDA DO PERFIL LIPÍDICO

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (100 mg/kg, IP) e as amostras de sangue obtidas por punção intracardíaca. O sangue foi imediatamente transferido para um tubo contendo ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA) e foi centrifugado a 2600 rpm durante 10 min para a separação do plasma. O colesterol plasmático total, lipoproteínas de alta densidade (HDL), LDL e triglicerídeos foram determinados através de kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil – figura 8). As VLDL e as IDL foram estimadas subtraindo HDL e LDL do colesterol plasmático total.



**Figura 8:** Medida do perfil lipídico: espectrofotômetro com detalhe dos kits Bioclin usados nos ensaios colorimétricos.

#### 4.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Os animais foram eutanasiados, com 18 semanas de idade, por overdose de anestésico (tiopental 100 mg/kg, IP). Foi realizada uma incisão torácica e as amostras de sangue foram retiradas através de punção intracardíaca e o sangue foi imediatamente transferido para um tubo contendo EDTA. Em seguida, foi realizada uma excisão abdominal para retirada do lobo esquerdo do fígado.

##### 4.4.1 Isolamento de células mononucleares do sangue

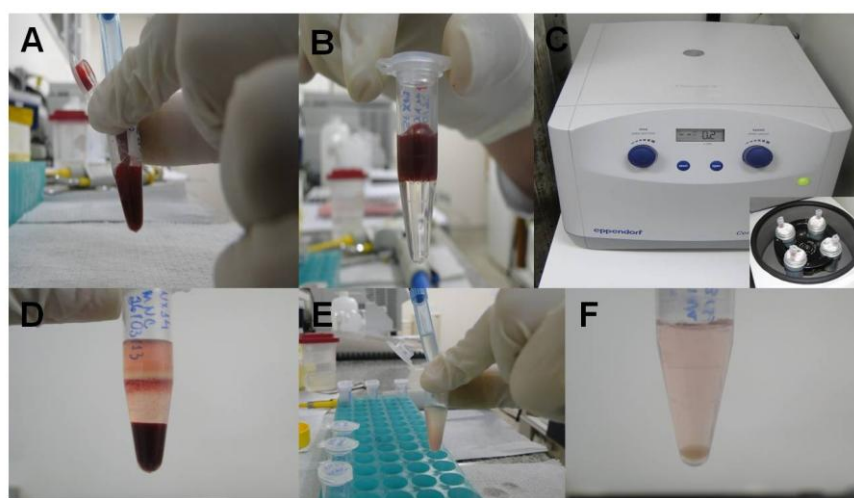
As MNC do sangue periférico foram isoladas através de gradiente de densidade. Cerca de 250  $\mu$ L de sangue foram diluídos numa proporção de 1:1 com meio de cultura (RPMI, Gibco **Life Technologies**, São Paulo, SP, Brasil) em seguida essa mistura foi colocada cuidadosamente em um tubo contendo 500  $\mu$ L de Histopaque®. Esse tubo foi centrifugado por 30 minutos a 2600 rpm. Após a centrifugação foi possível observar uma parte turva no tubo onde estavam contidas as MNC, que foram retiradas com auxílio de uma pipeta. Essas células foram transferidas para outro tubo onde se adicionou 1000  $\mu$ L de RPMI, essa amostra foi centrifugada por 30 minutos a 2600 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com 1000  $\mu$ L de RPMI, esse processo foi repetido por mais uma vez. Por fim, o sobrenadante foi novamente descartado e as células foram ressuspensas em 1000  $\mu$ L de solução tampão fosfato salina (PBS) livre de cálcio e magnésio, e uma alíquota separada para contagem em câmara de Neubauer. As etapas do isolamento das MNC estão representadas na figura 9.

##### 4.4.2 Isolamento de células do fígado

As frações enriquecidas com células do fígado foram preparadas como padronizado em nosso laboratório com base em protocolos de trabalhos anteriores (19,35,45).

O lobo esquerdo do fígado foi grosseiramente triturado com tesoura cirúrgica e incubado a 37°C por 30 minutos com uma solução de extração

contendo proteinase K (0,1% m/v - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e colagenase tipo II (0,2% m/v - Gibco) dissolvidas em PBS para dissociar as células. Em seguida, o extrato celular foi filtrado através de uma tela de nylon (BD Falcon 70  $\mu$ m, San Jose, Califórnia, EUA) para remover os detritos celulares. Além disso, as amostras foram lavadas duas vezes em solução de PBS, através de centrifugação (10 minutos a 2600 rpm), para remover as enzimas. A amostra foi, finalmente, ressuspensa com 1000  $\mu$ L de PBS e uma alíquota separada para contagem em câmara de Neubauer. As etapas da extração das células do fígado estão representadas na figura 10.



**Figura 9:** Isolamento das MNC do sangue periférico de camundongos: diluição e homogeneização do sangue (A), sangue e Histopaque® (B), centrifugação e no detalhe o rotor *swing bucket* (C), nuvem com MNC (D), lavagem das MNC (E), MNC (F).



**Figura 10:** Isolamento das células do fígado de camundongos: trituração e adição da solução de extração no fígado (A), estufa (B), filtragem do homogenato em tela de nylon (C), lavagem das células do fígado (D), centrifugação (E), células do fígado (F).

#### 4.5 CONTAGEM DE CÉLULAS NA CÂMARA DE NEUBAUER

Para determinação do número de células obtidas, foi realizada uma diluição de 1:10 (v/v) da suspensão celular em PBS. Em seguida uma alíquota dessa solução foi diluída 1:2 (v/v) em solução de Turck (ácido acético 2% com azul de metileno), e uma alíquota desta última solução foi novamente diluída 1:2 (v/v) em solução de azul de tripano 0,4%. A solução (células/Turck/tripano) foi homogeneizada e colocada em um lado da câmara de Neubauer (figura 11A) para contagem com auxílio de um microscópio óptico (Nikon Eclipse Ti, Melville, Nova York, EUA) no aumento de 40x (figura 11B). As células são contadas nos quatro quadrantes externos da câmara seguindo sempre a mesma direção e usando o esquema do “L” para que a mesma célula não seja contada duas vezes (figura 11B). Portanto, as células que estavam sobre as linhas de baixo e da direita não eram contadas. A equação usada para determinar o número de células por mililitro foi:

$$QC = FD \times 10^4 \times 1 \text{ mL} \times \frac{N^\circ \text{ de células}}{4}$$

Onde,

FD = fator de diluição (40x)

$10^4$  = fator de correção da câmara de Neubauer

1 mL = volume da amostra

$\frac{N^\circ \text{ de células}}{4}$  = média do número de células contadas

A contagem foi realizada pelo mesmo observador de forma cega, sendo que foram realizadas três contagens independentes e foi tirada a média destas três contagens.

#### 4.6 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

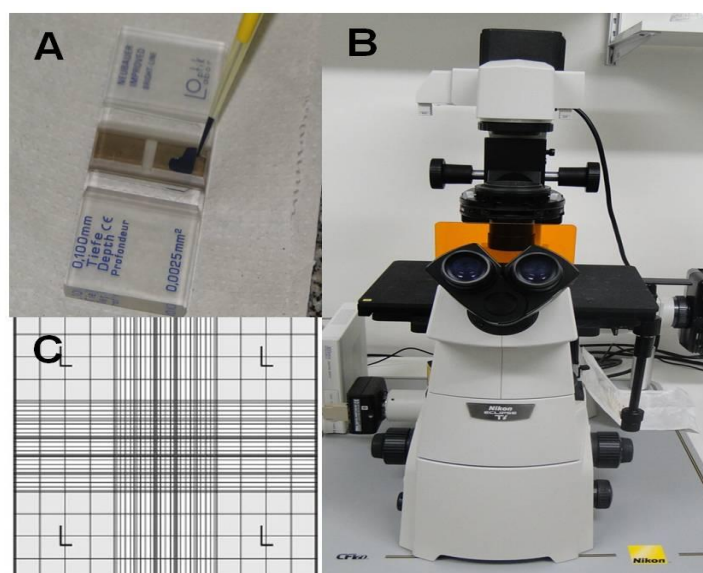
A viabilidade celular foi avaliada através do método de exclusão do corante azul de tripano durante a contagem celular em câmara de Neubauer. Neste método as células mortas se coram de azul, pois sua membrana é permeável ao corante, enquanto que a membrana das células vivas não. Assim,



ao visualizar as células no microscópio é possível observar que as células mortas são azuis e as vivas transparentes. O cálculo do percentual das células viáveis foi feito de acordo com a equação abaixo, onde a média das células vivas foi dividida pela média total das células (vivas e mortas) contadas na câmara de Neubauer multiplicado por 100:

$$\text{Viabilidade} = \frac{\text{Células vivas}}{\text{Total de células}} \times 100$$

Para proceder ao ensaio do cometa alcalino a viabilidade celular deve ser maior que 70%, mostrando que o procedimento utilizado não causou danos exagerados às células.



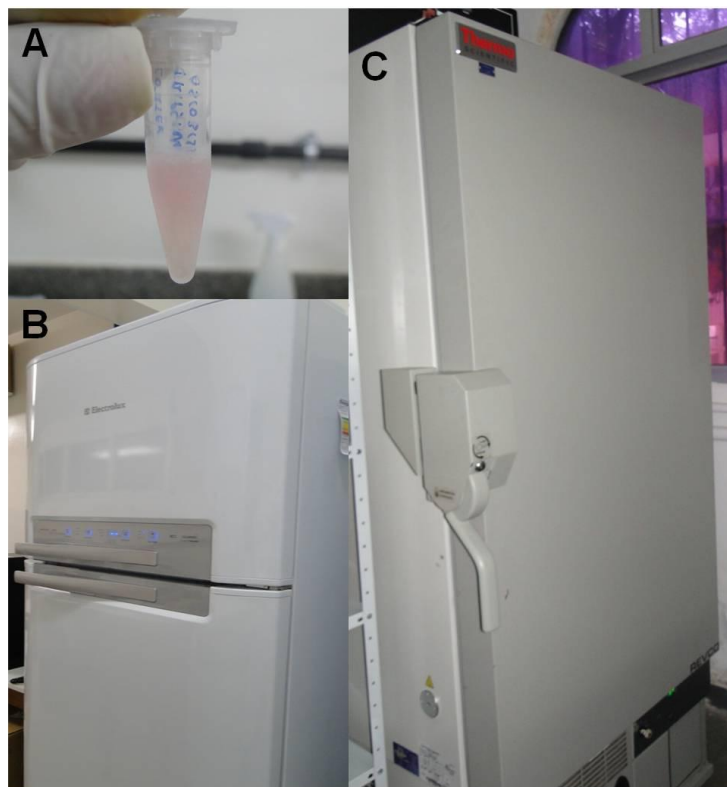
**Figura 11:** Contagem celular e análise de viabilidade em câmara de Neubauer: suspensão de células misturada com azul de tripano (A), a análise foi feita em microscópio óptico (B), no aumento 40x, as células foram contadas nos quatro quadrantes externos da câmara (C).

## 4.7 CRIOPRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

### 4.7.1 Congelamento

Após a contagem tanto as amostras de MNC quanto células hepáticas foram centrifugadas a 2600 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Em seguida as amostras para o ensaio cometa foram ressuspensas em 50% de RPMI, 40% de soro fetal bovino (SFB; Gibco)

e 10% de dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich) (figura 12A). As amostras de MNC para citometria de fluxo foram ressuspensas em 95% SFB (Gibco) e 5% de DMSO (Sigma-Aldrich). Os tubos contendo as amostras foram levados à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24 horas (figura 12B) e depois armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da execução do teste (figura 12C).



