MARCEL LIBERMAN

**Caracterização e mecanismos do desequilíbrio redox na
fisiopatologia da estenose valvar aórtica degenerativa**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Cardiologia

**Orientador: Prof. Dr. Francisco Rafael
Martins Laurindo**

**São Paulo
2007**

*“Para (ter) uma mente completa,
Estude a arte da ciência,
Estude a ciência da arte,
Aprenda a enxergar,
Perceba que tudo se conecta a tudo.”*

Leonardo Da Vinci

À Flávia

Aos meus pais Ruth e Alberto

À minha irmã Thaísa

Aos meus avós Rachel e Moisés, Sara e Jacob

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo, pela demonstração de paixão à ciência, motivação, orientação diária e incançável, a quem devo grande parte de minha formação pessoal e científica.

Ao Prof. Dr. Protásio Lemos da Luz, quem primeiro me incentivou a ingressar na pós-graduação.

À Dra. Fernanda Knudsen, por me ajudar a trilhar os primeiros passos no Laboratório de Biologia Vascular.

À Sra. Leonora Loppnow, por sua dedicação pessoal e profissional aos experimentos.

Aos alunos de iniciação científica Estêvão Bassi e Marina Kamla Martinatti, que me motivaram ao ensino e, sem os quais, grande parte deste trabalho não seria possível.

Ao Dr. Fábio de Cerqueira Lario, que dividiu noites com nossa equipe para a realização da ecodopplercardiografia dos coelhos.

Ao Prof. Dr. Pablo Pomerantzeff, por contribuir com as valvas de pacientes com estenose aórtica submetidos à cirurgia.

À Dra. Léa Maria Macruz F. Demarchi, à técnica Solange Consorti e à Profa. Dra. Maria de Lourdes Higushi do Serviço de Patologia do InCor, pelo inestimável apoio técnico na coleta de valvas aórticas de autópsias e processamento histológico das amostras.

Ao diretor e aos técnicos do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital, que permitiram a coleta de valvas aórticas durante as autópsias.

Aos técnicos da Divisão de Experimentação do InCor e ao Leonardo Tanaka pela ajuda com o protocolo experimental e pelas inúmeras contribuições.

Às técnicas Carol e Beth e à Profa. Dra. Helena Nader do Departamento de Bioquímica da UNIFESP, que ajudaram na realização das imagens em microscópio confocal.

À Dra. Célia Maria C. Strunz, pela análise bioquímica do plasma dos coelhos no Laboratório de Análises Clínicas do InCor.

À Dra. Ana Lúcia Garippo, Ângela Batista dos Santos, Maria Cristina Medeiros e à Profa. Dra. Thaís Mauad, pela dedicação aos experimentos de imunohistoquímica.

Ao Dr. Carlos E. Rochitte, por aceitar o desafio de analisar a calcificação arterial pela tomografia de multi-detectores.

Ao Dr. Paulo F. Leite, pelas idéias iniciais de meu projeto de doutoramento.

Ao Dr. Heraldo Possolo de Souza, pelas sugestões de experimentos que valorizaram ainda mais este trabalho.

Às Dras. Vanda Jorgetti do Departamento de Nefrologia e Cláudia Zerbini do Instituto de Ortopedia da FMUSP, pela doação de lâminas de calvária de rato e de osso humano, além de sugestões para a identificação de osteoblastos e osteoclastos nas valvas.

Ao Prof. Dr. Hugo P. Monteiro que cedeu seu laboratório no Cintergen da UNIFESP para a realização de alguns experimentos.

Ao Victor Debbas, pelo convívio e dedicação aos estudos de Western blotting.

Aos colegas João Wosniak e Denise Fernandes que me ajudaram em experimentos de RT-PCR.

Aos Drs. Célio X. Santos e Cláudia R. de Andrade, pela orientação nos experimentos, uso de programas gráficos e formatação da tese.

À Maria Bertollini, pelo inestimável auxílio no preparo de soluções e em alguns experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Vascular: Angélica, Antônio Marcus, Flávia, Laura, Luciana, Leonardo Tanaka, Márcia, Maria Cristina, Vanda e Viviane, pelo companheirismo, amizade, respeito, ensinamento e apoio nos experimentos.

Ao Dr. Francis J. Miller Jr., da Universidade de Iowa (EUA), por me ensinar pessoalmente as técnicas de microfluorotopografia de detecção do superóxido pela hidroetidina.

Este projeto recebeu apoio financeiro da FAPESP e CNPq Milênio Redoxoma.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Calcificação e aterosclerose	4
1.2 Disfunção endotelial na aterosclerose e papel de processos redox	6
1.3 Calcificação vascular e valvar	9
1.4 Antioxidantes	21
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Reagentes	28
3.2 Valvas aórticas humanas	30
3.3 Modelo experimental in vivo	32
3.4 Modelo experimental in vitro	48
4. ESTATÍSTICA	55

5. RESULTADOS	57
5.1 Valvas aórticas humanas	58
5.2 Modelo experimental in vivo	62
5.3 Modelo de calcificação in vitro	85
6. DISCUSSÃO	89
7. CONCLUSÕES	102
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

APÊNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	One way analysis of variance (análise de variância)
Ao	Aorta
AVA	Área valvar aórtica
BMP	Proteína morfogênica de osso
BSA	Soro fetal bovino
β-GP	Beta-glicerofosfato
Cbfa-1	Core-binding factor alpha subunit 1
cDNA	Ácido desoxiribonucleico fita complementar
CO_3^-	Radical carbonato
CVC	Células vasculares calcificadoras
CV	Coeficiente de variação
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
DCF-DA	Diclorofluoresceína-diacetato
DEPC	Dietil pirocarbonato
DHE	Dihidroetídio
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DTPA	Pento-acetato-dietileno-triamina
DTT	Ditiotreitol
EBCT	Electron beam computerized tomography (tomografia de multi-detectors)
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EVA	Estenose valvar aórtica degenerativa
FBS	Soro fetal bovino
FC	Frequência cardíaca
FE	Fração de ejeção
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade

H&E	Hematoxilina-eosina
HE	Hidroetidina
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN-γ	Interferon- γ
IL-1	Interleucina-1
IRC	Insuficiência renal crônica
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MGP	Proteína ácido glutâmico de matriz ou proteína γ -carboxiglutâmico de matriz
MCSF-1	Macrophage colony stimulating factor-1
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato em sua forma reduzida
$\cdot\text{NO}$	Óxido nítrico
$\text{O}_2\cdot^-$	Ânion radical superóxido
OCT Tissue Tek®	Crio-embebbing compound (meio inclusão para congelação)
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxila
ONOO^-	Peroxinitrito
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
PA	Pressão arterial
PBS	Salina tampão fosfato
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDI	Proteína dissulfeto isomerase
Peg- Cat	Catalase-peguilada
Peg-SOD	Superóxido dismutase-peguilada
PP	Parede posterior
qsp	Quantidade suficiente para
RAM-11	Rabbit aortic macrophage-11
RANK	Ativador do receptor de (NF)kB
RANK-L	Ligante de RANK
RASM	Células musculares lisas de coelho (linhagem imortalizada)
PCR quantitativa	Reação de polimerase em cadeia em tempo real

RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SEM	Erro padrão da média
SIV	Septo interventricular
SOD	Superóxido dismutase
TGFβ	Transforming growth factor β
TNFα	Transforming growth factor α
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
UA	Unidades arbitrárias
UH	Unidades de Hausfield
UI	Unidades internacionais
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
USG	Ultrassonografia
VA	Valva(r) aórtica
VE	Ventrículo esquerdo
Vit. D₂	Vitamina D ₂
Vit. D₃	Vitamina D ₃
VSMC	Células musculares lisas vasculares

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Formas de calcificação vascular, manifestações clínicas mais frequentes e fatores de risco da população geral e com IRC para calcificação . 10

Quadro 2 - Sequência de primers, condições de reação de PCR e seus produtos 47

Quadro 3 - Sequência de primers, condições de reação de PCR quantitativo e seus produtos 48

LISTA DE TABELAS

Tabelas 1 A e B - Valores de peso (g), colesterol total, cálcio total, fósforo, creatinina (mg/dl) e produto CaxP (mg^2xdl^2) séricos dos coelhos antes (basal - A) e ao final de 12 semanas de protocolo (mês 3 - B) 64

Tabelas 2 A e B - Dados ecocardiográficos antes (A) e ao final (B) do protocolo (basal e mês 3) 67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráficos 1 (A à F) - Representação gráfica de peso, colesterol total, cálcio total, fósforo, produto cálcioxfósforo e creatinina sérica antes (basal) e ao final do protocolo experimental em coelhos (mês 3)	63
Gráfico 2 - Pressão arterial (PA) sistólica, diastólica e pressão de pulso dos animais ao final do protocolo	64
Gráficos 3 (A à D) - Representação gráfica das variáveis ecocardiográficas antes (basal) e ao final do protocolo (mês 3)	65
Gráficos 3 (E à J) - Representação gráfica das variáveis ecocardiográficas antes (basal) e ao final do protocolo (mês 3)	66
Gráfico 4 - Atenuação de segmentos de aorta ao Raio-X submetidos à tomografia de muti-detectores	80
Gráfico 5 A, B e C - Calcificação tecidual (A), infiltração macrofágica (B) e colágeno tecidual (C) das cúspides aórticas de coelhos	81
Gráfico 6 - Expressão RNA mensageiro (Nox4/Nox1) por PCR quantitativo .	84
Gráfico 7 - Concentração de cálcio após 14 dias de cultura de células musculares lisas de coelho com estímulo calcificador, além de tempol e ácido lipóico	86
Gráfico 8 - Efeito do peróxido de hidrogênio exógeno (50µM) na mineralização em cultura de células musculares lisas vasculares submetidas a estímulo calcificador	86

Gráfico 9 A e B - Mensuração dos produtos de oxidação do DHE através de HPLC (A) e atividade da NAD(P)H oxidase em fração de membrana (B)	87
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Principais células e mecanismos moleculares envolvidos na síntese e reabsorção óssea	17
Figura 2 - Microscopia óptica de valvas aórticas humanas (H&E e Verhoeff-Van Gieson)	58
Figura 3 A - Fluorescência da DHE em valvas aórticas humanas por microscopia confocal e gráfico de quantificação	59
Figura 3 B - Imunohistoquímica para as subunidades da NAD(P)H oxidase p22phox e Nox2 (anticorpos da Santa Cruz®) em valvas aórticas humanas	60
Figura 4 - Imunohistoquímica para Nox2 (anticorpo monoclonal clone 54.1) da NAD(P)H oxidase em valvas humanas	60
Figura 5 - Imunohistoquímica para osteopontina em valvas aórticas humanas	61
Figura 6 - Imunohistoquímica para Cbfa-1 em valvas aórticas humanas	62
Figura 7 - Imagens ecocardiográficas das valvas aórticas de coelhos em plano transversal ao final (mês 3) do protocolo	67
Figura 8 A, B e C - Macroscopia da via de saída de VE de coelhos no plano longitudinal e dos ventrículos no plano transversal	68
Figura 9- A, B e C - Cúspides aórticas de coelhos cortadas longitudinalmente e coradas com H&E (A), Verhoeff-Van Gieson (B) e Tricrômio de Masson (C)	69