**Figura 12:** Congelamento da amostra: suspensão de células em solução de armazenamento (A), freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  (B), freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  (C).

#### 4.7.2 Descongelamento

As células foram retiradas do freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  e deixadas por alguns minutos à temperatura ambiente, sob proteção contra a luz, para que descongelassem. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2600 rpm por 10 minutos o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1000  $\mu\text{L}$  de PBS.

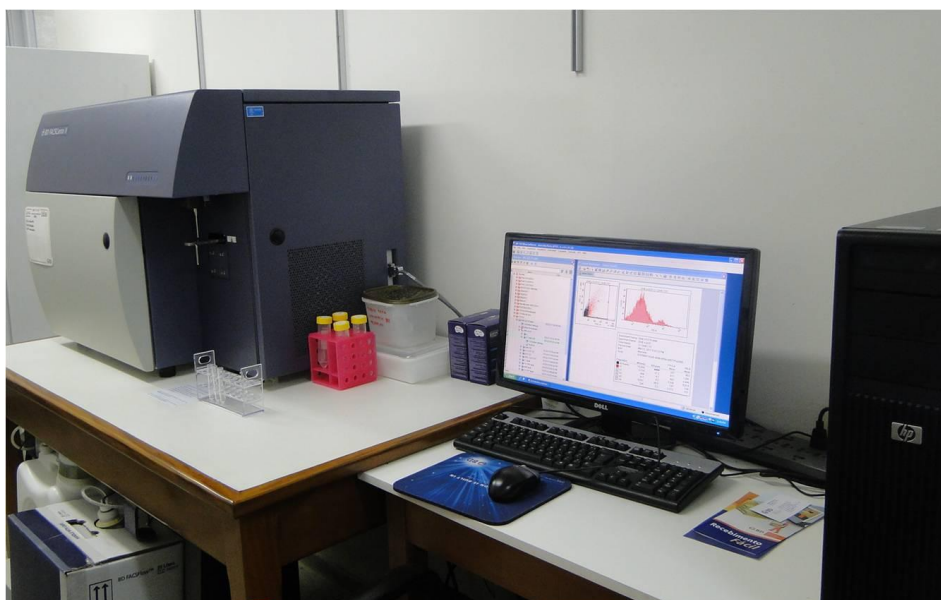
#### 4.8 MEDIDAS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR CITOMETRIA DE FLUXO

A medida de ROS foi realizada utilizando o dihidroetítdeo (DHE) que

detecta o  $\bullet\text{O}_2^-$  intracelular. O DHE é permeável a células e é, em sua maior parte, rapidamente oxidado pelo  $\bullet\text{O}_2^-$ . O etídeo se liga ao DNA e amplifica o sinal de fluorescência vermelha.

Para estimar o conteúdo de  $\bullet\text{O}_2^-$  na suspensão de células, foram incubadas  $10^6$  MNC com 20  $\mu\text{L}$  de DHE (160  $\mu\text{M}$ ) durante 30 min a 37°C no escuro para corar as células. Para o controle positivo, as amostras foram tratadas durante 5 min com 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para aumentar o estresse oxidativo, sem ser tóxico para as células, enquanto que para o controle negativo as células foram incubadas com etanol. As células foram então lavadas, ressuspensas em PBS e mantidas em gelo até a aquisição dos dados por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Juan, Califórnia, EUA). Os dados foram analisados utilizando o *software* FACSDiva (Becton Dickinson) (figura 13).

Para a quantificação da fluorescência decorrente da oxidação do DHE, as amostras foram analisadas em triplicata, sendo que 10.000 eventos foram utilizados para cada mensuração. As células foram excitadas a 488 nm e a fluorescência foi detectada utilizando filtro 585/42. Os dados foram expressos como mediana da intensidade de fluorescência (MIF).



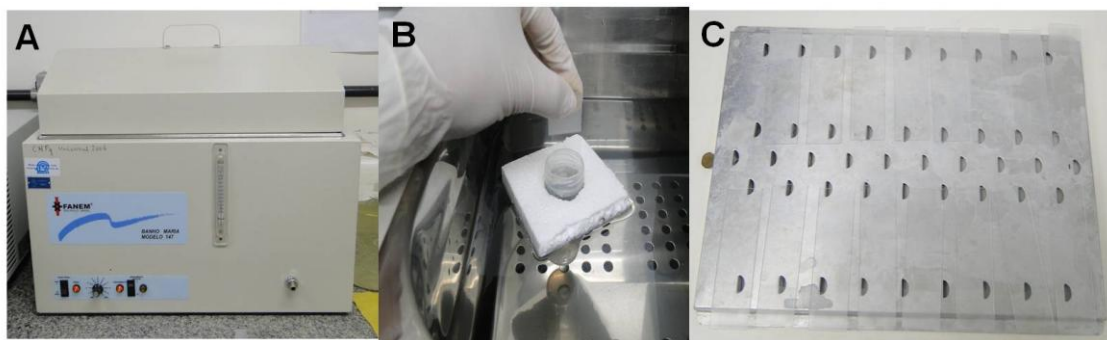
**Figura 13:** Citômetro de fluxo FACSCanto II e software FACSDiva.

## 4.9 ENSAIO DO COMETA ALCALINO

O dano ao DNA foi analisado utilizando eletroforese em gel de célula única (ensaio do cometa) sob condições alcalinas, seguindo protocolos estabelecidos em nosso laboratório (46–48), com base em Singh et al., 1988 (49), com modificações e sob baixa luminosidade e temperatura controlada, devido à foto e termossensibilidade do ensaio.

### 4.9.1 Preparo das lâminas

Lâminas histológicas lisas de extremidade fosca foram pré-revestidas com uma primeira camada de agarose de ponto de fusão normal (*Normal Melting Point Agarose* – NMP; Gibco) 1,5% dissolvida em PBS e mantida a 65°C, secaram a temperatura ambiente *over night* (figura 14). A primeira camada é o suporte para que ocorra a ótima adesão da segunda camada que é a mistura da agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melting Point Agarose* - LMP) com as células a serem analisadas.



**Figura 14:** Primeira camada de agarose: banho-maria a 65°C (A), banho de agarose NMP na lâmina (B), lâminas com primeira camada (C).

Para a preparação da segunda camada cerca de  $2 \times 10^4$  células foram misturadas com 100  $\mu$ l de agarose LMP (Gibco) 0,5%, dissolvida em PBS e mantida a 37°C. A mistura contendo agarose LMP e a suspensão celular foi espalhada sobre as lâminas com a primeira camada (figura 15A) que foram cobertas com uma lamínula (figura 15B) e resfriadas a 4°C por 20 minutos para a polimerização da agarose.

#### **4.9.2 Lise, desenovelamento e eletroforese**

Após a polimerização as lamínulas foram gentilmente removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise gelada e recém-preparada, contendo 2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 34 mM N-lauroylsarcosine de sódio, 1% Triton X-100 e 10% DMSO, esses dois últimos acrescentados no momento de uso. A lise ocorreu por 1 hora a 4°C sob proteção contra a luz, para rompimento das membranas celulares (figura 15C).

Após a lise, as lâminas foram lavadas com água destilada gelada e, em seguida colocadas, rapidamente, em solução de PBS, para retirar o excesso de sais. Em seguida, as lâminas foram dispostas em uma cuba de eletroforese (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, Califórnia, EUA) e cobertas com solução tampão alcalina (pH>13) refrigerado a 4°C, preparado com 300mM NaOH e 1mM EDTA. Para a etapa de desenovelamento do DNA as lâminas foram deixadas submersas nessa solução tampão por 40 minutos (figura 15D). Essa etapa é importante para propiciar a desnaturação das proteínas histonas, constituindo uma estrutura chamada nucleóide, na qual poucas proteínas residuais formam uma matriz nuclear onde o DNA fica aderido. As condições alcalinas dessa solução também estimulam a fragmentação do DNA nos locais de lesão como: quebras de fita simples, sítios álcali-lábeis, sítios incompletos de reparo, sítios abásicos, quebras de fita dupla e ligações cruzadas.

Com as lâminas já dispostas na posição para a corrida, as condições de eletroforese foram ajustadas a 20V, amperagem a 300mA por aumento ou diminuição do volume da solução tampão, e tempo de corrida 30 minutos (figura 15E).

Ao término da eletroforese, as lâminas foram cuidadosamente retiradas da cuba e submetidas à etapa de neutralização, com três lavagens de 5 minutos, em solução tampão neutro (Tris 0,4M, pH 7,5). Após a neutralização, as lâminas foram cobertas por etanol P.A. por 5 minutos para fixação e deixadas secar a temperatura ambiente por 1 hora (figura 15F).

#### **4.9.3 Coloração e análise**

A coloração foi realizada com brometo de etídio na concentração de

20µg/ml. Foram adicionados 50µl da solução de uso sobre a lâmina e coberta por uma lamínula. A análise foi realizada imediatamente após a coloração, em microscópio óptico de fluorescência (Nikon Eclipse Ti) equipado com filtro de 585nm (G-2E/C; Nikon) com aumento de 20x. As imagens foram adquiridas através da câmera digital de 12.7 megapixels (Ds-Ri1; Nikon) (figura 15G).

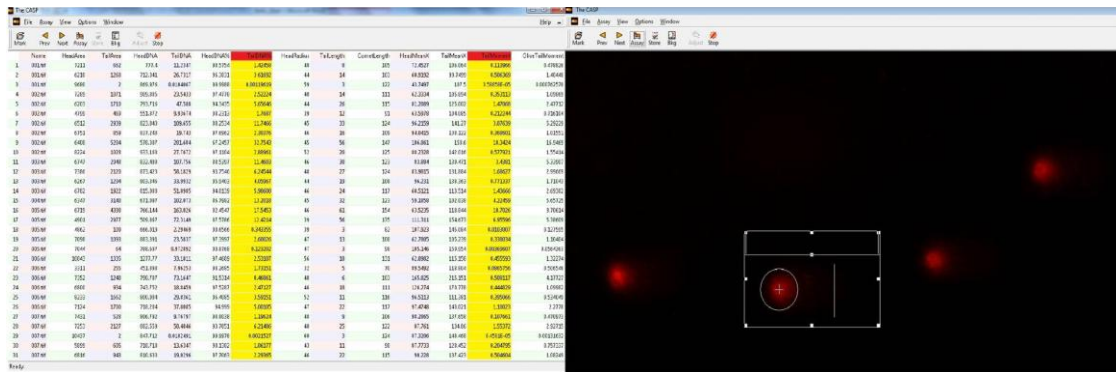
Para este trabalho, todas as células que tenham sido submetidas ao ensaio completo foram denominadas de cometas, independente do grau de dano e da ocorrência de cauda. Foram analisadas duas lâminas por indivíduos e uma média de 50 cometas em cada lâmina. Para manter a imparcialidade as lâminas foram codificadas e analisadas em diferentes posições, evitando regiões de bordas e bolhas, onde a migração durante a eletroforese pode ocorrer de maneira irregular. Os cometas obtidos foram analisados através de sistema de análise de imagem. Foi utilizado o programa de domínio público CASP, desenvolvido por Końca *et al* (50) disponível em: [www.casp.of.pl](http://www.casp.of.pl).

O programa CASP fornece inúmeros parâmetros para quantificar a fragmentação do DNA em cada cometa. Dentre tantos parâmetros utilizamos o momento da cauda (*tail moment*) e a porcentagem de DNA na cauda (*%tail DNA*) (figura 16).

O momento da cauda é o parâmetro mais utilizado e representa quantitativamente a extensão do dano ao DNA. É um índice que avalia tanto a migração do material genético quanto a quantidade relativa de DNA na cauda. A porcentagem de DNA na cauda, que representa a extensão das rupturas das hélices de DNA, é considerado um parâmetro extremamente confiável por apresentar alta correlação quando comparado a análises visuais.

Foi realizada também uma quantificação de cometas com mais de 25% de DNA na cauda em cada grupo, esses cometas foram considerados com danos moderado-elevados. O aumento na quantidade desses tipos de cometas pode indicar sobrecarga no sistema de reparo ao DNA.





**Figura 16:** Tabela de resultados fornecida pelo CASP com todos os parâmetros de análise dos cometas. Destaque para os parâmetros porcentagem de DNA na cauda (%tail DNA) e momento da cauda (tail moment), utilizados neste estudo (esquerda). Interface do programa CASP, destaque para o cometa selecionado (direita).

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média±EPM. As variáveis mensuradas apresentam distribuição Gaussiana conforme análise feita usando o teste estatístico de Kolmogorov-Smirnov. Por isso, foi realizada a análise estatística paramétrica utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via, completamente randomizadas, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni, utilizando *GraphPad Prism 5.1 software* (La Jolla, Califórnia, EUA). As diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .



## 5 RESULTADOS

### 5.1 PERFIL LIPÍDICO

A Tabela 1 mostra a média dos valores do perfil lipídico de animais WT, apoE<sup>-/-</sup> veículo e apoE<sup>-/-</sup> sildenafil. Como esperado os grupos apoE<sup>-/-</sup> mostraram elevados valores de colesterol plasmático total (12 vezes), LDL (5 vezes) VLDL+IDL (56 vezes), e triglicerídeos (5 vezes) e os valores de HDL significativamente menores (2 vezes) comparados aos animais WT. O tratamento com sildenafil não alterou o perfil lipídico plasmático dos animais apoE<sup>-/-</sup>.

**Tabela 1:** Perfil lipídico plasmático

Parâmetros	Grupos		
	WT	apoE <sup>-/-</sup> veículo	apoE <sup>-/-</sup> tratado
Triglicerídeos (mg/dL)	52±6,1	299±47,7**	248±52,2*
Colesterol total (mg/dL)	100±7,8	1229±185,9**	1310±222,9**
LDL colesterol (mg/dL)	34±7,2	188±49,1**	217±48,6**
HDL colesterol (mg/dL)	49±2,8	24±8,0**	10±0,9**
VLDL + IDL (mg/dL)	18±5,5	1016±195,6**	1083±240,1**

Os valores representam a média±EPM; 6 animais por grupo.

\*p<0,05 e \*\*p<0,01 vs. WT (Anova)

### 5.2 CONTAGEM E VIABILIDADE DAS CÉLULAS

A tabela 2 mostra a média dos valores obtidos na contagem celular na câmara de Neubauer tanto das amostras de MNC quanto de células hepáticas. Assim como, pode ser observado na tabela 2 que as amostras apresentaram viabilidade acima de 70%, através do método de exclusão do corante azul de tripano, como recomendado para prosseguir com a realização do ensaio do cometa demonstrando que o

isolamento não danificou as células. A pureza, a integridade morfológica e as características das células foram avaliadas em microscópio óptico, antes da realização do protocolo de genotoxicidade.

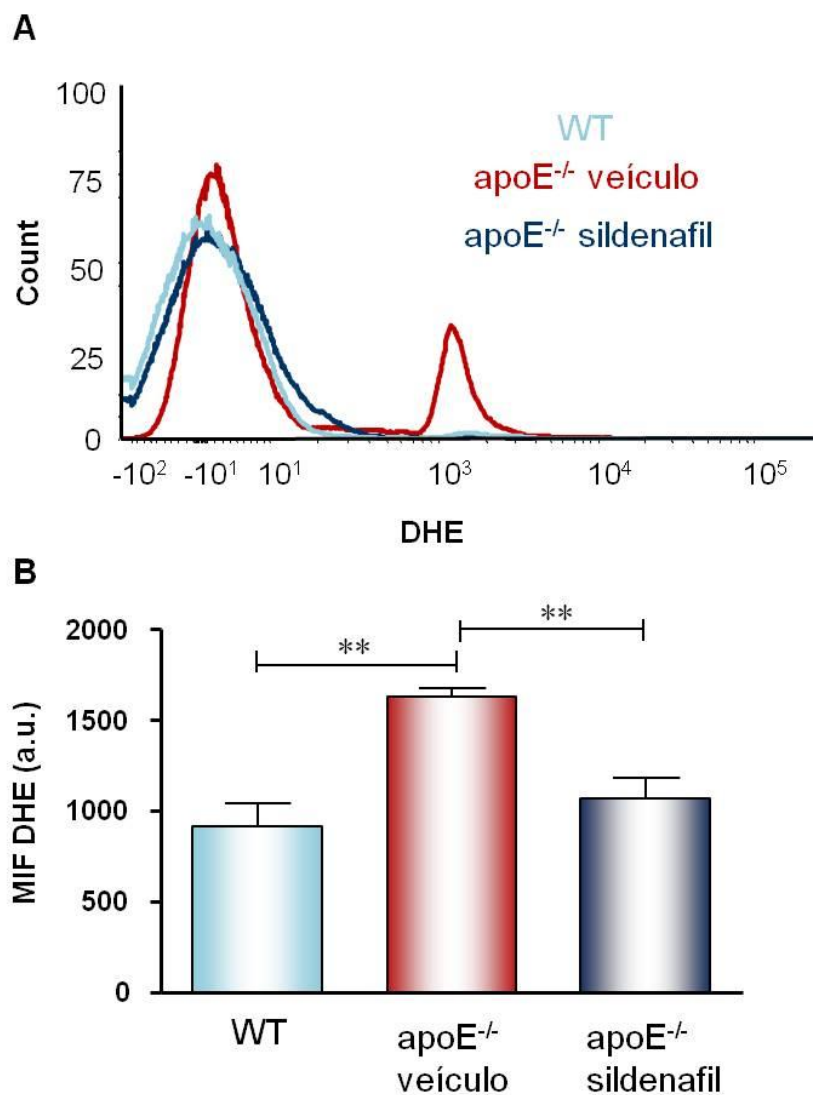
**Tabela 2:** Contagem e viabilidade de MNC e células hepáticas

Tipo de células	Parâmetros	Grupos		
		WT	apoE <sup>-/-</sup> veículo	apoE <sup>-/-</sup> tratado
MNC	Contagem de células (célulasx10 <sup>6</sup> /mL)	1,08±0,13	1,63±0,28	2,41±0,46
	Viabilidade (%)	96±0,8	98±0,5	97±0,5
Fígado	Contagem de células (célulasx10 <sup>6</sup> /mL)	1,34±0,15	0,67±0,04	2,77±0,97
	Viabilidade (%)	95±0,8	97±0,6	93±2,8

Os valores representam a média±EPM; (MNC: WT n=15; apoE<sup>-/-</sup> veículo n=12; apoE<sup>-/-</sup> sildenafil n=15); (fígado: 6 animais por grupo)

### 5.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÂNION SUPERÓXIDO NAS CÉLULAS MONONUCLEARES

A presença de  $\bullet\text{O}_2^-$  foi indicada pela mediana da intensidade de fluorescência (MIF - a.u.). O histograma típico da análise por citometria de fluxo (figura 17A) mostra um deslocamento para a direita no registro da fluorescência em camundongos apoE<sup>-/-</sup> veículo em comparação com os animais tratados e controles. Esse resultado demonstra um aumento notável nos níveis de  $\bullet\text{O}_2^-$  em MNC no grupo apoE<sup>-/-</sup> veículo (1629±44 a.u. p<0,01) em comparação aos animais controle (915±124 a.u.), sendo que o tratamento com sildenafil foi capaz de diminuir esses níveis (1065±115 a.u. p<0,01) (figura 17B).



**Figura 17:** Produção de ânion superóxido em MNC: histograma representativo de análise por citometria de fluxo usando DHE em camundongos WT (n=9), apoE<sup>-/-</sup> veículo (n=6) e apoE<sup>-/-</sup> tratado (n=9) (A), gráfico de barras mostrando a intensidade de fluorescência (MIF) (B). Os valores indicam média±EPM. \*\*p<0,01 (Anova).

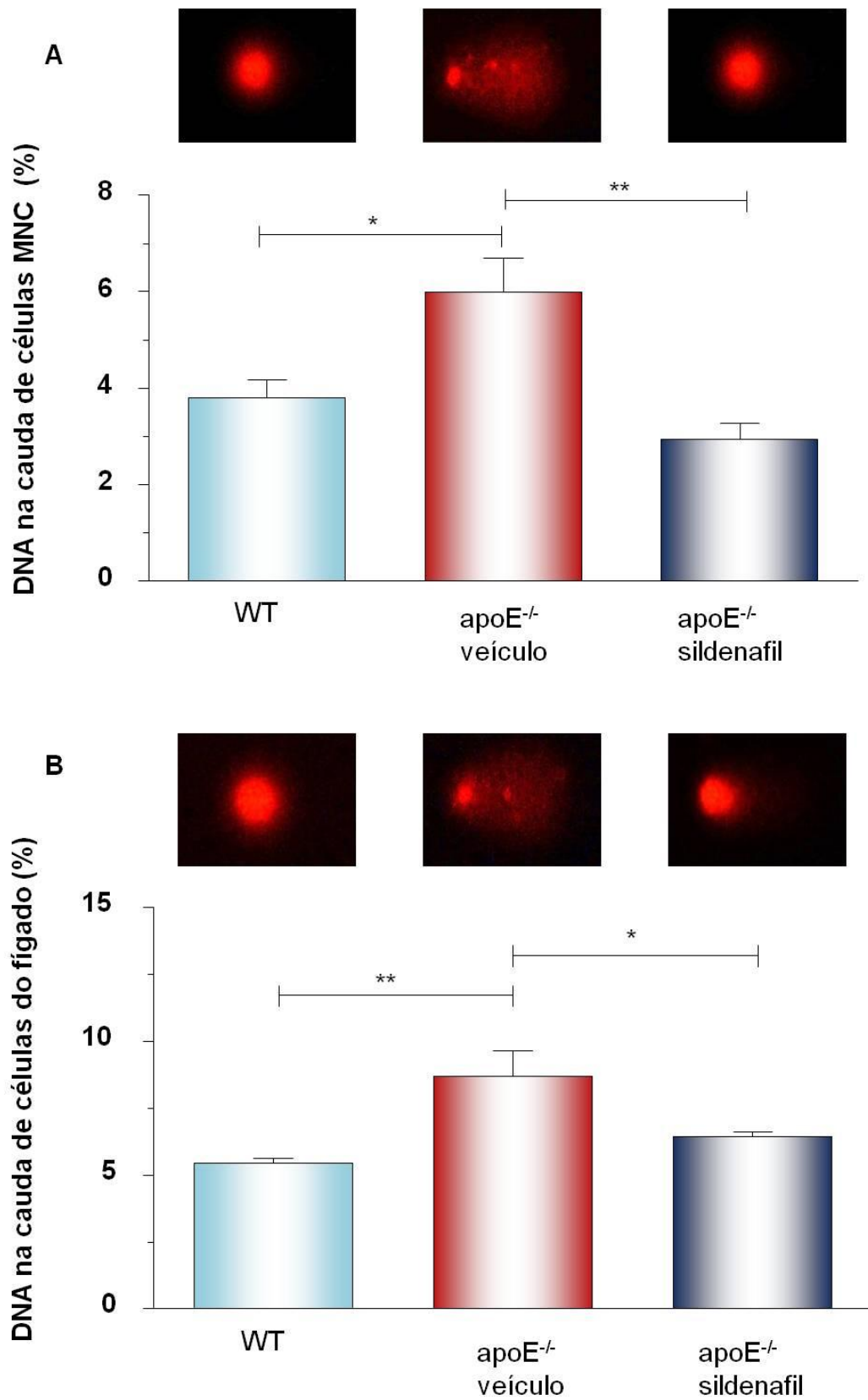
#### 5.4 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE FRAGMENTAÇÃO NO DNA PELO ENSAIO DO COMETA