Figura 10 - Imunohistoquímica para macrófagos (MØ) em valvas aórticas de coelho com anticorpo anti-RAM-11	70
Figura 11 - Fluorescência do DHE nas cúspides aórticas de coelho em microscopia confocal	71
Figura 12 - Visualização dos núcleos celulares nas cúspides aórticas de coelho com DAPI e quantificação por campo	72
Figura 13 - Produtos de oxidação da DCF-DA nas valvas aórticas de coelho por microscopia confocal	73
Figura 14 - Imunohistoquímica para 3-nitrotirosina, NAD(P)H oxidase (p22phox e Nox2) e sua subunidade reguladora PDI em valvas aórticas de coelho	74
Figura 15 - Co-localização da p22phox com Nox2 e PDI na região de calcificação (C) em valvas aórticas de coelho por microscopia confocal	75
Figura 16 A e B - RT-PCR para Nox1, Nox4 e osteopontina	76
Figura 17 A e B - Células vasculares calcificadoras (CVC) em torno da calcificação	77
Figura 18 A – Apoptose em valvas aórticas de coelhos pelo método de TUNEL	77
Figura 18 B – Proliferação celular nas cúspides aórticas de coelhos (anticorpo Ki-67)	78
Figura 19 – Efeito dos antioxidantes na expressão de nitrotirosina	83

Figura 20 A à D - Espectroscopia paramagnética por ressonância de elétrons do plasma dos coelhos após 3 meses de protocolo	85
---	-----------

Figura 21 - Western-blotting para osteopontina de lisados celulares (cultura de células musculares lisas vasculares primárias de aorta de coelho) após estímulo calcificador por 14 dias	88
---	-----------

Liberman, M. **Caracterização e mecanismos do desequilíbrio redox na fisiopatologia da estenose valvar aórtica degenerativa.** São Paulo, 2007. 132p.

Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A fisiopatologia da estenose valvar aórtica (VA) degenerativa é semelhante à aterosclerose, na qual o estresse oxidativo é relevante. Postulamos que o estresse oxidativo contribui para a progressão da calcificação e estenose VA. Em um modelo de calcificação VA em coelhos, investigamos a topografia da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e os efeitos dos antioxidantes tempol e ácido lipóico na progressão da calcificação. Coelhos Nova Zelândia machos foram alimentados com Vit. D₂ 10³ UI/dia + colesterol 0,5% por 12 semanas na ausência (HCD, N=34) ou presença de tempol 100 µmol/kg/dia (HCDT, N=15) ou ácido lipóico 120 µmol/kg/dia (HCDL, N=11), somente colesterol 0,5% (HC, N=9) ou ração normal (Normal, N=32). Coelhos HCD, HCDL e HCDT tiveram infiltração macrofágica e calcificação VA e arterial. Superóxido e H₂O₂, detectados respectivamente pela microtopografia da hidroetidina ou diclorofluoresceína e a imunoreatividade da 3-nitrotirosina, estavam aumentados não apenas nas células inflamatórias, mas preferencialmente, ao redor dos núcleos de calcificação. Tempol aumentou, enquanto o ácido lipóico diminuiu os sinais do H₂O₂. Esta sub-população de células vasculares calcificadoras, que expressam osteopontina e Cbfa-1, tiveram aumento da expressão das subunidades da NAD(P)H oxidase p22phox e Nox2 e de sua reguladora, a proteína dissulfeto isomerase, que co-localizaram. Houve um aumento da expressão de RNA_m de Nox4 em relação ao RNA_m de Nox1 nos coelhos HCD e particularmente nos HCDT vs Normal e HCDL por PCR quantitativo. Paralelamente, a calcificação VA e da aorta, avaliada pela ecocardiografia, tomografia computadorizada de multi-detecores e pela histologia diminuiu com o ácido lipóico, mas aumentou com o tempol (análise de variância, p≤0,05). Tempol ainda aumentou a apoptose e diminuiu a proliferação celular e a expressão de osteopontina vs HCD. VA humanas foram adquiridas em autópsias de indivíduos jovens com VA normais (N=6), idosos com esclerose VA (N=4) ou durante a substituição cirúrgica de VA com estenose (N=5). Encontramos aumento semelhante de ERO e da expressão protéica em torno dos núcleos de calcificação. O modelo *in vitro* de calcificação de células musculares lisas vasculares também demonstrou maior produção de superóxido que diminuiu com tempol e ácido lipóico. Além disso, houve aumento da calcificação com tempol e também com a incubação de H₂O₂ exógeno, mas não com ácido lipóico. Portanto, a produção de ERO está aumentada ao redor dos núcleos de calcificação tanto nas VA humanas, como dos coelhos do protocolo experimental, associado à expressão de, pelo menos, Nox2 e Nox4. Entretanto, determinadas ERO e isoformas das Nox envolvidas podem determinar efeitos distintos na progressão da calcificação VA e vascular.

Descritores: estenose da valva aórtica, calcinose, estresse oxidativo, antioxidantes, coelhos.

Liberman, M. **Characterization and mechanisms of redox imbalance in pathophysiology of degenerative aortic valve stenosis.** São Paulo, 2007. 132p.

Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Pathogenesis of degenerative aortic valve (AV) stenosis is analogous to atherosclerosis, for which oxidative stress is relevant. We hypothesized that oxidative stress contributes to progression of AV calcification/stenosis. In a rabbit AV calcification model, we investigated topography of reactive oxygen species (ROS) production and effects of antioxidants tempol and lipoic acid in calcification progression. Male New Zealand rabbits were fed Vit. D₂ 10³ IU/day + cholesterol 0.5% for 12 weeks in the absence (HCD, N=34) or presence of tempol 100 µmol/kg/day (HCDT, N=15) or lipoic acid 120 µmol/kg/day (HCDL, N=11), cholesterol 0.5% only (HC, N=9) or regular chow (Normal, N=32). HCD, HCDL and HCDT rabbits developed AV/vascular macrophage infiltration and calcification. Superoxide and H₂O₂, detected respectively by hydroethidine or dichlorofluorescein microtopography, and 3-nitrotyrosine immunoreactivity, were increased not only in inflammatory cells but preferentially around calcifying nuclei. Tempol increased, while lipoic acid decreased H₂O₂ signals. This subpopulation of calcifying vascular cells, which express osteopontin and Cbfa-1, had increased expression of NAD(P)H oxidase subunits p22phox and Nox2, and of oxidase regulator protein disulfide isomerase, which were co-localized. Real-time PCR showed switch from Nox1 to Nox4 mRNA expression in HCD and particularly in HCDT vs Normal and HCDL rabbits. Importantly, AV/aorta calcification, assessed by echocardiography, multidetector-row computed tomography and histology, decreased with lipoic acid but increased with tempol (ANOVA, p≤0.05). Tempol further enhanced apoptosis and decreased proliferation/osteopontin expression vs HCD. Human AV were collected from autopsied young individuals with normal valve (N=6), elderly with valve sclerosis (N=4) and patients undergoing replacement due to stenosis (N=5). We found analogous increases in ROS production and protein expression around calcifying nuclei. An *in vitro* model of vascular smooth muscle cell calcification also exhibited greater superoxide production that decreased with tempol and lipoic acid. Importantly, there was increase in Ca²⁺ deposit with tempol, as well as exogenous H₂O₂ incubation, but not with lipoic acid. Thus, ROS production is markedly increased around calcifying nuclei in human or experimental AV calcification, associated with at least Nox2 and Nox4 expression. However, the specific ROS or Nox isoform involved might dictate the effect in calcification progression.

Descriptors: aortic valve stenosis, calcinosis, oxidative stress, antioxidants, rabbits.

1. INTRODUÇÃO

A estenose valvar aórtica degenerativa (EVA) afeta aproximadamente 3% da população com mais de 75 anos e 8,9% das pessoas com mais de 85 anos de idade (SELZER, 1987; LINDROOS et al., 1993). É a terceira patologia cardiovascular mais prevalente nos Estados Unidos da América após a hipertensão arterial sistêmica e a doença arterial coronária. A esclerose aórtica é a lesão precursora da estenose valvar e atinge de 21 a 26% da população maior de 65 anos de idade, chegando à prevalência de mais de 40% naqueles acima de 80 anos (STEWART et al., 1997; LINDROOS et al., 1993). A história natural da EVA severa sintomática determina a morte em 100% dos casos em menos de 5 anos. Por outro lado, a substituição valvar cirúrgica, único tratamento hoje conhecido (BONOW et al., 1998; CARABELLO, 2002), pode ser indicada a uma parcela restrita dos pacientes, devido ao risco cirúrgico elevado desta população, explicado pela associação da idade avançada e várias comorbidades e fatores de risco cardiovasculares. Assim, a grande maioria dos pacientes não sofre intervenção, tendo um prognóstico reduzido. Além disso, a estenose e a esclerose aórtica são marcadores independentes de aterosclerose (BRANCH et al., 2002), mortalidade por qualquer causa e de morbimortalidade cardiovascular (OTTO et al., 1999). Com o aumento da sobrevida média da população brasileira¹, o acréscimo de cidadãos à faixa etária geriátrica deverá tornar esta doença ainda mais importante do ponto de vista sócio-econômico, onerando o sistema público e privado de saúde. O esclarecimento da fisiopatologia da doença é

¹ Fonte: Censos demográficos do IBGE, 2000

um alvo relevante, visando a futura sugestão de formas terapêuticas e/ou de sua profilaxia (PEARLMAN, 2002).

Ao final da década de 1990, estudos mostrando desdiferenciação celular em osteoblastos e expressão de proteínas específicas de regulação da deposição e reabsorção óssea mostraram que existe um processo ativo regulado de ossificação em valvas humanas calcificadas de etiologia degenerativa, em placas de aterosclerose de carótidas e material de valvuloplastia por balão. Estes avanços têm negado cada vez mais a teoria de que a estenose aórtica seria uma doença por “uso e desgaste” (MONCKEBERG 1904; ROBERTS, 1986). Ao contrário, tais evidências sugerem que a EVA é uma doença com semelhanças à aterosclerose (O'BRIEN et al., 1996; OTTO et al., 1994; O'BRIEN et al., 2002), associado a um processo de calcificação estruturado em proteínas de regulação específicas (CHEN et al., 2002).