A porcentagem de DNA na cauda (*%tail DNA*) representa o número de fragmentos que migraram durante a eletroforese. As figuras 18A e 18B demonstram os resultados da *%tail DNA* em MNC e células do fígado, respectivamente. O grupo apoE<sup>-/-</sup> veículo mostrou maior dano ao DNA (MNC: 6,0±0,7% p<0,05; fígado: 9,0±1,2% p<0,01), quando comparado ao grupo controle (MNC: 3,8±0,4% e fígado:

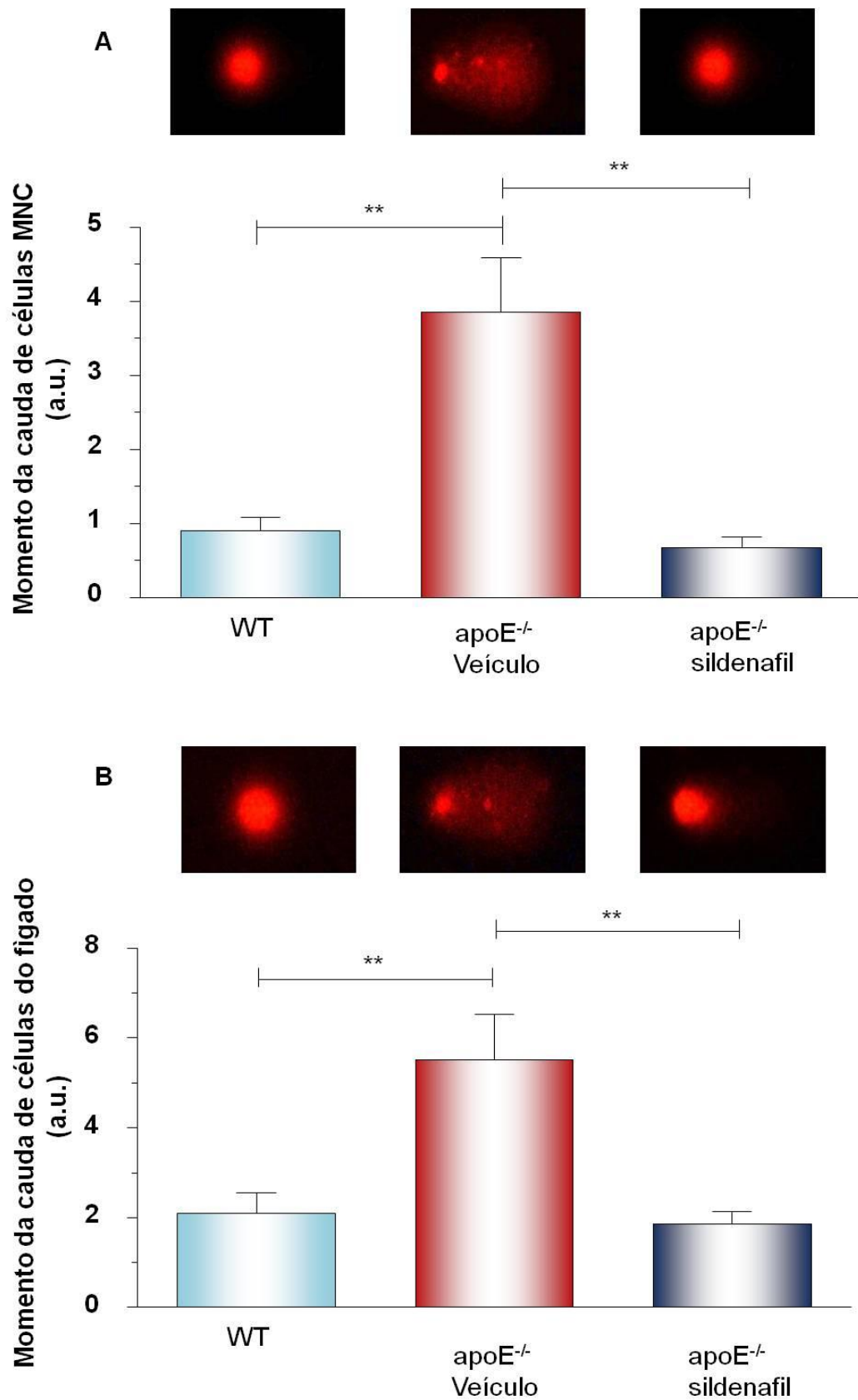
5,5±0,2%). O tratamento com sildenafil foi capaz de diminuir o nível de dano (MNC: 2,9±0,3% p<0,01; fígado: 6,4±0,2% p<0,05).

Outro parâmetro analisado foi o momento da cauda que é um índice que avalia tanto a migração do material genético quanto a quantidade relativa de DNA na cauda, relacionando a porcentagem de DNA na cauda com a intensidade da fluorescência. Esta análise é mais sensível e revelou uma diminuição da fragmentação do DNA em animais tratados com sildenafil tanto em amostras de MNC (Figura 19A - WT: 0,9±0,2 a.u. vs. apoE<sup>-/-</sup> veículo: 3,9±0,7 a.u. p<0,01 vs. apoE<sup>-/-</sup> sildenafil: 0,7±0,2 a.u. p<0,01) quanto de células do fígado (Figura 19B - WT: 2,1±0,4 a.u. vs. apoE<sup>-/-</sup> veículo: 5,5 ± 1,0 a.u. p<0,01 vs. apoE<sup>-/-</sup> sildenafil: 1,9±0,3 a.u. p<0,01).

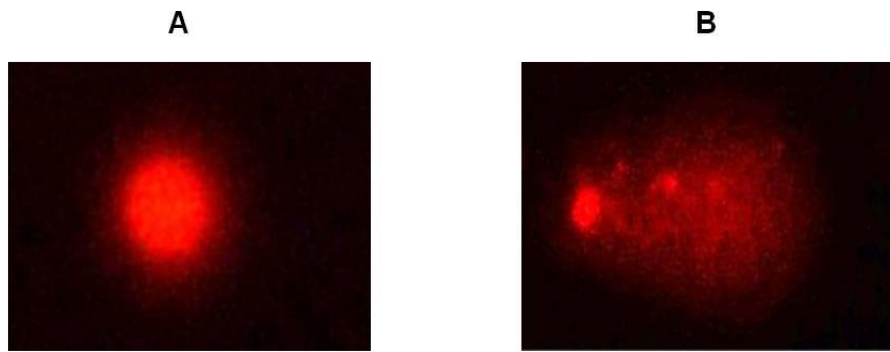
Foi também realizada a quantificação de cometas com mais de 25% de DNA na cauda e estes cometas foram categorizados como com dano moderado-elevado (Figura 20). A figura 21A mostra os resultados das MNC (WT: 0,8±0,5 vs. apoE<sup>-/-</sup> veículo: 5,5±1,2 p<0,01 vs. apoE<sup>-/-</sup> sildenafil: 0,7±0,3 p<0,01) e a figura 21B das células do fígado (WT: 2,2±0,7 vs. apoE<sup>-/-</sup> veículo: 6,8±1,1 p<0,01 vs. apoE<sup>-/-</sup> sildenafil: 2,0±0,6 p<0,01). Esses resultados demonstram que os animais tratados com sildenafil tiveram um número menor de cometas com dano moderado-elevado em MNC e células do fígado.



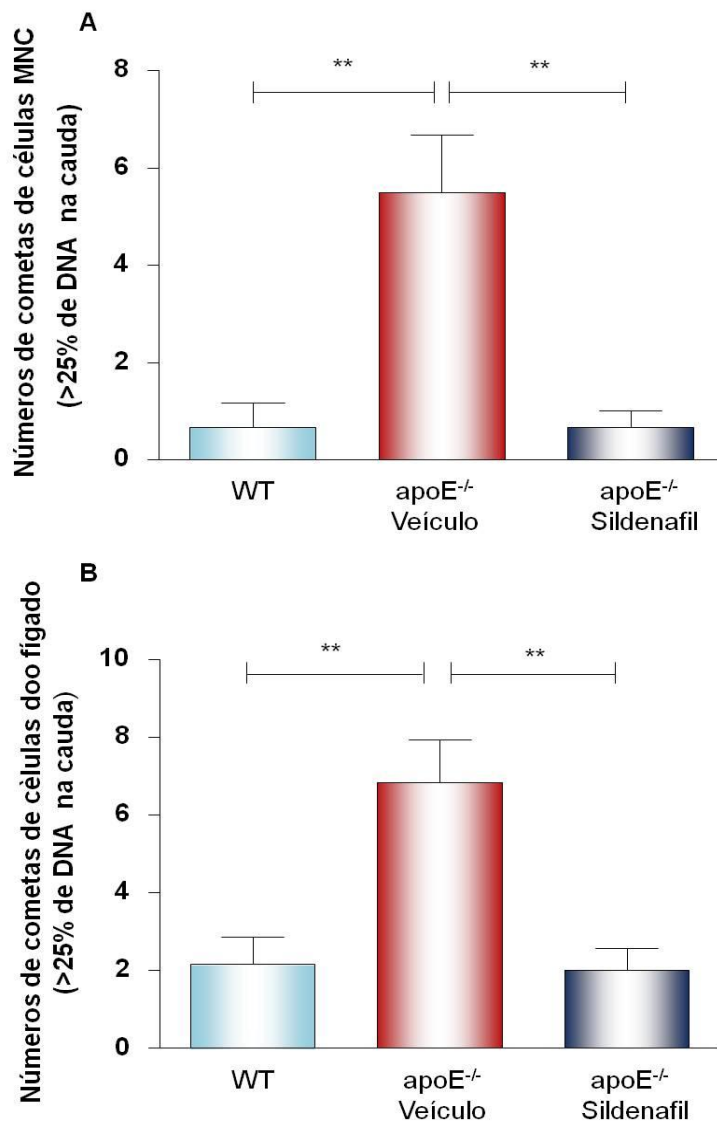
**Figura 18:** Gráfico da porcentagem de DNA na cauda de MNC (A) e células do fígado (B) de camundongos WT (n=6), apoE<sup>-/-</sup> veículo (n=6) e apoE<sup>-/-</sup> sildenafil (n=6). Os valores indicam média±EPM. \* p<0,05 (Anova).



**Figura 19:** Gráfico do momento da cauda de MNC (A) e células do fígado (B) de camundongos WT (n=6), apoE<sup>-/-</sup> veículo (n=6) e apoE<sup>-/-</sup> sildenafil (n=6). Os valores indicam média±EPM. \* p<0,05 (Anova).



**Figura 20:** Fotos de cometas: cometa com nível de dano baixo (A), cometa com nível de dano moderado-elevado (B).



**Figura 21:** Gráfico do número de cometas com dano moderado-elevado (>25% de DNA na cauda) de MNC (A) e células do fígado (B) de camundongos WT (n=6), apoE<sup>-/-</sup> veículo (n=6) e apoE<sup>-/-</sup> sildenafil (n=6). Os valores indicam média±EPM. \*p<0,05 (Anova).