Estudos clínicos retrospectivos demonstraram que a estenose valvar aórtica compartilha vários fatores de risco em comum com a aterosclerose, com respeito a: idade, sexo, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, diabetes melito, obesidade, tabagismo e insuficiência renal crônica (MAHER et al., 1987; ARONOW et al., 1987; BRAUNWALD, 1992; STEWART et al., 1997; BOON et al., 1997; Wilmshurst et al., 1997; RALLIDIS et al., 1998; WIERZBICKI e SHETTY, 1999; ADLER et al., 2000A; ADLER et al., 2000B; MOHLER III, 2000; PALTA et al., 2000; AGMON et al., 2001; ARONOW et al., 2001; CHUI et al., 2001; NASSIMIHA et al., 2001; NGO et al., 2001; POHLE et al., 2001; DEMER et al., 2002; HISAR et al., 2002; TOLSTRUP et al., 2002). Somando-se a isso, estudos epidemiológicos demonstram que aproximadamente 50% dos pacientes com estenose aórtica possuem doença arterial coronária. Estudos retrospectivos identificaram uma

redução da progressão da estenose valvar aórtica e da calcificação em pacientes hipercolesterolêmicos com o uso de estatinas, drogas inibidoras da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA redutase) (ARRONOW et al., 2001; NOVARO et al., 2001; SHAVELLE et al., 2002; BELLAMY et al., 2002, ROSENHEK et al., 2004). Em coelhos submetidos a dieta rica em colesterol, a atorvastatina diminuiu a proliferação celular (macrófagos), acúmulo de colesterol e expressão de proteínas de matriz óssea e da osteopontina na valva aórtica (RAJAMANNAN et al., 2002). Estes efeitos são acompanhados por aumento da apoptose (RAJAMANNAN et al., 2001) pela técnica de TUNEL (WIJSMAN et al., 1993), semelhante ao que acontece na aterosclerose do vaso (KINSCHERF et al., 1999) e na doença arterial coronária (BENNETT, 1999). Entretanto, estudos prospectivos mostraram resultados conflitantes. O uso de atorvastatina em pacientes normolipidêmicos não reduziu a velocidade de progressão da estenose valvar aórtica (COWELL et al., 2005), enquanto que a rosuvastatina diminuiu tal desfecho em pacientes (não randomizados) hipercolesterolêmicos com EVA moderada em comparação a normocolesterolêmicos (MOURA et al., 2007).

1.1 Calcificação e aterosclerose

A calcificação é a via final comum de um processo inflamatório crônico e pode ocorrer em diversas patologias como na presença de corpo estranho, de microorganismos como o *Mycobacterium tuberculosis*, na sarcoidose, em tumores e na aterosclerose. Além disso, em situações de desequilíbrio do produto cálcio x fósforo séricos, como na insuficiência renal crônica, hiperparatireoidismo, mieloma

múltiplo, tumores ósseos e na doença de Paget, a calcificação ectópica também é comum. A significância clínica da calcificação arterial não é totalmente compreendida, porém o acometimento calcífico das artérias coronárias é identificado em 75-95% das autópsias, independentemente da *causa mortis* (WADA et al., 2000). Apesar de a calcificação coronária estar relacionada a maior risco de infarto do miocárdio e maior incidência de eventos adversos durante a revascularização miocárdica percutânea e cirúrgica, normalmente a rotura da placa aterosclerótica em um evento coronariano agudo (infarto agudo do miocárdio ou angina instável) não prevalece em locais muito calcificados do vaso, mas sim em placas com componente lipídico predominante, sugerindo que a calcificação pode, ao menos em certos casos, ser um mecanismo de atenuação do processo inflamatório (YAMANAKA et al., 2002). A estenose valvar aórtica degenerativa (EVA) é uma forma de aterosclerose valvar, onde a calcificação tem papel fundamental, pois diminui a mobilidade das cúspides, o que culmina com a obstrução ao fluxo sanguíneo do ventrículo esquerdo para a aorta. Foi demonstrado que o tecido valvar sofre um processo inflamatório organizado e muito semelhante à aterosclerose do vaso (OTTO et al., 1994; GALANTE et al., 2001), incluindo a disfunção do endotélio e rotura da membrana basal subjacente (KWON et al., 1998), migração de macrófagos e linfócitos T, formação de células espumosas, secreção de interleucinas, fatores de crescimento e proteínas como a osteopontina, acúmulo de colágeno, lípidos e mineralização extracelular (EDWARDS, 1988; SARIG et al., 1994; O'BRIEN et al., 1996; DEMER, 2001; KIZER et al., 2001; FARZANEH-FAR et al., 2001; ADLER et al., 2002A; ADLER et al., 2002B).

1.2 Disfunção endotelial na aterosclerose e papel de processos redox

Um dos aspectos mais marcantes da aterosclerose e de outras doenças vasculares é a ocorrência de disfunção do endotélio vascular. Esta disfunção pode ser descrita como uma alteração dos mecanismos de sinalização redox, cuja via final comum é a perda da bioatividade do óxido nítrico (NO) [CAI e HARRISON, 2000], devido ao excesso de produção e/ou inadequada remoção do radical superóxido. O $\text{O}_2^{\cdot -}$ reage com o NO , gerando espécies secundárias potencialmente tóxicas e altamente reativas como, por exemplo, o ânion peroxinitrito e o radical dióxido de nitrogênio (SQUADRITO e PRYOR, 1998). A produção de superóxido não é acidental, porém controlada por enzimas. Tais vias redox podem agir como segundos mensageiros de processos intracelulares de sinalização que resultam em proliferação, migração, diferenciação, apoptose ou sobrevivência celular (IRANI e GOLDSCHMIDT-CLERMONT, 1998; ABE e BERK, 1998; IRANI, 2000). Ou seja, parte substancial, se não a predominante, do componente redox da aterosclerose advém da maior produção de espécies reativas secundária a estes eventos celulares (HARRISON et al., 2003). Além disso, um contexto adicional é a chamada “teoria oxidativa da aterogênese”, que postula que um evento inicial da aterogênese é a oxidação da partícula de LDL-colesterol, que leva à sua captação por macrófagos via receptores “scavenger”, dando origem a células espumosas e deflagrando secreção de citocinas pró-inflamatórias, expressão de moléculas de adesão e agressão a células endoteliais. (STEINBERG et al., 1989; STEINBRECHER et al., 1990; WITZTUM e STEINBERG, 1991). A disfunção endotelial é um evento precoce e marcador de aterosclerose (ANDERSON et al., 1995A; ANDERSON et al., 1995B). Pacientes

com esclerose valvar aórtica têm reduzida dilatação mediada por fluxo ao USG (POGGIANTI et al., 2003).

Dentre as fontes enzimáticas do radical superóxido, a NAD(P)H oxidase é uma das principais em células vasculares e miócitos (GRIENDLING e USHIO-FUKAI, 1997; GRIENDLING et al., 2000A). A enzima catalisa a reação de doação de 1 elétron do NADH ou NADPH para o oxigênio (O₂):

Inicialmente identificada no neutrófilo (BABIOR, 1999), compõe-se de dois grupos de subunidades que se localizam em diferentes microambientes da célula: primeiro, o citocromo b558 na membrana de vesícula secretora é formado pelas subunidades gp91phox (Nox2) e p22phox, e segundo, componentes citosólicos como p40phox, p47phox, p67phox e a proteína G de baixo peso molecular rac2 (em algumas células rac1). Em células vasculares, os níveis de expressão da oxidase, bem como sua atividade, são bem mais baixos do que no fagócito. Na célula endotelial, a subunidade catalítica b558 também se compõe pela p22phox e gp91phox (GÖRLACH et al., 2000). Já na célula muscular lisa do vaso, a subunidade de membrana é composta pela p22phox (USHIO-FUKAI et al., 1996) e por outra molécula de transferência de elétrons análoga à gp91phox (GÖRLACH et al., 2000). Inicialmente pesquisada em carcinoma de cólon humano, a Nox1 (“non phagocytic oxidase”), um homólogo da gp91phox, também foi encontrada na célula muscular lisa da aorta de camundongos (GÖRLACH et al., 2000). Outros tipos de Nox foram descobertos em células de diferentes tecidos, por exemplo: Nox2 (que é a própria gp91phox em endotélio e fibroblasto), Nox3, Nox4 (célula muscular lisa, endotélio, e fibroblasto; possui função inibitória da proliferação e está envolvida na diferenciação

celular). A expressão aumentada de subunidades e de distintas isoformas da NAD(P)H oxidase foi documentada na aterosclerose no homem (SORESCU et al. 2001) e em modelos experimentais (SZOCS et al. 2002). Dentre os mecanismos de ativação da NADH/NAD(P)H oxidase vascular citam-se: a angiotensina II, trombina, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}\beta$, interleucina-1, fator de ativação plaquetário, força de arraste (“shear stress”) laminar e, principalmente, oscilatória (GRIENDLING e USHIO-FUKAI, 2000). Ao contrário da NAD(P)H oxidase do neutrófilo, que produz um “burst” de superóxido quando estimulada, a enzima localizada na célula do vaso parece ter um papel constitutivo, ou seja, libera pequenas quantidades de superóxido continuamente (de 10 a 20 vezes menos), sendo capaz de aumentar sua síntese (induzível) por substâncias já citadas por um tempo mais prolongado comparativamente à do neutrófilo (horas *versus* minutos respectivamente). Portanto, no vaso, o superóxido parece estar implicado na sinalização intracelular e transcrição gênica (SEN e PACKER, 1996; SUZUKI et al., 1997; KUNSCH e MEDFORD, 1999; SUZUKI et al., 1999; ALLEN e TRESINI, 2000; GRIENDLING et al., 2000B; BRANDES et al., 2002). Assim, o O_2^- pode fazer a transdução de sinal após a ligação de uma molécula a seu receptor de membrana, ativando, por exemplo, a família das MAPKs (mitogen-activated protein kinase), que controlam a resposta de crescimento, apoptose e sinais de estresse da célula (GRIENDLING e USHIO-FUKAI, 1998; GRIENDLING e USHIO-FUKAI, 2000).

1.3 Calcificação vascular e valvar

A calcificação vascular e valvar, previamente considerada uma condição degenerativa passiva do envelhecimento, é caracterizada hoje como um processo de biomineralização ativo e complexamente regulado, semelhante à osteogênese (BOSTROM et al., 1995). No cenário epidemiológico, a calcificação vascular aumenta com a idade, aterosclerose, insuficiência renal (GOODMAN, 2001; MASSY et al., 2005; WOLISI e MOE, 2005), diabetes *melitus*, hipercolesterolemia, osteoporose, menopausa e falta de atividade física. A calcificação das coronárias detectada por EBCT tem valor preditivo positivo quanto à morbidade e mortalidade cardiovascular em pacientes assintomáticos com risco intermediário (WILSON et al., 2001; WAYHS et al., 2002; RAGGI et al., 2000). A calcificação da aorta abdominal está associada a um risco aumentado de doenças e mortalidade cardiovascular mesmo quando ajustado para idade (WILSON et al., 2001). Além disso, o produto $\text{Ca}^{+2} \times \text{PO}_4$ plasmático está associado positivamente a altas concentrações de proteína C reativa (PCR) em pacientes com insuficiência renal crônica durante a hemodiálise (MOVILLI et al., 2005). Pacientes tratados com hipolipemiantes orais (como as estatinas) apresentaram maiores áreas calcificadas de placas ateroscleróticas em comparação com controles (ZHAO et al., 2001; LIBBY e AIKAWA, 1998; VAUGHAN et al., 2000; BROWN et al., 1993) e a calcificação extensa aparenta estabilizar a lesão (VLIENGENTHART et al., 2005), diminuindo a inflamação, o risco de rotura, os eventos cardiovasculares e, inclusive, os cerebrovasculares (HUNT et al., 2002). A ossificação heterotópica das valvas cardíacas segue essencialmente o mesmo processo da calcificação vascular (MOHLER III, 2000; MOHLER III et al.,

2001). Ao contrário de valvas controles, aquelas com calcificação expressam fosfatase alcalina e metaloproteinase-2 de matriz (JIAN et al., 2001). A calcificação é essencial para a progressão da estenose valvar aórtica e também pode ser quantificada por EBCT (KIZER et al., 2001).

1.3.1 Formas de calcificação vascular

Apesar dos elementos em comum e da coexistência de certas características, pode-se didaticamente classificar a calcificação vascular segundo o tipo de lesão, como descrito no quadro 1:

Quadro 1 - Formas de calcificação vascular, manifestações clínicas mais frequentes e fatores de risco da população geral e com IRC para calcificação

Lesão	Manifestação clínica	Possíveis fatores de risco na população geral	Possíveis fatores de risco em pacientes com IRC
Aterosclerose: placas ou lesões circunferenciais	Doença arterial coronária, arritmia, morte súbita, doença vascular periférica, estenose da artéria renal	Predisposição genética, tabagismo, hipertensão arterial, diabetes, dislipidemia, inflamação	Os tradicionais, além dos distúrbios do metabolismo ósseo, produtos de glicação avançados (AGEs), estresse oxidativo e inflamação
Calcificação da média	Aumento da pressão de pulso, isquemia de múltiplos órgãos, estenose valvar aórtica	Diabetes, envelhecimento	Diabetes, envelhecimento, distúrbios do metabolismo ósseo, AGEs, estresse oxidativo e inflamação
Arteriopatia calcífica urêmica (calcifilaxia)	Lesões isquêmicas de pele	Não observados	Distúrbios do metabolismo ósseo, especialmente hiperfosfatemia, obesidade, sexo feminino e raça branca

Fonte: adaptado de WOLISI e MOE, 2005.

1.3.2 Mecanismos celulares e moleculares da calcificação vascular

Corroborando com a hipótese de um processo ativo e organizado, a calcificação vascular é caracterizada pela presença de estruturas vesiculares na matrix de tecidos ossificados e de placas ateroscleróticas (KOCKX et al., 1998). Essas vesículas de matriz são estruturas ligadas por membranas que se desprendem de condrócitos e osteoblastos, normalmente encontrados em cartilagens e ossos, cuja função é a de nucleação e crescimento de cristais de cálcio (ANDERSON, 1983). Além disso, a existência de proteínas específicas de osso em placas ateroscleróticas como a osteopontina (OPN), o Cbfa-1 (core-binding factor-1_ um marcador específico de diferenciação osteoblástica), a osteoprotegerina (OPG), a proteína morfogênica do osso-2 (BMP-2), proteína carboxiglutâmica ácida de matriz (MGP ou proteína ácido glutâmico de matriz), fosfatase alcalina e o ligante do receptor ativador de NF-kappaB (RANKL) comprova a existência de reguladores *in situ* de formação e reabsorção óssea (DOHERTY et al., 2004).

Células musculares lisas vasculares primárias (VSMC) incluem subpopulações de células com diferentes fenótipos. Conforme as VSMC em cultura iniciam a diferenciação osteogênica (Figura 1), elas perdem a expressão de marcadores específicos de músculo liso (STEITZ et al., 2001), indicando uma desdiferenciação celular. Uma subpopulação das VSMC expressa espontaneamente proteínas de osso e produz uma matriz mineralizada em cultura semelhante à de osteoblastos (BOSTROM et al., 1995; WATSON KE et al., 1994). Essa subpopulação, chamada de “células vasculares calcificadoras” (CVC) retêm a habilidade de se diferenciar em outras linhagens mesenquimais, além de osteoblastos (TINTUT et al., 2003). VSMC humanas também expressam 25-hidroxivitamina D₃-

1 α -hidroxilase, que pode ter sua expressão aumentada quando são cultivadas com paratormônio (PTH) e compostos estrogênicos (SOMJEN et al., 2005).

Além das VSMC, pericitos estão envolvidos na calcificação vascular (DOHERTY et al., 1998) e angiogênese (figura 1). Existem evidências de que os pericitos podem agir como células progenitoras e são capazes de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e VSMC; células semelhantes aos pericitos foram encontradas na íntima, média e nas vasa vasorum de grandes artérias.

Osteoclastos são células grandes e multinucleadas derivadas de monócitos/macrófagos responsáveis pela reabsorção óssea (MATSUZAKI et al., 1998) que ajudam a restaurar a concentração plasmática de Ca^{+2} . Sua formação e função dependem da secreção de MCSF-1 e RANKL/RANK que promovem a expressão da cascata de inibição da NF κ B quinase (IKK), c-Jun N-terminal quinase (JNK), p38, quinase reguladora de sinais extracelulares (ERK) e da via do Src, seguidas da ativação da CATK (colagenase), TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato) e da $\alpha\text{v}\beta 3$ (integrina) (BOYLE et al., 2003). Para que a ligação e a digestão do osso sejam perfeitas, a produção de superóxido pela NAD(P)H oxidase dos osteoclastos é necessária (KEY JR et al., 1990; KEY JR et al., 1994; STEINBECK et al., 1994; DARDEN et al., 1996; YANG et al., 1998). Foi demonstrado que a inibição da produção osteoclástica de superóxido leva a diminuição da reabsorção óssea (DARDEN et al., 1996; RIES et al., 1992). O uso de interferon- γ como ativador da NAD(P)H oxidase corrige a reabsorção óssea no camundongo com microftalmia e osteopetrose (RODRIGUIZ et al., 1993). Mesmo na doença granulomatosa crônica, na qual o gene da gp91phox (Nox2) está parcial ou totalmente deletado, há um aumento da expressão de Nox4, com a intenção de

restaurar uma quantidade suficiente de superóxido e, assim, manter a função osteoclástica (YANG et al., 2001). Por outro lado, o NO inibe a formação, migração e atividade do osteocalsto (MACINTYRE et al., 1991; RALSTON e GRABOWSKI, 1996; HOLLIDAY et al., 1997; MANCINI et al., 1998; COLLIN-OSDOBY et al., 2000) e a inibição da NO sintase aumenta a osteoclastogênese e a reabsorção óssea (KASTEN et al., 1994). O RANKL, quando ativado, estimula a NO sintase, o que denota um mecanismo de contra-regulação da formação e atividade osteoclástica (ZHENG et al., 2006).

A BMP-2, um membro da superfamília do TGF β é um potente fator para a diferenciação de osteoblastos e sua presença na placa aterosclerótica sugere que a calcificação arterial é um processo ativamente regulado, semelhante à formação óssea (BOSTROM et al., 1993; BOSTROM et al., 1995).

A MGP, primeiramente identificada como uma proteína de matriz óssea (PRICE et al., 1983; OTAWARA e PRICE, 1986; MORI et al., 1998; SWEATT et al., 2003), tem características ímpares, por causa de seu tamanho reduzido e por uma modificação pós-traducional de seu resíduo de glutamina através de γ -carboxilação, o que parece ser importante para sua função (LOESER e WALLIN, 1992). Ela é encontrada em artérias normais e sua expressão encontra-se aumentada na placa aterosclerótica (SHANAHAN et al., 1994). Em células musculares lisas da aorta de ratos, a expressão de MGP aumenta mediante ao acréscimo da concentração de cálcio extracelular (FARZANEH-FAR et al., 2000). Estes achados sugerem que a MGP participa da regulação homeostática, limitando a mineralização dos tecidos. Camundongos que não expressam MGP apresentam extensa calcificação aórtica, em que a parede da aorta é substituída por cartilagem calcificada (LUO et al., 1997).

Logo, a MGP impede diretamente a formação dos minerais de cálcio. Evidências recentes indicam que a MGP inibe a diferenciação de células mesenquimais para uma linhagem osteogênica por seqüestrar o BMP-2, um potente fator osteogênico, e, assim, impossibilita sua ligação aos receptores (BOSTROM, 2001; WALLIN et al., 2000; ZEBBOUDJ et al., 2002). O efeito da MGP na BMP-2 depende do grau de γ -carboxilação (WALLIN et al., 2000) e da razão entre as concentrações dessas duas proteínas (ZEBBOUDJ et al., 2003). A γ -carboxilação da MGP é realizada por uma γ -carboxilase dependente de Vitamina K. A deficiência funcional de Vitamina K pode aumentar a calcificação vascular por gerar uma γ -carboxilação incompleta da MGP e, assim, reduzir sua função. Em mulheres menopausadas, a presença de calcificação vascular está associada a menor consumo de Vitamina K (JIE et al., 1995). Como a varfarina é um inibidor da Vitamina K, esta pode interferir na atividade da MGP e acelerar a calcificação vascular.

A osteoprotegerina, um inibidor da osteoclastogênese, atua como um receptor solúvel para um ligante de superfície de osteoblastos (RANKL) que, normalmente, interage com o receptor ativador do NF- κ B em preosteoclastos (RANK) e estimula a osteoclastogênese. A osteoprotegerina se assemelha ao RANK e ocupa os sítios do RANKL para prevenir a estimulação de preosteoclastos (SIMONET et al., 1997). Além de a osteoprotegerina ter um importante papel de regulação no tecido ósseo, ela também possui função regulatória nos vasos. O RANKL e a osteoprotegerina são expressos em lesões ateroscleróticas iniciais (DHORE et al., 2001) e em células endoteliais da microvasculatura (COLLIN-OSDOBY et al., 2001). A osteoprotegerina também é secretada por células musculares lisas, o que é inibido pela ciclosporina (HOFBAUER et al., 2001). Camundongos deficientes em

osteoprotegerina desenvolvem osteoporose e calcificação vascular simultaneamente (BUCAI et al., 1998). Em um modelo de calcificação vascular induzida por varfarina em ratos e doses tóxicas de Vitamina D, a osteoprotegerina parece inibir significativamente a mineralização (PRICE et al., 2001). De forma intrigante, os níveis de osteoprotegerina são maiores em mulheres com diabetes e com maior mortalidade cardiovascular, mas não em casos de menor densidade óssea ou fraturas (BROWNER et al., 2001).