## 6 DISCUSSÃO

A aterosclerose é uma doença que resulta de alterações lipídicas, ação de mediadores pró-inflamatórios e estresse oxidativo (3,8,14,15). Tanto a inflamação quanto o estresse oxidativo contribuem para o dano tecidual em diversos órgãos na aterosclerose (21).

Sabe-se que o acúmulo de LDL na matriz subendotelial é o evento primário da aterogênese e, conseqüentemente, altos níveis de LDL na circulação aceleram a progressão da doença (3,7,8). Nesse trabalho os animais apoE<sup>-/-</sup> apresentaram níveis plasmáticos de LDL colesterol cerca de 13 vezes maiores do que os animais controle.

Assim, é possível associar a hipercolesterolemia com o aumento do estresse oxidativo, já que os macrófagos são os principais produtores de ROS durante a progressão da aterosclerose, pois eles ativam o complexo enzimático oxNADPH que está presente em sua membrana plasmática e oxidam a LDL na camada íntima da parede da artéria (52). O complexo oxNADPH é composto por enzimas que catalisam a redução do oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) usando NADPH como doador de elétron (53–56), e é considerado a maior fonte de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> na aterosclerose (53). Além dos macrófagos as oxNADPH vasculares (isoformas encontradas na célula endotelial) também são ativadas, aumentando ainda mais a produção de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> (53–56).

Após a oxidação da LDL os macrófagos promovem apresentação de antígenos, assim os linfócitos T reconhecem a oxLDL e, liberam localmente citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, aumentando ainda mais a cascata de resposta inflamatória (8), levando assim ao aumento na produção de ROS.

Soma-se a isso, o fato de que em animais apoE<sup>-/-</sup>, devido ao processo inflamatório, ocorre a indução da XO que está presente no endotélio e é uma enzima capaz de catalisar a oxidação da xantina e hipoxantina via O<sub>2</sub>, gerando •O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e urato (25). Além disso, ocorre a indução de outros sistemas de enzimas incluindo a lipoxigenase (14), contribuindo, assim, para a formação de ROS em todas as camadas da parede arterial doente, particularmente nas placas ateroscleróticas (7,57).

Sabe-se que em condições fisiológicas o *shear stress* e a acetilcolina, juntamente com receptores agonistas específicos, tais como trombina, bradicinina e



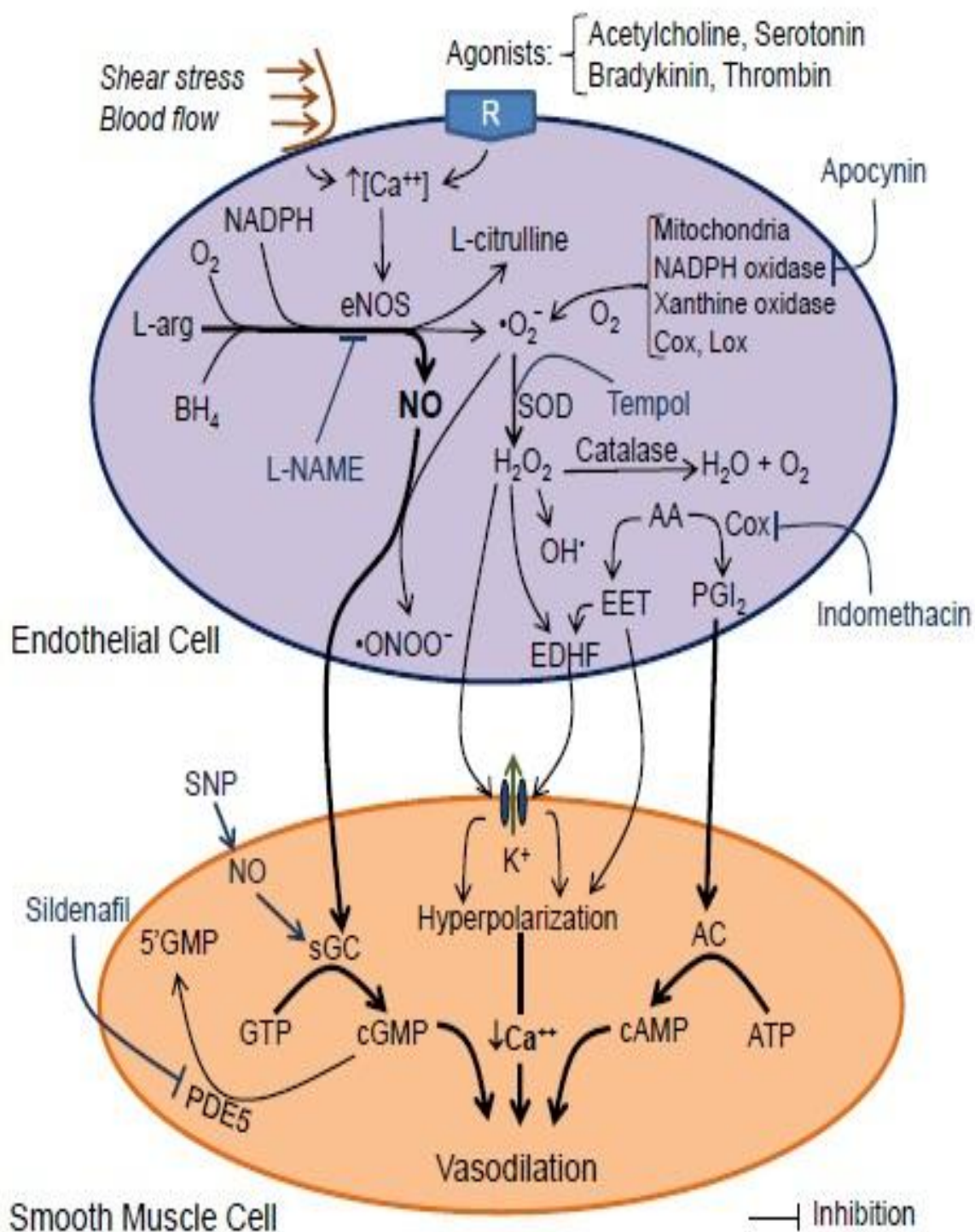
serotonina, provocam aumento dos níveis de íons cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) intracelular. Este aumento de  $\text{Ca}^{++}$  ativa a eNOS, que atua na L-arginina (L-arg) resultando na produção de  $\text{NO}\cdot$ . Essa reação requer a participação de co-factores, tais como tetrahydrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ) e NADPH, que são críticos no acoplamento da eNOS para a redução de  $\text{O}_2$  e a oxidação da L-arg, resultando na produção de  $\text{NO}\cdot$  e L-citrulina (figura 22) (7). No entanto, com o aumento dos níveis de ROS ocorre o desacoplamento da eNOS (26), a eNOS desacoplada passa a produzir menos  $\text{NO}\cdot$  e aumenta a produção de  $\cdot\text{O}_2^-$  (7,8).

Deste modo, essa superprodução de  $\cdot\text{O}_2^-$  diminui a biodisponibilidade do  $\text{NO}\cdot$ , pois além da eNOS desacoplada produzir menos, o  $\text{NO}\cdot$  que é produzido pode reagir com os altos níveis de  $\cdot\text{O}_2^-$  e formar o  $\text{ONOO}^-$  (figura 23). O  $\text{ONOO}^-$ , é protonado rapidamente formando o ácido peroxinitroso ( $\text{HONO}_2$ ). Este se decompõe rapidamente, devido a sua alta instabilidade, produzindo dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ) e radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) (21,53–55). A formação de peroxinitrito,  $\text{HONO}_2$  e seus produtos de decomposição ( $\text{OH}\cdot$  e  $\text{NO}_2$ ) é prejudicial às macromoléculas, pois essas espécies são capazes de oxidar lipídeos, tióis e DNA (21,54,55).

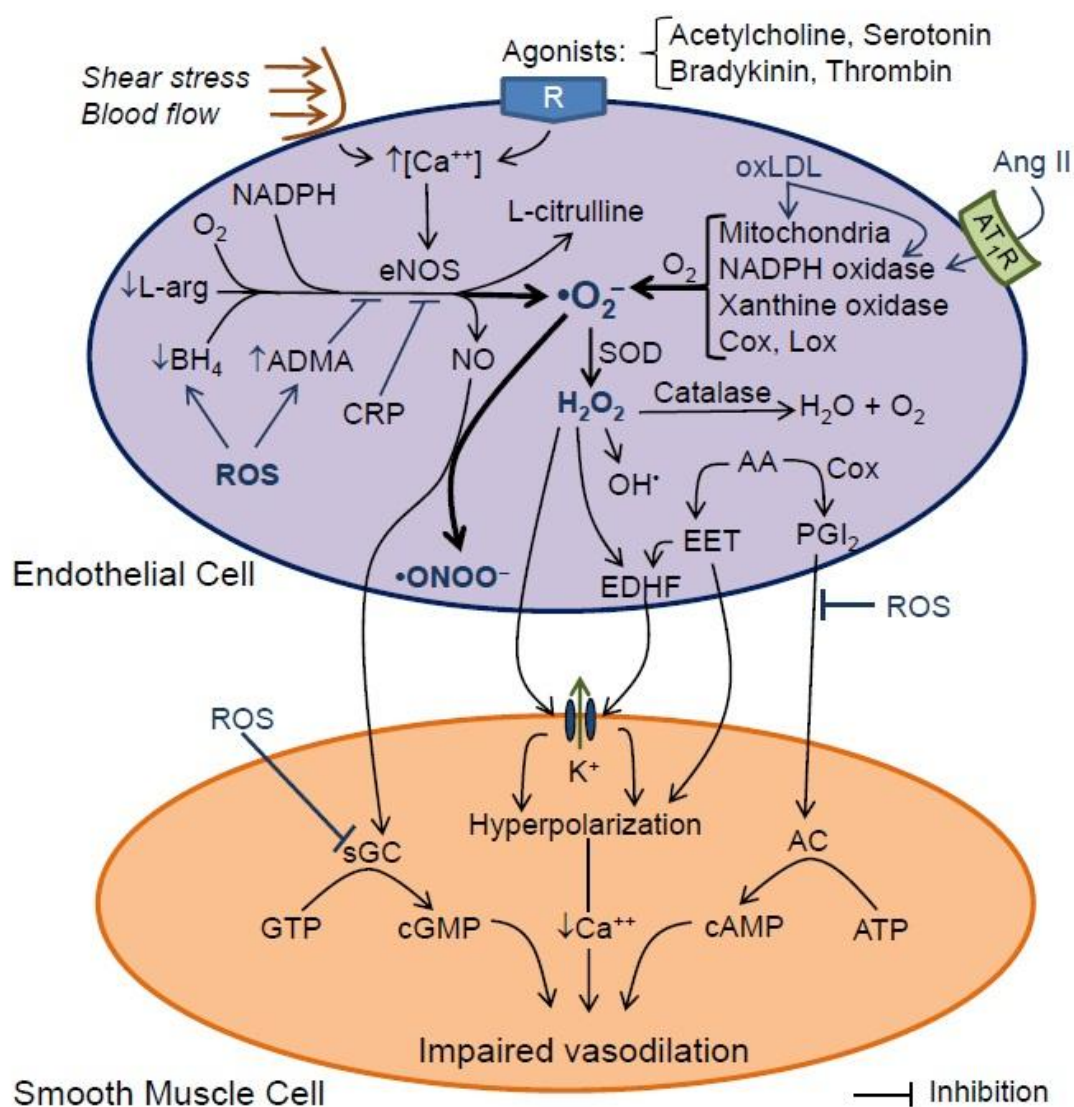
Assim, essas várias vias de elevação na produção de ROS corroboram os resultados de nosso estudo, no qual verificamos que houve um aumento na produção de ROS em camundongos  $\text{apoE}^{-/-}$ . Nesses animais os níveis de  $\cdot\text{O}_2^-$  em células MNC estavam cerca de 2 vezes maiores quando comparados aos animais WT.