A osteopontina é uma proteína de matriz que contém um domínio RGD pelo qual se liga às células via integrina α -v, β -3, atuando como um potente inibidor da calcificação. A osteopontina é uma proteína altamente fosforilada e glicosilada descoberta originalmente nos ossos, mas recentemente identificada também em lesões vasculares e valvares calcificadas (MOHLER III et al., 1997; O'BRIEN et al., 1995). A OPN está associada com a aterosclerose (IKEDA et al., 1993; FITZPATRICK et al., 1994), colocalizando com placas calcificadas (GIACHELLI et al., 1993; HIROTA et al., 1993). Este mesmo grupo mostrou que esta proteína é expressa por macrófagos, células musculares lisas e endoteliais na placa (O'BRIEN et al., 1994). Os níveis plasmáticos de OPN são significativamente maiores em pacientes com doença arterial coronária, aumentando progressivamente com a severidade da doença, independentemente dos fatores de risco convencionais (OHMORI et al., 2003). A OPN inibe diretamente a mineralização de células musculares lisas de aorta de bovinos em cultura (WADA et al., 1999) e a calcificação da valva aórtica *in vivo* (STEIZ et al., 2002), provavelmente por sua agregação aos cristais de hidroxiapatita através de sequências específicas de aminoácidos (GOLDSMITH et al., 2002). A fosforilação da OPN é necessária para seu efeito

inibitório da calcificação (JONO et al., 2000B). A habilidade da osteopontina em bloquear o crescimento dos cristais de hidroxiapatita pode ter importante significado fisiológico e patológico. A OPN também tem a capacidade de interferir na calcificação e estimular a reabsorção óssea, devido a sua ligação à α -v, β -3 de osteoclastos, o que leva a uma menor concentração de cálcio citosólico e induz a ativação de osteoclastos e um fenótipo reabsortivo (MIYAUCHI et al., 1991). Novas evidências de Steitz et al. sugerem que esta ligação também promove a reabsorção por induzir a expressão da anidrase carbônica II, o que é fundamental para criar um ambiente ácido necessário à reabsorção. Em camundongos normais, há uma regressão da calcificação concomitantemente ao acúmulo de OPN e de células semelhantes a osteoclastos em tecidos cardiovasculares transplantados (STEITZ et al., 2002). A OPN recombinante também induz a reabsorção de tecido ósseo implantado em músculo (ASOU et al., 2001). Camundongos deficientes em OPN e MGP têm calcificação aórtica acelerada quando comparados com aqueles deficientes somente em MGP, fato consistente com o conceito de que a OPN inibe a mineralização (SPEER et al., 2002). O fenótipo de duplo *knockout*, com camundongos OPN^{-/-} e apoE^{-/-} varia com o gênero. Os machos exibem aumento da calcificação vascular em relação aos controles e aos exclusivamente apoE^{-/-}, mas sem diferença na aterosclerose aórtica. Ao contrário, as fêmeas apresentam menor aterosclerose aórtica em comparação às controles. Esses achados fornecem perspectivas de que a aterosclerose e a calcificação vascular *in vivo* podem ter pelo menos alguns mecanismos de regulação independentes (MATSUI et al., 2003).

Figura 1 - Principais células e mecanismos moleculares envolvidos na síntese e reabsorção óssea

Legenda: + = estímulo positivo; - = estímulo negativo.

Fonte: SHIOI et al., 1995; JONO et al., 1998; SHIOI et al., 2000; WALLIN et al., 2001; DEMER et al., 2002; BOYLE et al., 2003; ABEDIN et al., 2004; DOHERTY et al., 2004; SPEER et al., 2004; TRION e LAARSE VAN DER, 2004; Giachelli et al., 2005; MASSY et al., 2005; SHAO et al., 2006.

1.3.3 Estresse oxidativo e calcificação vascular

Pesquisas têm demonstrado que moléculas inflamatórias ou ligadas ao estresse oxidativo podem amplificar o processo de desdiferenciação de células musculares lisas. Por exemplo, estudos *in vitro* mostraram que lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas, algumas citocinas inflamatórias [como fator- α de necrose de tumoral (TNF α) e interleucina-1 (IL-1)] estimulam desdiferenciação de células musculares lisas em um fenótipo ósseo (PARHAMI et al., 1997; TINTUT et al., 2000; MODY et al., 2001; YAMAGISHI et al., 1999). PARHAMI e DEMER, 1997 mostraram um efeito dose-dependente de LDL oxidado e de diferentes produtos de peroxidação de lipídica na desdiferenciação de células vasculares em osteoblastos. É possível que este efeito seja produzido não apenas por produtos de peroxidação

lipídica, mas também por estresse oxidativo. MODY et al., 2001 relataram que o peróxido de hidrogênio e a xantina/xantina oxidase aumentaram espécies reativas de oxigênio intracelularmente, o que também induziu a desdiferenciação de células vasculares lisas em osteoblastos; este processo foi bloqueado por antioxidantes exógenos. Outra demonstração deste fato é a ativação de ERK1/2 e de JUNKinase, mas não da p38kinase, através de via redox após estímulo de células endoteliais microvasculares e fibroblastos cardíacos com angiotensina II, IL1- β e TNF α que aumentaram a expressão de osteopontina (XIE et al., 2004). Produtos de glicação avançada (marcadores de glico-oxidação) podem estimular a diferenciação de pericitos em osteoblastos e contribuir para o desenvolvimento da calcificação vascular (YAMAGISHI et al., 1999). Ao contrário, lipoproteínas de alta densidade (HDL) inibem a desdiferenciação (PARHAMI et al., 2002). Esta ação inibitória do HDL é reproduzida por lipídeos extraídos de HDL, mas não por HDL associado a apolipoproteínas ou por HDL reconstituído (PARHAMI et al., 2002). Interessantemente, a oxidação do HDL o torna pró-osteogênico (PARHAMI et al., 2002). SAKATA et al., 2003 demonstraram a co-localização da pentosidina (um marcador de glico-oxidação) com depósitos de cálcio na camada média de aortas não ateroscleróticas de cadáveres não diabéticos previamente em hemodiálise.

A reabsorção óssea por osteoclastos também depende da ativação da NAD(P)H oxidase para a perfeita atividade da anidrase carbônica, adesão e função osteoclástica (como discutido acima).

1.3.4 Modelos experimentais de calcificação vascular e valvar

O modelo animal mais comum de calcificação vascular, estudado há mais de 40 anos é baseado na hipervitaminose D isolada (HASS et al., 1960; HONG et al., 1995; MORTENSEN et al., 1993; NIEDERHOFFER et al., 1997). Diversas doses e formas de administração foram descritas, embora a maioria tenha usado curtos períodos de tempo com quantidades potencialmente tóxicas de Vitamina D, resultando em hipercalcemia aguda. O tratamento crônico menos tóxico também resultou em calcificação metastática e deterioração da função renal (MORTENSEN et al., 1993). Em termos gerais, a Vitamina D resulta em calcificação da parede arterial e em uma variedade de outras alterações “ateroscleróticas”. A perda de colágeno e o rompimento das fibras de elásticas são eventos adicionais (NIEDERHOFFER et al., 1997). Estas mudanças são normalmente associadas com aumento da rigidez aórtica (NIEDERHOFFER et al., 1997).

Outro modelo de calcificação vascular envolve a aplicação tópica de CaCl_2 (0,5 M) na aorta de coelhos (GERTZ et al., 1988) ou de outros animais (ratos e camundongos). Os segmentos de artéria submetidos ao CaCl_2 se tornam aneurismáticos, com calcificação da média, inflamação, calcificação da elastina e degradação e desorganização da matriz extracelular, além de ativação de metaloproteinases de matriz (BASALYGA et al., 2004).

O único modelo que tentou reproduzir a estenose valvar aórtica, no qual foi utilizado a hipercolesterolemia isolada (RAJAMANNAN et al., 2001; RAJAMANNAN et al., 2002) em coelhos ou em camundongos *knockout* para apoE, não resultou em um gradiente de pressão significativo entre o ventrículo esquerdo e a

aorta e nem mesmo uma expressiva calcificação valvar. DROLET et al., 2003 publicaram um novo modelo de estenose valvar aórtica, baseado em uma dieta hipercolesterolêmica (0,5% de colesterol) e hipervitaminose D (50000 UI/dia de ergocalciferol na água de beber) por 12 semanas. 80% destes animais desenvolveram diminuição significativa da AVA e aumento no gradiente de pressão (Ao-VE) após o protocolo, além de extensa calcificação vascular e valvar.

O modelo *in vitro* de calcificação de células musculares lisas vasculares foi primeiramente publicado por WATSON et al., 1994, que isolaram células vasculares calcificadoras através cultura de células musculares lisas bovinas, em que nódulos multicelulares apareciam espontaneamente. Além de expressarem osteopontina, osteonectina, colágeno 1, demonstrarem atividade de fosfatase alcalina aumentada e produzirem osteocalcina e hidroxipatita, estas células foram estimuladas a formar um número maior de nódulos de calcificação especialmente quando expostas ao oxisterol 25-hidroxicolesterol, assim como à TGF β 1, ambos presentes em placas ateroscleróticas. Este modelo foi aperfeiçoado através da incubação destas células com um doador de fosfato inorgânico, o β -glicerofosfato (10mmol/l), resultando em calcificação difusa após 14 dias de cultura (SHIOI et al., 1995). A mineralização diminuiu com o uso de levamisol, um inibidor específico da fosfatase alcalina. Além disso, quando se adicionou 1,25-dihidroxivitamina D₃ juntamente com o β -glicerofosfato nas células musculares lisas vasculares em cultura, a calcificação aumentou progressivamente (dose-dependente), principalmente pela diminuição da expressão do peptídeo endógeno semelhante ao hormônio da paratiróide (PTHrP) nestas células, que é um inibidor endógeno da calcificação vascular (JONO et al., 1998). Além disso, o efeito estimulatório da 1,25(OH)D₃ na atividade da fosfatase

alcalina e a expressão da osteopontina podem contribuir para sua ação promotora da calcificação vascular. LI et al., 2006 mostraram que o Pit-1, um cotransportador de fosfato dependente de sódio do tipo III, é muito importante para a mineralização de células incubadas em meio rico em fosfato (JONO et al., 2000A).

Células isoladas de válvulas cardíacas humanas também sofrem desdiferenciação em osteoblastos e conduzem à mineralização pelos mesmos fatores que promovem a calcificação vascular *in vitro* (Mohler III et al., 1999).

1.4 Antioxidantes

1.4.1 Ácido Lipóico

O ácido α -lipóico é um composto descoberto em 1937, inicialmente como um suplemento essencial para bactérias extraído de extrato de batata, mas isolado apenas em 1951. É um cofator do complexo multienzimático que cataliza a descarboxilação de α -ceto ácidos como o piruvato e α -cetoglutarato, pouco solúvel em água e com boa solubilidade em solventes orgânicos. É absorvido prontamente em todo o trato gastrointestinal em 30-60 minutos e sua biodisponibilidade é de aproximadamente 25-30%; tem boa partição em meio aquoso e lipídico, podendo então agir nesta interface. É metabolizado no fígado e excretado na urina. Sua capacidade antioxidante se deve principalmente ao ácido α -lipóico (reage com radicais hidroxila,

hipocloroso, oxigênio singlete, quelante de metais Cu^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2}) e a sua forma reduzida, o ácido dihidrolipóico (reage com radicais peroxil, hipocloroso, hidroxila, recicla ascorbato, glutatona, coenzima Q e inibe a ativação do NF- κ B), além de outros compostos formados a partir de sua metabolização hepática (PACKER et al., 1995; PACKER et al., 2001). O ácido dihidrolipóico pode reduzir o radical tocoferil e outros antioxidantes como o ascorbato e a glutatona, o que inibe mecanismos de peroxidação lipídica por permitir a reciclagem da Vitamina E. Também tem a capacidade de reduzir grupos tióis da tioredoxina, uma proteína de regulação redox intracelular difusamente expressa, que está relacionada a proliferação celular, atividade anti-apoptótica e modulação do NF- κ B (SEN e PACKER, 1996). O ácido dihidrolipóico também pode ter ação pró-oxidante principalmente através da redução de metais de transição e pela geração de radical hidroxila. Alguns estudos sugerem que o ácido dihidrolipóico pode reagir com o superóxido (constante de reação na ordem de 10^{-5}), porém não há consenso quanto a esta hipótese. O ácido lipóico e seus metabólitos parecem não reagir diretamente, mas diminuem a concentração plasmática do peróxido de hidrogênio em modelos *in vivo* (SKIBSKA et al., 2006), através de mecanismos ainda pouco conhecidos, além de atenuar seu efeito deletério (DELLA CROCE et al., 2003).

1.4.2 Tempol

O tempol (4-hydroxi-2, 2, 6, 6-tetrametilpiperidina-1-oxila), um radical livre estável, hidrossolúvel, permeável a membranas, tem propriedades antioxidantes: é um mimético da superóxido dismutase independente de metal, faz a terminação de reações radicalares em cadeia, detoxificação de complexos heme-ferril e a oxidação de metais reduzidos (Fe^{+2} e Cu^{+}) que são potenciais efetores da formação de espécies reativas de oxigênio (OFFER et al., 2000). É um nitróxido cíclico de baixo peso molecular que tem sido usado como um aduto para detecção de superóxido (IANNONE et al., 1989; NILSSON et al., 1989). São descritos efeitos biológicos como: redução de lesões provocadas por isquemia-reperfusão (GELVAN et al., 1991), de inflamação (KARMELI et al., 1995), supressão da nitração de proteínas em modelos de falência múltipla de órgãos, ação em modelos de radiação mediadas por superóxido (MITCHEL et al., 1991) e normalização da pressão arterial em ratos SHR (SCHNACKENBERG et al., 1998; SCHNACKENBERG e WILCOX, 1999). Estudos *in vitro* sobre a interação entre o tempol e o peroxinitrito demonstraram que o nitróxido é um eficiente inibidor catalítico da nitração de fenol por peroxinitrito, além de favorecer a nitrosação do mesmo (BONINI et al., 2002; CARROLL et al., 2000). O tempol pode reagir eficientemente com os radicais derivados do peroxinitrito, especialmente com o $\text{CO}_3^{\cdot -}$ (BONINI et al., 2002). O mecanismo sugerido é a oxidação do tempol pelo radical; o produto pode oxidar o peroxinitrito e regenerar o tempol, formando $\cdot\text{NO}$. Este, por sua vez, reagiria com o $\cdot\text{NO}_2$ pela decomposição do peroxinitrito formando o agente nitrosante N_2O_3 . Portanto, a proteção conferida pelo tempol em modelos de inflamação poderia ocorrer não só

pela atividade mimética da SOD, que previne a formação de peroxinitrito, mas também, pela decomposição catalítica do peroxinitrito para o agente nitrosante N_2O_3 .

1.5 Hipótese

Até o momento, escassos estudos existem a respeito das ERO na fisiopatologia da EVA (OLSSON et al., 1999; MEHRABI et al., 2000; MEHRABI et al., 2002). Em particular, os sistemas enzimáticos produtores de ERO são desconhecidos em valvas. A principal hipótese do estudo é se progressão da mineralização valvar em pacientes com estenose valvar aórtica degenerativa e, em paralelo do modelo de EVA *in vivo* em coelhos e de células musculares lisas em cultura diante de um estímulo calcificador, é regulada por processos de sinalização redox. Tais mecanismos envolveriam a diferenciação de células musculares lisas em osteoblastos ou CVC, além de um possível controle na expressão de proteínas de calcificação e da atividade funcional de osteoclastos, que influenciem o metabolismo ósseo (mineralização e reabsorção).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo amplo deste estudo é entender a possível participação de processos redox na fisiopatologia da calcificação e estenose valvar aórtica. Os objetivos específicos envolvem: avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio, a expressão e topografia de subunidades da NAD(P)H oxidase e de marcadores de estresse oxidativo/nitrativo em valvas aórticas humanas com estenose/esclerose, em valvas aórticas do modelo experimental *in vivo* e em células musculares lisas submetidas a um estímulo calcificador (modelo *in vitro*). Adicionalmente, examinamos no modelo experimental *in vivo* e *in vitro* o efeito dos compostos antioxidantes tempol e ácido lipóico no processo de calcificação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

A água utilizada em todos os experimentos foi tratada com o sistema “Nanopure” da Barnstead. A maioria dos reagentes e sais era de grau analítico ou superior e foram adquiridos da Sigma Chemical., St Louis, MO, EUA. O formaldeído 37% era da Quimex, Brasil. Isopentano, 3-Aminopropil-trietoxi-silano, tripsina, colesterol, Vitamina D₂, Vitamina D₃, β -glicerofosfato, superóxido dismutase peguilada, a catalase peguilada, o 4-hidroxi Tempol (tempol), naftol AS-MX fosfato, fast red TR, DAPI e o ($\pm$)- α -ácido lipóico foram da Sigma Chemical, MO, EUA. OCT Tissue Tek da Fisher Scientific, NJ. DHE e DCF-DA da Molecular Probes, Inc, Eugene, OR, EUA. Os meios de cultura DMEM e F12, a solução de penicilina (100mg/ml) e estreptomicina (100 mg/ml) e a tripsina foram obtidos da Gibco BRL-Life Technologies (Grand Island, NY, EUA), enquanto que o soro fetal bovino (FBS) foi da Cultilab. O anticorpo monoclonal anti-osteopontina foi obtido junto a Universidade de Iowa, IA, EUA e outro da Santa Cruz Biotechnology Inc. O anticorpo policlonal (cabra) contra Cbfa-1 foi também da Santa Cruz Biotechnology Inc. O anticorpo monoclonal RAM-11 era da DakoCytomation, EUA. Os anticorpo policlonais anti-Nox 2 e anti-p22phox foram da Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, EUA e outro anti-Nox 2 (monoclonal clone 54.1) foi gentilmente cedido gentilmente pelo Dr. Burritt da Universidade de Montana, EUA. O anticorpo monoclonal anti-nitrotirosina era da Upstate Cell Signaling Solutions, EUA. O anticorpo anti-PDI foi

da Stressgen, EUA e o anti-Ki-67 (proteína nuclear de proliferação celular) da Novocastra LTD, Reino Unido. O anticorpo secundário contra cabra foi o kit Vectastain Elite ABC System-Mouse da Vector Laboratories, Califórnia, EUA. O anticorpo secundário contra camundongo foi o kit Vectastain Elite ABC System-Mouse da Vector Laboratories, Califórnia, EUA e o Envision⁺System Mouse e a 3,3-Diaminobenzidine (DAB) foi da DakoCytomation, EUA. A Hematoxilina de Harris e a resina para microscopia Entellan foram da Merck, Darmstadt, Alemanha. Para imunofluorescência, utilizamos os anticorpos secundários contra cabra com fluoresceína ou rodamina e contra camundongo com rodamina, todos da Calbiochem, Merck Biosciences. O kit para identificação de apoptose foi o “In Situ Cell Death Detection Kit” da Roche Applied Science. A DNase foi da Promega Corporation. Os kits para transcriptase reversa, PCR, Trizol e a proteinase K eram da Invitrogen Corporation, EUA. Para Western-blotting, foi utilizado o anticorpo primário monoclonal anti- β -actina (IgG de camundongo, clone AC-15) da Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA, o anti-osteopontina (já citado) e o anti-osteoprotegerina da Santa Cruz. O anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase foi da Amersham Pharmacia Biotech, EUA e o anti-cabra conjugado com peroxidase da KPL. O coquetel de inibidores de protease e NADPH foram da Calbiochem da Merck (Darmstadt, Alemanha) e a lucigenina da Molecular Probes. Para a dosagem de cálcio na cultura celular, utilizamos o kit “Calcium Reagent Set” da Teco Diagnostics, EUA.

3.2 Valvas aórticas humanas

O segmento humano teve 3 subgrupos: um de pacientes com valva normal (N=6) entre 18 e 35 anos de idade, outro com valva aórtica espessada (esclerose) macroscópica, porém sem estenose significativa que possuam idade maior ou igual a 65 anos (N=4) e uma terceira população de indivíduos que se submeteram à substituição da valva por estenose e repercussão clínica (N=5).

3.2.1 Critérios de inclusão:

A) Autópsias habituais de cadáveres humanos, que se deram para o esclarecimento de “causa mortis”, por indicação do médico responsável, de acordo com a rotina do SVOC (Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Faculdade de Medicina da USP-SP); B) necrópsias efetuadas no Serviço de Patologia Clínica do InCor (Instituto do Coração) da Faculdade de Medicina da USP-SP, sempre respeitando normas técnicas e éticas, sem provocar danos, mutilação ao cadáver ou perturbar a rotina do serviço e C) durante cirurgias de troca valvar aórtica estenótica (etiologia degenerativa), realizadas no centro cirúrgico do InCor, por indicação clínica do médico responsável, sem retardar o procedimento cirúrgico ou prejudicar o paciente.