Sob condições fisiológicas, ROS são continuamente produzidas na maioria das células, e os seus níveis são regulados por uma série de enzimas antioxidantes, tais como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px), bem como por outros antioxidantes não enzimáticos (34). No entanto, como mencionado anteriormente na aterosclerose a produção de ROS está aumentada, assim, nestas condições de desequilíbrio entre a produção de ROS e sua degradação pode ocorrer instabilidade genômica e, conseqüentemente, alterações permanentes no material genético, que contribuem para os processos deletérios observados nos diferentes tecidos alvos da doença (19,35,46,48).

Quando as células não respondem adequadamente a ativação dos mecanismos de defesa antioxidantes (58) ocorrem danos celulares e/ou em macromoléculas através de reações químicas em cadeia, tais como a oxidação de proteínas, lipídios e DNA (8–10).



**Figura 22:** Esquema hipotético ilustrando as possíveis vias bioquímicas para a produção de NO• e outras ROS por células endoteliais, sob condições fisiológicas, incluindo ferramentas farmacológicas específicas que são utilizadas para estudar a função vascular (7).



**Figura 23:** Esquema hipotético ilustrando possíveis mecanismos que levam ao desacoplamento da eNOS, resultando na diminuição da biodisponibilidade do NO•, aumento da produção de  $\bullet\text{O}_2^-$ , gerando  $\text{ONOO}^-$  e, assim, levando a uma diminuição da vasodilatação (7).

Evidências sugerem que danos oxidativos ao DNA desempenham um papel importante em doenças degenerativas crônicas (51). O dano ao DNA produzido por oxidação é considerado o mais significativo dano oriundo do metabolismo celular. Estima-se que aproximadamente  $2 \times 10^4$  lesões oxidativas ao DNA ocorram no genoma humano por dia (22,59). Desta maneira o reparo das lesões possui um papel central na prevenção do aumento de mutações nos organismos vivos (60).

Parece provável que as ROS geradas por diversas rotas podem causar danos ao DNA na aterosclerose (31,32). Muitas evidências sugerem que danos

cumulativos ao DNA causados pelas ROS contribuem para diversas condições clínicas (61,62) como as observadas na aterosclerose. E, por sua vez, esse acúmulo de danos pode ser influenciado pela suscetibilidade a polimorfismos que podem alterar a atividade de genes do DNA relevantes à reparação (32). Desta forma, na doença pode ocorrer um desequilíbrio entre a geração de danos ao DNA e seu reparo, o que leva a uma sobrecarga do sistema reparo, promovendo acúmulo de danos que são extremamente prejudiciais ao organismo.

No presente estudo foi possível observar um aumento nos níveis de fragmentação do DNA, em MNC e células hepáticas, nos animais apoE<sup>-/-</sup> quando comparados aos animais WT. Bem como, foi possível associar esse aumento com a elevação na produção de ROS.

Diversas pesquisas têm avaliado danos oxidativos ao DNA a fim de testar a hipótese de que a instabilidade genômica pode ser um contribuinte significativo para a patogênese de várias doenças, inclusive a aterosclerose (31,32,63). Análises moleculares de DNA extraído a partir de placas ateroscleróticas demonstraram mutações genéticas específicas, quando comparado ao DNA de tecido normal adjacente (63–67). Trabalhos como de Flouris *et al.* e Grati *et al.* (63,64) forneceram informações sobre genes suscetíveis a alterações moleculares relacionados à aterosclerose.

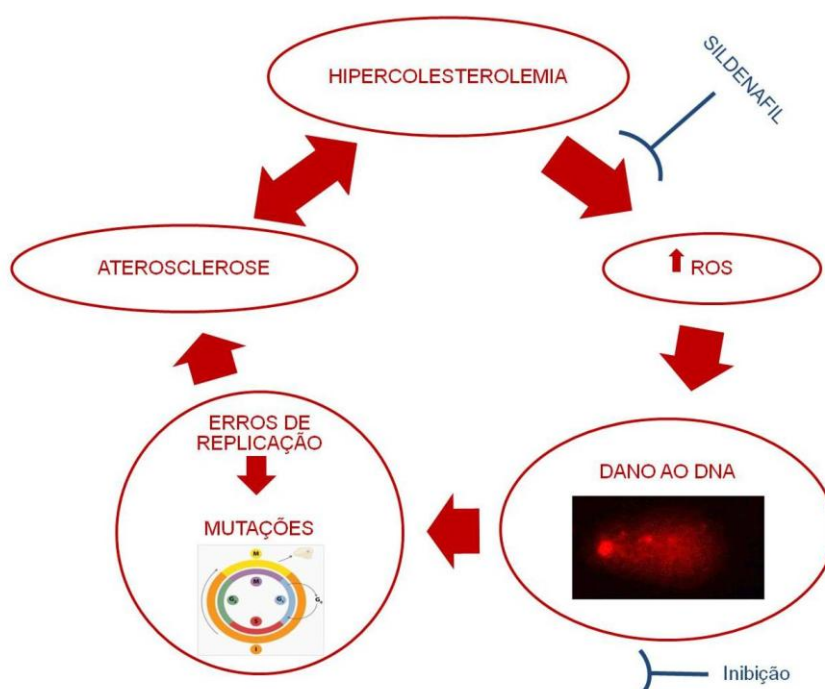
A disfunção endotelial e o acúmulo de oxLDL promovem uma resposta vascular inflamatória e a produção de fatores de crescimento que estimulam a proliferação de CML (3,11). Portanto, a placa aterosclerótica é um meio provedor de um processo inflamatório crônico que libera uma variedade de mutagênicos endógenos, tais como as ROS, que podem contribuir diretamente para as modificações no DNA (32).

Trabalhos recentes em nosso laboratório mostraram a relação entre o aumento do estresse oxidativo e, conseqüente, elevação do dano ao DNA. Campagnaro *et al.* mostraram um aumento na fragmentação do DNA associado ao aumento da geração de  $\cdot\text{O}_2^-$  em células da medula óssea de camundongos com hipertensão renovascular (47). Bem como, os trabalhos de Dalboni *et al.* e Tonini *et al.* relacionaram o dano ao DNA, respectivamente, em células sanguíneas e células MNC da medula óssea de camundongos apoE<sup>-/-</sup> com o envelhecimento, a hipercolesterolemia e o estresse oxidativo (46,48), mostrando uma correlação entre aterosclerose, hipercolesterolemia, estresse oxidativo e dano ao DNA.

Estudos indicam um importante papel da apoptose no ateroma humano avançado, fornecendo evidências específicas que a morte celular por apoptose está fortemente relacionada com o grau de desenvolvimento da placa aterosclerótica (68–70). Esta observação poderia ser a consequência de um grau mais grave de danos ao DNA em placas ateroscleróticas avançadas, já que tanto os macrófagos quanto as CML sofrem apoptose na placa aterosclerótica (68).

Desta forma, em nossos resultados ficou demonstrado que em camundongos apoE<sup>-/-</sup> ocorre um aumento nos níveis de colesterol plasmático, e um aumento nos níveis de  $\bullet\text{O}_2^-$  em células MNC quando comparados aos animais controle. Demonstrando-se, assim, um aumento na produção de ROS nos animais doentes, o que suporta a hipótese de que a hipercolesterolemia pode induzir ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, ao dano ao DNA.

O aumento da instabilidade do DNA pode ser adicionado como um fator importante na aterosclerose, que é uma doença multifatorial. Tendo um papel importante como fator patogênético e no prognóstico da doença, demonstrando uma dimensão biológica antes ignorada dentre os fatores de risco, levando a novos potenciais alvos terapêuticos (figura 24).



**Figura 24:** Esquema hipotético ilustrando o papel da genotoxicidade induzida pelas ROS no desenvolvimento e progressão da aterosclerose e a inibição dessa via pelo sildenafil.

Portanto, devido ao impacto da elevada produção de ROS e, conseqüentemente, do aumento do dano ao DNA observado na aterosclerose a inibição da fragmentação do DNA via oxidação é um ponto interessante que deve ser avaliado ao se testar a eficácia de novas terapias para a prevenção do desenvolvimento e progressão da aterosclerose. Logo, a utilização de fármacos com propriedades antioxidantes pode ser uma opção no tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo para amenizar os danos ao material genético.

Existem 11 famílias de fosfodiesterases em tecidos de mamíferos (41,71,72). O sildenafil aumenta o GMPc intracelular através da inibição da enzima PDE5. Em nosso estudo tratamos camundongos apoE<sup>-/-</sup> com sildenafil observando pesquisas anteriores que demonstraram o efeito antioxidante dessa droga.

Pesquisas mostraram que o tratamento com sildenafil foi capaz de reduzir a expressão da oxNADPH e a formação de  $\bullet\text{O}_2^-$  em cultura de células de coelhos hipercolesterolêmicos (73) e porcos (44), bem como em aorta de ratos diabéticos (43).

Bivalacqua *et al.* (40) demonstraram que o sildenafil diminuiu a sinalização de ROS, os níveis de ONOO<sup>-</sup> e a atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em ratos e isso se deve a uma ação direta do aumento da atividade da eNOS e da diminuição dos níveis de  $\bullet\text{O}_2^-$ .

Assim como, Beheshtian *et al.* (39) demonstraram que o sildenafil aumentou a atividade das enzimas SOD e CAT em ratos. Além disso, também foi demonstrado que a capacidade antioxidante total do plasma foi aumentada com o uso de sildenafil em ratos diabéticos (20) e que o sildenafil aumentou a atividade da CAT, GSH-Px e SOD em corações de ratos diabéticos (34).

Em nosso estudo ficou demonstrado que o tratamento com o sildenafil foi capaz de diminuir os níveis de fragmentação do DNA nos camundongos apoE<sup>-/-</sup> alcançando os níveis dos animais controle. Essas propriedades antioxidantes do sildenafil supramencionadas podem constituir um mecanismo-chave para a redução do estresse oxidativo e dano ao DNA observadas neste estudo.

Outra vantagem potencial de uma abordagem terapêutica com base na inibição da PDE5 é que ao contrário de estratégias que tentam aumentar os níveis de NO $\bullet$  (por exemplo, substratos, co-fatores, etc) (74,75) esta evita riscos associados ao aumento desses níveis, pois em excesso o NO $\bullet$  se torna citotóxico, possuindo a característica de ser uma "faca de dois gumes" (76–78). Deste modo, tem sido

demonstrado que, em altas concentrações, o NO• leva a um aumento na produção de ONOO<sup>-</sup> e, conseqüentemente, do estresse oxidativo (79,80), levando ao dano ao DNA (77,81).

Finalmente, os efeitos pleiotrópicos benéficos do sildenafil também podem ser explicados pelas características de farmacocinética e farmacodinâmica: alto volume de distribuição (82) e a ubiquidade do segundo mensageiro (GMPc) em vias de sinalização citoprotetoras (83) distribuídas em vários tecidos/células, incluindo MNC (84,85) e células hepáticas (86).