As cúspides das valvas aórticas foram conservadas em solução de Krebs gelada, fixadas em formaldeído 4% tamponado por 24hs e, a seguir, emblocadas em parafina para posterior análise. Uma das cúspides foi congelada em OCT (Tissue-

Tek®) e nitrogênio líquido para análise do tecido “a fresco” após secção em criostato a -20°C.

3.2.2 Critérios de exclusão:

A) pacientes que aguardaram mais de 6hs para serem submetidos à autópsia; B) evidência ecocardiográfica de dupla lesão aórtica (insuficiência aórtica moderada/importante); C) indivíduos que tenham sofrido trauma torácico com conseqüente acometimento direto do coração; D) sinais de vegetação valvar aórtica que sugira endocardite infecciosa ou lesão por lúpus eritematoso sistêmico; E) fusão das cúspides ou anatomia que evidencie probabilidade de doença reumática; F) valva aórtica bicúspide; G) presença de prótese da valva ou do arco aórtico; H) evidência clínica de hipercolesterolemia familiar como xantomas/xantelasma aterosclerose vascular difusa ou valores de colesterol total >400 mg/dl ou LDL >250 mg/dl na ausência de tratamento medicamentoso; I) paciente com diabetes juvenil; J) diagnóstico de dissecação aórtica aguda ou crônica do tipo A; L) presença de aneurisma de aorta ascendente; M) demonstração de estenose subvalvar ou pós-valvar; N) evidência de tumor intracardíaco ou paracardíaco que envolva o anel e/ou valva aórtica.

Foram realizados estudos morfológicos, dos índices de estresse oxidativo, imunohistoquímica conforme protocolos descritos a seguir.

3.3 Modelo experimental in vivo

Coelhos da raça Nova Zelândia com 2500-3000g foram mantidos em gaiolas individuais em ambiente claro/escuro (12/12hs), temperatura controlada, sob dieta limitada a 100g de ração e 200 ml de água por dia por 12 semanas (3 meses). Foram divididos em 5 grupos: Normal (**N=32**), HC (**N=9**), HCD (**N=34**), HCDT (**N=15**) e HCDL (**N=11**), que receberam respectivamente ração padrão, dieta hipercolesterolêmica 0,5%, dieta hipercolesterolêmica+ergocalciferol, dieta hipercolesterolêmica+ergocalciferol+tempol 100 $\mu\text{mol/kg/dia}$ e dieta hipercolesterolêmica+ergocalciferol+($\pm$)- α -ácido lipóico 120 $\mu\text{mol/kg/dia}$. Os grupos Normal e HC eram considerados controles, pois o primeiro é composto de coelhos sem quaisquer alterações na dieta/sistema cardiovascular e o segundo de animais com hipercolesterolemia e aterosclerose, algum espessamento valvar, porém sem demonstrar calcificação e/ou esclerose/estenose aórtica. Já os coelhos HCD sabidamente desenvolvem calcificação, esclerose e discreta estenose valvar aórtica (Drolet, 2003). Os coelhos foram sacrificados com dose letal de pentobarbital após 12 semanas. Parte da valva aórtica foi congelada “a fresco” em OCT Tissue Tek® e mantida em freezer -80°C, enquanto a outra metade foi incluída em parafina após fixação do tecido por 24hs em fomaldeído 10% tamponado.

3.3.1 Pesagem dos coelhos

Os animais eram pesados no início e ao final do protocolo em balança digital Metler Toledo (precisão 1g).

3.3.2 Preparo da dieta hipercolesterolêmica

À ração padrão para coelhos (Nuvilab, Brasil) foi adicionado colesterol 0,5% peso/peso. O preparo era feito a cada 10-15 dias, através da diluição de colesterol em uma solução final de aproximadamente 800ml, sendo composta de etanol absoluto ou a 92,8% (2/3 volume) e éter (1/3 volume). Após aquecimento para melhor mistura, a solução era espalhada sobre a dieta homogeneamente, aguardando-se 24hs para secagem. Então, porções individuais de 100g eram pesadas e acondicionadas em freezer -20°C.

3.3.3 Preparo do suplemento de Vitamina D₂

Diariamente, doses incrementais de ergocalciferol (de 3500 à 10000 UI ao final das 12 semanas de protocolo) eram diluídas na água de beber (200 ml/dia), acrescido de 600 µl de etanol absoluto (este último também administrado aos controles- grupos Normal e HC).

3.3.4 Preparo do tempol

O 4-hidroxi Tempo 100 µmol/kg/dia (17mg/kg/dia= $\sim$ 51mg/dia/coelho) foi diluído diretamente na água (solução final=200ml/dia). O bebedouro foi protegido da luz com filme escuro.

3.3.5 Preparo do ácido lipóico

O ácido lipóico 120 $\mu\text{mol/kg/dia}$ (25mg/kg/dia= $\sim$ 75mg/dia/coelho) foi dissolvido inicialmente em etanol 2ml e administrado ao coelho na água de beber (solução final=200ml/dia). O etanol também foi administrado concomitantemente aos demais coelhos.

3.3.6 Mensuração da pressão arterial invasiva

Após anestesiá-lo o animal com pentobarbital, a artéria carótida direita foi dissecada, isolada e amarrada distalmente com fio de algodão. Um catéter de material plástico semi-rígido (não elástico) foi introduzido até a aorta ascendente e fixado. O mesmo foi ligado a um transdutor de pressão localizado na altura do animal e calibrado previamente ao zero. Todos os coelhos foram hidratados com 50ml salina 0,9% e, então, pressão arterial sistólica (PAs), diastólica (PAd) e média (PAm), além da FC foram calculadas pela média de 3 medidas consecutivas, usando o software Acqknowledge (©Biopaq Systems Inc). A pressão de pulso foi obtida subtraindo-se a PAs da PAd.

3.3.7 Bioquímica do sangue

Foi realizada coleta de 4ml de sangue através da artéria da orelha de todos os coelhos no tempo zero e ao final do protocolo (12 semanas). Uma amostra de cada animal foi encaminhada ao laboratório de análises clínicas do InCor para mensuração

do colesterol total, creatinina, fósforo, cálcio. Outra alíquota do plasma foi armazenada no freezer -80°C para estudos posteriores (soroteca).

3.3.8 Detecção do tempol no plasma

Através de EPR (espectroscopia paramagnética por ressonância de elétrons), utilizamos uma solução padrão de tempol 36uM e mensuramos seu sinal de EPR. Colocamos, então, o plasma dos coelhos no aparelho e aguardamos o sinal de EPR na mesma faixa do utilizado para o tempol padrão. Adicionamos ferricianeto a uma alíquota do plasma, que oxida o tempol se este estiver na forma reduzida.

3.3.9 Ecodopplercardiografia

A ecodopplercardiografia foi realizada no tempo zero e ao final do protocolo antes do sacrifício do animal. Para a realização do exame, os coelhos se submeteram à sedação intramuscular de cloridrato de S(+) cetamina 35-50 mg/kg e de 3,5 mg/kg de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina. Após a monitorização eletrocardiográfica, as imagens foram obtidas com um transdutor eletrônico de 12 MHz (S-12), conectado a um aparelho Sonos 5500 (Philips Medical Imaging, Andover, Massachusetts). Foram utilizadas as janelas acústicas para-esternal direita e subcostal. Obtivemos, então, os cortes paraesternal longitudinal, transversal e apical 4 câmaras. As imagens foram armazenadas em fitas super-VHS e também digitalizadas em disco óptico para posterior análise.

A área valvar aórtica (AVA) foi medida através da equação de continuidade, conforme recomendado na literatura para o exame humano naqueles com suspeita de estenose valvar aórtica (OTTO e PEARLMAN, 1988; QUIÑONES et al., 2002; GARCIA et al., 2003):

$$AVA = \frac{\pi \times (D_{VSVE})^2 \times VTI_{VSVE}}{4 \times VTI_{Ao}}$$

Legenda: D_{VSVE} = diâmetro da via de saída do ventrículo esquerdo; VTI_{VSVE} = integral de tempo-velocidade do fluxo na via de saída do VE, obtida através do doppler pulsátil e VTI_{Ao} = integral de tempo-velocidade do fluxo aórtico, obtida através do doppler contínuo.

O corte para-esternal longitudinal foi realizado para mensurar o diâmetro da via da saída do ventrículo esquerdo (no meio da sístole) e para observar a morfologia e o grau de abertura da valva aórtica, que também foi avaliado através do eixo-curto (corte transversal). A incidência apical 5 câmaras foi utilizada para quantificar o volume sistólico através do doppler pulsátil, cuja amostra de volume (ajustada para 0,6 mm) foi posicionada em região imediatamente proximal a valva aórtica, conforme rotineiramente feito em humanos (QUIÑONES et al., 2002). O doppler contínuo foi utilizado para registrar os gradientes transvalvares máximo e médio e obter a integral de tempo-velocidade do fluxo transvalvar, utilizada para o cálculo da área valvar aórtica através da equação de continuidade.

Para classificar a refringência da valva utilizamos o escore a seguir: 0- ausente; 1- discreta; 2- moderada; 3- severa.

Foram também mensurados o delta D, a fração de ejeção (Teicholz), a parede posterior e o septo interventricular e calculada a massa de ventrículo esquerdo.

Os ecocardiogramas foram feitos por um único ecocardiografista experiente durante todo o protocolo.

3.3.10 Tomografia computadorizada de multidetectores (64 fileiras)

Segmentos congelados de aorta descendente torácica (*pós-mortem*) foram submetidos à tomografia computadorizada de multidetectores simultaneamente com cortes sequenciais transversais de 0,5mm. Após reconstrução, a atenuação ao Raio X (mensurada em unidades de Hausfield) foi analisada pelo software do aparelho em 3 locais distintos de cada segmento, tirando-se média das medidas para cada vaso. A radiopacidade é um índice quantitativo de calcificação vascular.

3.3.11 Silanização de lâminas

As lâminas eram mergulhadas em uma cuba com álcool. Após, mantinham-se em dois recipientes com acetona. Eram, então, mergulhadas em duas cubas com 3-Aminopropil-trietoxi-silano por 5 minutos (em cada). Posteriormente, foram inseridas em duas cubas com acetona e, finalmente lavadas em dois recipientes com água destilada.

Obs.: Para uma quantidade muito grande de lâminas, as últimas cubas com acetona e água destilada eram substituídas.

3.3.12 Morfologia/estudo histológico

Foram utilizadas as colorações padrão H&E, tricrômio de Masson, Verhoeff-Van Gieson e Von Kossa nos tecidos cortados a 3µm em lâmina de vidro.

3.3.13 Cálculo da calcificação, colágeno e infiltração macrofágica da valva

Usando um microscópio óptico Leica acoplado a uma câmera e o Quantimet Image Software (Leica Microsystems, EUA.), era mensurada a área de calcificação (preferencialmente pela coloração de Von Kossa), o colágeno (coloração de tricrômio de Masson), a infiltração macrofágica (imunohistoquímica para RAM-11) e a área total de cada cúspide. Através da relação entre estas áreas, multiplicada por 100 (percentagem), interpretamos os resultados de cada grupo, através de média e desvio padrão.