Um trabalho recente em nosso laboratório demonstrou que o tratamento com sildenafil restaura a função endotelial e reduz o estresse oxidativo em camundongos apoE<sup>-/-</sup>, o que resulta numa redução da deposição de placas, independente de alterações do perfil lipídico (38). Os resultados observados em nosso trabalho vão ao encontro dos demonstrados no trabalho supramencionado, já que não houve alteração no perfil lipídico plasmático do grupo tratado comparado ao veículo, o que está de acordo com resultados de pesquisas anteriores (87). Assim, é possível propor que o sildenafil pode oferecer uma nova perspectiva para a utilização de inibidores de PDE5 na proteção contra o dano ao DNA observados na aterosclerose, independente da hipercolesterolemia.

A análise da genotoxicidade foi realizada através do ensaio do cometa que mede quebras de cadeia simples e duplas do DNA, bem como lesões que são convertidas em quebras através do pré-tratamento alcalino (sítios alcalilábeis) (19). O ensaio cometa é uma técnica bem estabelecida, versátil e sensível, amplamente utilizada para avaliar os danos ao DNA em populações de células individuais (29).

Comparados aos outros ensaios de genotoxicidade, tais como aberrações cromossômicas, trocas de cromátides-irmãs, eluição alcalina e ensaio do micronúcleo, as vantagens do ensaio cometa incluem elevada sensibilidade para a detecção de baixos níveis de danos ao DNA (uma quebra por 10<sup>10</sup> Daltons de DNA), a necessidade de pequeno número de células (~10.000) por amostra, a flexibilidade de poder usar células proliferativas e não proliferativas e os dados gerados permitem uma variedade de análises diferentes (29). Outra vantagem desta técnica é a possibilidade do seu uso em diferentes tipos de células, já que algumas pesquisas sugerem que a genotoxicidade é tecido específica (35,88). Além disso, o presente estudo suporta a ideia de que o ensaio do cometa é um método útil para avaliar a

eficácia no tratamento sobre a genotoxicidade de MNC e células do fígado, mesmo em um curto intervalo de tempo (3 semanas).

O tecido sanguíneo pode ser facilmente obtido através de métodos não destrutivos, suas células, devido à circulação, mostram o dano genotóxico sistêmico causado pela doença. O isolamento das MNC foi realizado para proporcionar homogeneidade à análise e essas células permanecem por mais tempo sob a ação do estresse oxidativo do organismo. Além disso, sabe-se que MNC contêm uma subpopulação de células progenitoras endoteliais (CPE) que são células comprometidas com a manutenção e preservação do *turnover*, remodelação e homeostase vascular (89,90). No entanto, desordens tais como a aterosclerose e estresse oxidativo prejudicam a função das CPE, resultando em um desequilíbrio entre células reparadoras endoteliais e leucócitos inflamatórios, comprometendo a estabilidade entre a lesão e a reparação tecidual (48,90). Curiosamente, um estudo mostrou que uma dose de sildenafil semelhante a utilizada em nosso estudo, aumenta o número de CPE em camundongos apoE<sup>-/-</sup> (87). Os resultados observados em nosso estudo contribuem para essa evidência emergente, uma vez que a diminuição de danos ao DNA em MNC pelo tratamento com sildenafil poderia, assim, evitar a apoptose e, conseqüentemente, melhorar o processo de restauração desempenhado pelas CPE.

As células do fígado também foram avaliadas, devido à importância metabólica do fígado (91) e a sua elevada suscetibilidade a danos oxidativos ao DNA (35). Além disso, Folkmann *et al.* (35) demonstraram que camundongos apoE<sup>-/-</sup> sofrem de estresse oxidativo hepático/genotoxicidade e que isso pode ser devido a disfunção do metabolismo lipídico observada nesses animais. Nossos resultados demonstram que é possível reduzir os danos ao DNA em células do fígado de camundongos apoE<sup>-/-</sup> através do tratamento com sildenafil, mesmo sob condições de hipercolesterolemia, possivelmente pelos mesmos mecanismos antioxidantes supramencionados. Esta descoberta sustenta a ideia de que o sildenafil é uma estratégia farmacológica promissora para evitar dano tecidual induzido pelo estresse oxidativo, o que foi observado em diversos trabalhos (38–40,43,44,73,83), abrindo o caminho para estudos translacionais sobre a proteção do DNA em diferentes condições clínicas.

Isto posto, é possível dizer que o ensaio do cometa é uma técnica rápida e sensível de quantificação de lesões no DNA de vários tipos celulares, podendo,



assim, ser usada na avaliação de diferentes abordagens terapêuticas que reduzem o estresse oxidativo e, portanto danos ao DNA em modelos experimentais de aterosclerose.

Embora cada vez mais evidências suportem o papel da instabilidade genômica na aterosclerose questões fundamentais devem ser elucidadas. Qual a fonte de dano ao DNA na doença? É uma causa ou uma consequência da progressão da aterosclerose? A mutação de genes críticos pode resultar em alterações na progressão da doença? É possível reduzir a taxa de danos ao DNA, e, assim, retardar a progressão da aterosclerose? Esse estudo é uma tentativa de começar a responder essas questões, no entanto pesquisas futuras devem ser realizadas para proporcionar novos *insights* sobre a patogênese e o tratamento dessa doença.

## 7 CONCLUSÃO

O tratamento com sildenafil não alterou o perfil lipídico nos animais apoE<sup>-/-</sup> quando comparados ao controle, demonstrando que o sildenafil não tem efeito sobre a hipercolesterolemia

A análise de estresse oxidativo por citometria de fluxo, através da marcação com DHE o qual tem afinidade pelo  $\bullet\text{O}_2^-$  mostrou que em células MNC de animais ateroscleróticos espontâneos ocorre um aumento na produção desta espécie reativa. O tratamento com sildenafil causou uma diminuição desses níveis a valores próximos do controle.

A análise de genotoxicidade mostrou aumento do dano ao DNA em células MNC e do fígado dos animais apoE<sup>-/-</sup>, provavelmente devido ao aumento da produção de ROS que interagem com o DNA causando a sua fragmentação. O tratamento com sildenafil foi capaz de diminuir os níveis de dano próximo aos valores observados nos animais controle.

Esse estudo mostrou que camundongos apoE<sup>-/-</sup> tem um aumento do estresse oxidativo, como demonstrado pelos níveis elevados de produção de  $\bullet\text{O}_2^-$  em células MNC, o que conduz a danos ao DNA. Além disso, nestes animais, o estresse oxidativo hepático (em termos de danos ao DNA) também é significativo, quando comparado com animais controle normocolesterolêmicos. A inibição crônica da PDE5 com sildenafil foi eficaz em diminuir a genotoxicidade em MNC e células do fígado *in vivo*, em modelo experimental de aterosclerose espontânea.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html>. 2011.
2. DATASUS. Índice de Desenvolvimento Básico. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/ibd2011/matriz.htm>. 2011.
3. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(September):233–41.
4. Mansur A de P, Favarato D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: atualização 2011. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2012;99(2).
5. Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2007.
6. Saini HK, Xu Y-J, Arneja AS, Tappia PS, Dhalla NS. Pharmacological basis of different targets for the treatment of atherosclerosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2005;9(4):818–39.
7. Meyrelles SS, Peotta VA, Pereira TMC, Vasquez EC. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids in Health and Disease*. BioMed Central Ltd; 2011 Jan;10:211.
8. Vasquez EC, Peotta VA, Gava AL, Pereira TMC, Meyrelles SS. Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Journal of Biomedical Science*. BioMed Central Ltd; 2012 Jan;19:22.
9. Pashkow FJ. Oxidative stress and inflammation in heart disease: do antioxidants have a role in treatment and/or prevention? *International Journal of Inflammation*. 2011;2011:9.
10. Minamino T, Komuro I. Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circulation Research*. 2007 Jan 5;100:15–26.
11. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002 Mar 5;105:1135–43.
12. Paoletti R, Gotto Jr AM, Hajjar DP. Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. *Circulation*. 2004 Jun 15;109:III20–6.
13. Hofker MH, Van Vlijmen BJ, Havekes LM. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1998 Mar;137:1–11.

14. Jawien J, Gajda M, Wolkow P, Zuranska J, Olszanecki R, Korbut R. The effect of montelukast on atherogenesis in apoE/LDLR - double knockout mice. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2008;59(3):633–9.
15. Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2004 Jun;24:1006–14.
16. Zhang SH, Reddick RL, Burkey B, Maeda N. Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. *Journal Clinical Investigation*. 1994;94(September):937–45.
17. Piedrahita JA, Zhang SH, Hageman JR, Oliver PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992 May 15;89:4471–5.
18. 't Hoen PAC, Van der Lans CAC, Van Eck M, Bijsterbosch MK, Van Berkel TJC, Twisk J. Aorta of apoE-deficient mice responds to atherogenic stimuli by a prelesional increase and subsequent decrease in the expression of antioxidant enzymes. *Circulation Research*. 2003 Aug 8;93:262–9.
19. Folkmann JK, Risom L, Hansen CS, Loft S, Møller P. Oxidatively damaged DNA and inflammation in the liver of dyslipidemic ApoE<sup>-/-</sup> mice exposed to diesel exhaust particles. *Toxicology*. 2007 Jul 31;237:134–44.
20. Milani E, Nikfar S, Khorasani R, Zamani MJ, Abdollahi M. Reduction of diabetes-induced oxidative stress by phosphodiesterase inhibitors in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2005 Feb;140:251–5.
21. Silva DC, Cerchiaro G, Honório KM. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. *Química Nova*. 2011;34(2):300–5.
22. Andreassi MG. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. *Mutation Research*. 2003 Jan;543:67–86.
23. Dikalov S. Crosstalk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radical Biology & Medicine*. 2011;51(7):1289–301.
24. Sheehan AL, Carrell S, Johnson B, Stanic B, Banfi B, Miller Jr FJ. Role for Nox1 NADPH oxidase in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2011;216(2):321–6.
25. Schröder K, Vecchione C, Jung O, Schreiber JG, Shiri-Sverdlov R, Van Gorp PJ, et al. Xanthine oxidase inhibitor tungsten prevents the development of atherosclerosis in apoE knockout mice fed a western-type diet. *Free Radical Biology & Medicine*. 2006 Nov 1;41:1353–60.
26. Takaya T, Hirata K, Yamashita T, Shinohara M, Sasaki N, Inoue N, et al. A specific role for eNOS-derived reactive oxygen species in atherosclerosis

- progression. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2007 Jul;27:1632–7.
27. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovascular Research*. 1999 Aug 15;43:562–71.
  28. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007 Jan;39:44–84.
  29. Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*. 2009 Feb;25:5–32.
  30. McGregor D, Ballantyne B, Mars T, Syversen T. *Carcinogenicity and genotoxic carcinogens*. second. London; 2000. p. 1099–117.
  31. Olinski R, Gackowski D, Foksinski M, Rozalski R, Roszkowski K, Jaruga P. Oxidative DNA Damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radical Biology & Medicine*. 2002;33(2):192–200.
  32. Andreassi MG, Botto N. DNA damage as a new emerging risk factor in atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2003 Oct;13(7):270–5.
  33. Dizdaroglu M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Biology & Medicine*. 1991;10:225–42.
  34. Ebrahimi F, Shafaroodi H, Asadi S, Nezami BG, Ghasemi M, Rahimpour S, et al. Sildenafil decreased cardiac cell apoptosis in diabetic mice: reduction of oxidative stress as a possible mechanism. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2009;87:556–64.
  35. Folkmann JK, Loft S, Møller P. Oxidatively damaged DNA in aging dyslipidemic ApoE<sup>-/-</sup> and wild-type mice. *Mutagenesis*. 2007 Mar;22(2):105–10.
  36. Campagnaro BP, Gava AL, Meyrelles SS, Vasquez EC. Cardiac-autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the renovascular angiotensin-dependent hypertensive mouse. *International Journal of Hypertension*. 2012;2012:9.
  37. Riazhi K, Roshanpour M, Rafiei-Tabatabaei N, Homayoun H, Ebrahimi F, Dehpour AR. The proconvulsant effect of sildenafil in mice: role of nitric oxide-cGMP pathway. *British Journal of Pharmacology*. 2006 Apr;147:935–43.
  38. Balarini CM, Leal MA, Gomes IBS, Pereira TMC, Gava AL, Meyrelles SS, et al. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. *Journal of Translational Medicine*. *Journal of Translational Medicine*; 2013 Jan;11:3.

39. Beheshtian A, Salmasi AH, Payabvash S, Kiumehr S, Ghazinezami B, Rahimpour S, et al. Protective effects of sildenafil administration on testicular torsion/detorsion damage in rats. *World Journal of Urology*. 2008 Apr;26:197–202.
40. Bivalacqua TJ, Sussan TE, Gebaska MA, Strong TD, Berkowitz DE, Biswal S, et al. Sildenafil inhibits superoxide formation and prevents endothelial dysfunction in a mouse model of secondhand smoke induced erectile dysfunction. *The Journal of Urology*. American Urological Association; 2009 Feb;181:899–906.
41. Ayala JE, Bracy DP, Julien BM, Rottman JN, Fueger PT, Wasserman DH. Chronic treatment with sildenafil improves energy balance and insulin action in high fat-fed conscious mice. *Diabetes*. 2007;56:1025–33.
42. Abdollahi M, Bahreini-Moghadam A, Emami B, Fooladian F, Zafari K. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2003 Jul;135:331–6.
43. Schäfer A, Fraccarollo D, Pförtsch S, Flierl U, Vogt C, Pfrang J, et al. Improvement of vascular function by acute and chronic treatment with the PDE-5 inhibitor sildenafil in experimental diabetes mellitus. *British Journal of Pharmacology*. 2008 Mar;153:886–93.
44. Muzaffar S, Shukla N, Srivastava A, Angelini GD, Jeremy JY. Sildenafil citrate and sildenafil nitrate (NCX 911) are potent inhibitors of superoxide formation and gp91phox expression in porcine pulmonary artery endothelial cells. *British Journal of Pharmacology*. 2005 Sep;146:109–17.
45. Swain U, Rao KS. Study of DNA damage via the comet assay and base excision repair activities in rat brain neurons and astrocytes during aging. *Mechanisms of Ageing and Development*. Elsevier Ireland Ltd; 2011 Aug;132:374–81.
46. Dalboni SP, Campagnaro BP, Tonini CL, Vasquez EC, Meyrelles SS. The concurrence of hypercholesterolemia and aging promotes DNA damage in apolipoprotein E-deficient mice. *Open Journal of Blood Diseases*. 2012;2:51–5.
47. Campagnaro BP, Tonini CL, Nogueira B V, Casarini DE, Vasquez EC, Meyrelles SS. DNA damage and augmented oxidative stress in bone marrow mononuclear cells from angiotensin-dependent hypertensive mice. *International Journal of Hypertension*. 2013;2013:10.
48. Tonini CL, Campagnaro BP, Louro LPS, Pereira TMC, Vasquez EC, Meyrelles SS. Effects of aging and hypercholesterolemia on oxidative stress and DNA damage in bone marrow mononuclear cells in apolipoprotein E-deficient mice. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013 Jan;14:3325–42.

49. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 1988;175:184–91.
50. Końca K, Lankoff A, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, Gózdź S, et al. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutation Research*. 2003 Jan 10;534:15–20.
51. Izzotti A. DNA damage and alterations of gene expression in chronic-degenerative diseases. *Acta Biochimica Polonica*. 2003;50(1):145–54.
52. Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, Clempus RE, Szöcs K, Sorescu GP, et al. Superoxide production and expression of Nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*. 2002 Mar 4;105:1429–35.
53. Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, Webb RC. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension*. 2001;38:1107–11.
54. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury part II: animal and human studies. *Circulation*. 2003 Oct 28;108:2034–40.
55. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*. 2003 Oct 21;108:1912–6.
56. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovascular Research*. 2006 Jul 15;71:247–58.
57. Porto ML, Lima LCF, Pereira TMC, Nogueira B V, Tonini CL, Campagnaro BP, et al. Mononuclear cell therapy attenuates atherosclerosis in apoE KO mice. *Lipids in Health and Disease*. BioMed Central Ltd; 2011 Jan;10:155.
58. Nuttall SL, Dunne F, Kendall MJ, Martin U. Age-independent oxidative stress in elderly patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *QJM: An International Journal of Medicine*. 1999 Jan;92(1):33–8.
59. Mahmoudi M, Mercer J, Bennett M. DNA damage and repair in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*. 2006 Jul 15;71:259–68.
60. Maluf SW. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clinica Chimica Acta*. 2004 Sep;347:15–24.
61. Palyvoda O, Polańska J, Wygoda A, Rzeszowska-Wolny J. DNA damage and repair in lymphocytes of normal individuals and cancer patients: studies by the comet assay and micronucleus tests. *Acta Biochimica Polonica*. 2003 Jan;50(1):181–90.

62. Rajeswari N, Ahuja YR, Malini U, Chandrashekar S, Balakrishna N, Rao K V, et al. Risk assessment in first degree female relatives of breast cancer patients using the alkaline comet assay. *Carcinogenesis*. 2000;21(4):557–61.
63. Flouris GA, Arvanitis DA, Parissis JT, Arvanitis DL, Spandidos DA. Loss of heterozygosity in DNA mismatch repair genes in human atherosclerotic plaques. *Molecular Cell Biology Research Communications*. 2000 Jul;4:62–5.
64. Grati FR, Ghilardi G, Sirchia SM, Massaro F, Cassani B, Scorza R, et al. Loss of heterozygosity of the NOS3 dinucleotide repeat marker in atherosclerotic plaques of human carotid arteries. *Atherosclerosis*. 2001 Dec;159:261–7.
65. Kiaris H, Hatzistamou J, Spandidos DA. Instability at the H-ras minisatellite in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*. 1996 Aug 23;125:47–51.
66. McCaffrey TA, Du B, Consigli S, Szabo P, Bray PJ, Hartner L, et al. Genomic instability in the type II TGF-beta1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 1997 Nov 1;100(9):2182–8.
67. Spandidos DA, Ergazaki M, Arvanitis D, Kiaris H. Microsatellite instability in human atherosclerotic plaques. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996 Mar 7;220:137–40.
68. Kockx MM, Herman AG. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovascular Research*. 2000 Feb;45:736–46.
69. Lutgens E, De Muinck ED, Kitslaar PJEHM, Tordoir JHM, Wellens HJJ, Daemen MJAP. Biphasic pattern of cell turnover characterizes the progression from fatty streaks to ruptured human atherosclerotic plaques. *Cardiovascular Research*. 1999 Feb;41:473–9.
70. Kockx MM, De Meyer GRY, Muhring J, Jacob W, Bult H, Herman AG. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1998 Jun 16;97:2307–15.
71. Senzaki H, Smith CJ, Juang GJ, Isoda T, Mayer SP, Ohler A, et al. Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. *The FASEB Journal*. 2001;15:1718–26.
72. Sebkhii A, Strange JW, Phillips SC, Wharton J, Wilkins MR. Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 2003 Jul 1;107:3230–5.
73. Koupparis AJ, Jeremy JY, Muzaffar S, Persad R, Shukla N. Sildenafil inhibits the formation of superoxide and the expression of gp47phox NAD[P]H oxidase induced by the thromboxane A2 mimetic, U46619, in corpus cavernosal smooth muscle cells. *BJU International*. 2005;96:423–7.



74. Ozkanlar S, Akcay F. Antioxidant vitamins in atherosclerosis - animal experiments and clinical studies. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2012;21(1):115–23.
75. Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current Pharmaceutical Design*. 2004;10(14):1677–94.
76. Colasanti M, Suzuki H. The dual personality of NO. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2000;21(July):1998–2001.
77. Morihara N, Sumioka I, Ide N, Moriguchi T, Uda N, Kyo E. Aged garlic extract maintains cardiovascular homeostasis in mice and rats. *The Journal of Nutrition*. 2006;136:777S–81S.
78. Shinde U, Mehta A, Goyal R. Nitric oxide: a molecule of the millennium. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2003;38(3):201–10.
79. Tang X-Q, Fang H-R, Zhou C-F, Zhuang Y-Y, Zhang P, Gu H-F, et al. A novel mechanism of formaldehyde neurotoxicity: inhibition of hydrogen sulfide generation by promoting overproduction of nitric oxide. *PLOS One*. 2013 Jan;8(1):e54829.
80. Tousoulis D, Papageorgiou N, Briasoulis A, Androulakis E, Charakida M, Tsiamis E, et al. Conflicting effects of nitric oxide and oxidative stress in chronic heart failure: potential therapeutic strategies. *Heart Failure Reviews*. 2012 Jan;17:65–79.
81. Hrabarova E, Juranek I, Soltes L. Pro-oxidative effect of peroxynitrite regarding biological systems: a special focus on high-molar-mass hyaluronan degradation. *General Physiology and Biophysics*. 2011;30:223–8.
82. Nichols DJ, Muirhead GJ, Harness JA. Pharmacokinetics of sildenafil citrate after single oral doses in healthy male subjects: absolute bioavailability, food effects and dose proportionality. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2002;53:5S–12S.
83. Das A, Durrant D, Mitchell C, Mayton E, Hoke NN, Salloum FN, et al. Sildenafil increases chemotherapeutic efficacy of doxorubicin in prostate cancer and ameliorates cardiac dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(42):18202–7.
84. García-Cardoso J, Vela R, Mahillo E, Mateos-Cáceres PJ, Modrego J, Macaya C, et al. Increased cyclic guanosine monophosphate production and endothelial nitric oxide synthase level in mononuclear cells from sildenafil citrate-treated patients with erectile dysfunction. *International Journal of Impotence Research*. 2010;22(1):68–76.
85. Siednienko J, Nowak J, Moynagh PN, Gorczyca WA. Nitric oxide affects IL-6 expression in human peripheral blood mononuclear cells involving cGMP-

- dependent modulation of NF- $\kappa$ B activity. *Cytokine*. Elsevier Ltd; 2011 Jun;54:282–8.
86. Li J, Yang S, Billiar TR. Cyclic nucleotides suppress tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by inhibiting caspase activation and cytochrome c release in primary hepatocytes via a mechanism independent of Akt activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000 Apr 28;275(17):13026–34.
  87. Dussault S, Maingrette F, Ménard C, Michaud S-E, Haddad P, Groleau J, et al. Sildenafil increases endothelial progenitor cell function and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic apolipoprotein E deficient mice. *Hypertension*. 2009 Nov;54:1043–9.
  88. Belpaeme K, Cooreman K, Kirsch-Volders M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutation Research*. 1998 Jul 31;415:167–84.
  89. Fadini GP, Agostini C, Sartore S, Avogaro A. Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2007 Sep;194:46–54.
  90. Lima LCF, Porto ML, Campagnaro BP, Tonini CL, Nogueira B V, Pereira TMC, et al. Mononuclear cell therapy reverts cuff-induced thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Lipids in Health and Disease*. *Lipids in Health and Disease*; 2012 Jan;11:96.
  91. Curfs DMJ, Beckers L, Godschalk RWL, Gijbels MJJ, Van Schooten FJ. Modulation of plasma lipid levels affects benzo[a]pyrene-induced DNA damage in tissues of two hyperlipidemic mouse models. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2003 Jan;42:243–9.