3.3.14 Produção in situ de Superóxido e Peróxido de Hidrogênio

A cúspide aórtica congelada foi cortada longitudinalmente em criostato (-20°C) a uma espessura de 30µm e colocada em lâmina de vidro silanizada. Após a aplicação de dihidroetídio (DHE) 5µM e manutenção em estufa sob proteção da luz a 37°C por 20 minutos, retirou-se o excesso de DHE com PBS e cobriu-se com lamínula (MILLER JR et al., 1998; ZHAO et al., 2003; FRIDOVICH, 2003). A leitura simultânea de todos os grupos foi realizada em microscópio confocal Zeiss Axiovert 100M e software Axiovision (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemanha)

com excitação 488nm e emissão 560nm. Para determinar se o aumento da fluorescência estava especificamente relacionado ao superóxido, alguns experimentos foram realizados através da incubação do tecido com SOD peguilada (500 U/ml). Com a mesma metodologia, exceção feita ao uso do marcador DCF-DA 5μM, mensurou-se a produção de H₂O₂ (além de peroxinitrito, [•]OH e outros radicais) na valva, através da microscopia confocal (excitação 488nm e emissão 525nm). Para determinar se o aumento da fluorescência estava especificamente relacionado ao H₂O₂, alguns experimentos foram realizados através da incubação do tecido com catalase peguilada (400 U/ml).

3.3.15 Imunohistoquímica e Imunofluorescência

3.3.15.1 Desparafinização

Conjuntos de lâminas silanizadas, contendo os cortes de tecido de aproximadamente 3 μm de espessura eram montados em suporte adequado. Xilol quente foi adicionado, mantendo-as em estufa de 60-65°C por 20 minutos. Foram colocadas em 3 banhos de xilol frio por 1 minuto (em cada banho).

3.3.15.2 Hidratação

As lâminas foram mergulhadas em 2 banhos de etanol absoluto por 1 minuto (cada), etanol 95% (1 min.), etanol 70% (1 min.), lavadas com água corrente e, posteriormente, água deionizada.

3.3.15.3 Bloqueio

Realizado com a peroxidase endógena (água oxigenada 10 volumes 3%) por 7 vezes (5 minutos cada), seguindo-se lavagem com água e PBS.

3.3.15.4 Recuperação antigênica

A recuperação antigênica foi obtida através do tratamento com tripsina por 30 minutos. Seguiu-se lavagem em PBS.

3.3.15.5 Incubação com o anticorpo primário

O anticorpo primário com titulação específica (diluído em BSA) foi aplicado sobre o tecido e as lâminas incubadas durante a noite (18 a 20hs). A reação foi simultânea para os todos os grupos.

Os anticorpos foram utilizados nas diluições a seguir: anti-RAM-11 (1:200), anti-Nox2 (Santa Cruz 1:200; Dr. Burritt 1:1600), e anti-p22phox (Santa Cruz 1:200), anti-PDI (1:32000), anti-nitrotirosina (1:100), Ki-67 (1:200), anti-osteopontina (Iowa 1:50; Santa Cruz 1:200) e anti-Cbfa-1 (1:100).

3.3.15.6 Incubação com o anticorpo secundário

No caso da imunohistoquímica, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas pelo anticorpo secundário apropriado (Kit Vectastain Elite ABC

Mouse/Envision⁺System Mouse ou Kit Vectastain Elite ABC Mouse Goat). Após enxágüe com PBS, ocorreu a revelação pelo cromógeno 3,3 Diaminobenzidine (DAB). As lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris. Em seguida, repetiu-se enxágüe em água corrente, desidratação, diafanização e montagem com resina para microscopia Entellan. As lâminas eram visualizadas em microscópio de luz.

Na imunofluorescência, após a incubação com anticorpo primário “overnight”, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário adequado marcado com fluoresceína e/ou rodamina (1:400). Seguiu-se montagem com lamínula em meio aquoso (gelatina) e vedação com esmalte incolor. As lâminas eram mantidas a 4°C e protegidas da luz até observação em microscópio confocal. As imagens de co-localização foram realizadas pela integralização de 20 cortes consecutivos pelo software Axiovision do microscópio confocal Zeiss Axiovert 100M (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemanha) e uso simultâneo de lasers e filtros específicos para rodamina (excitação 543nm, emissão 560nm) e fluoresceína (excitação 488nm, emissão 525nm).

3.3.16 TRAP

Realizada reação de histoquímica TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato) para identificação de osteoclastos. Os cortes teciduais em lâminas de vidro foram desparafinizados conforme o protocolo acima, seguido de hidratação em etanol e lavadas com água destilada por 5 minutos. As lâminas foram incubadas em tampão acetato (0,2 M acetato de sódio + 50 mM de L(+) ácido tartárico em pH=5,0)

por 20 minutos em temperatura ambiente. Após, acrescentamos 0,5 mg/ml de naftol AS-MX fosfato e 1,1 mg/ml de sal fast red TR ao tampão. As lâminas ficaram incubadas por 6-7 horas a 37°C até que os osteoclastos ficassem vermelhos (utilizado osso humano em regeneração como controle positivo). Após lavagem com água destilada, realizada contra-coloração com metil-green por 1 minuto. As lâminas foram lavadas novamente em água destilada e cobertas com lamínula em meio de montagem de glicerol.

3.3.17 Apoptose

As lâminas foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em álcool, conforme descrito. Após lavagem com PBS, foi usado proteinase K 20 µg/ml em 10 mM Tris/HCl pH 7,4-8,0 por 30 minutos para permeabilização do tecido. A solução de reação de TUNEL (500 µl) foi preparada a partir da mistura de 450 µl da solução de identificação (frasco 2) e de 50 µl da solução enzimática (frasco 1). O controle negativo foi feito através da incubação de uma lâmina com 50 µl apenas da solução de identificação (frasco 2). O controle positivo foi realizado através da incubação do tecido com DNase I 3000 U/ml (3U/ml em 50 mM de Tris-HCl, pH 7,5; 10mM MgCl₂ 1 mg/ml BSA) por 10 minutos em temperatura ambiente para indução de quebras no DNA, alvos para positividade da reação. Adicionou-se 50 µl da solução de TUNEL em todas as lâminas (exceto controle negativo), que foram mantidas em uma câmara úmida protegida da luz à 37°C por 60 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS (3 vezes), cobertas com lamínula e observadas ao microscópio de fluorescência em filtro adequado (excitação 488, emissão 525 nm). Algumas reações

seguiram através da revelação com o conversor fosfatase alcalina para visualização em microscópio de luz, pela incubação de 50 µl do Converter AP (frasco 3) por 30 minutos em câmara úmida à 37°C. Após lavagem com PBS (3 vezes), foi colocado substrato Fast Red 50 µl por 5 minutos em temperatura ambiente protegido da luz. As lâminas foram lavadas novamente com PBS (3x) e montadas com lamínulas e glicerol.

3.3.18 Marcação nuclear

DAPI em solução 0,5µg/ml foi pipetado sobre o corte tecidual em lâmina de vidro e incubado em câmara escura a 37°C por 7 minutos. Após lavagem com PBS e cobertura com lamínula, o tecido foi analisado em microscópio de fluorescência com excitação de 365nm, emissão de 395nm e as imagens foram digitalizadas.

3.3.19 Quantificação de imagens de microscopia

Para mensuração da fluorescência ao DHE e DCF, contagem de núcleos celulares (DAPI) e de células TUNEL-positivas (apoptose), foi utilizado o software Image J (versão 1.37v; National Institutes of Health, Bethesda, MD), conforme descrito previamente (MILLER JR et al., 1998).

3.3.20 RT-PCR

3.3.20.1 Extração de RNA

Aortas retiradas dos coelhos foram armazenadas rapidamente em freezer - 80°C. Para a reação de RT-PCR, as amostras foram manipuladas com luvas, material estéril (tratado previamente com água DPEC, portanto livre de RNAase). As aortas foram submetidas à extração de RNA total utilizando o reagente Trizol como descrito no protocolo do fabricante (PICCOLI et al, 2005). Foi adicionado 1 ml de Trizol para cada 100mg de tecido (previamente pesado), que foi então triturado e homogeneizado em tubos de 50ml mantidos em gelo. As amostras foram transferidas para microtubos de 1,5-2 ml e centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C; a fase superior foi pipetada em outro microtubo em que foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio. Os tubos foram agitados por inversão durante 15 segundos, incubados por 2 a 3 minutos à temperatura ambiente e submetidos novamente a centrifugação de 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (superior) foi, então, transferida para outro tubo.

O RNA foi precipitado da fase aquosa com a adição de 0,6 ml de álcool isopropílico 100%. Depois de agitadas e incubadas por 10 minutos em gelo, as amostras foram centrifugadas novamente a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C, seguido de remoção do sobrenadante e lavagem do RNA precipitado (pellet) com 1 ml de etanol 75% gelado. Agitadas por inversão, as amostras foram então centrifugadas a 13000 rpm, 4°C por 5 minutos, os sobrenadantes foram desprezados e os microtubos

secos com um cotonete estéril. O precipitado de RNA foi incubado por 5 minutos no gelo, resuspenso em 25 µL de água com DEPC 0,01% e armazenado a -80°C.

A quantificação do RNA extraído foi determinada por análise espectrofotométrica em comprimento de onda ajustado a 260nm e 280nm sendo o critério utilizado para a análise da pureza da amostra a razão $260^{\text{RNA}}/280^{\text{PROT}}$ idealmente entre 1,6 e 1,8. A concentração foi determinada pela multiplicação da absorbância a 260nm pelo fator de diluição da amostra (já que foram utilizados para leitura 5 µL de amostra para 95 µL de DEPC) e fornecida em ng/µL.

As amostras de RNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,0%, seguida de coloração por brometo de etídio para verificação da integridade. As amostras foram preparadas adicionando-se 1 µL da amostra de RNA, 7 µL de água milliQ e 2 µL de loading buffer (blue juice). Para preparar o gel, um grama de agarose foi dissolvido em 100 ml de Tris-acetato-EDTA (TAE) 1x por aquecimento e adicionado 50 µL de brometo de etídio. Foi realizada eletroforese com 80-90 mV por 1 hora e as bandas 18S e 28S foram visualizadas e fotografadas através de exposição à luz UV com câmera digital Kodak Digital Science® DC120 (Eastman Kodak Company, Rochester, EUA).

3.3.20.2 Transcriptase reversa

Para a reação da transcrição reversa, as amostras (3 µg de RNA e água milliQ autoclavada qsp 10 µL) foram misturadas com 1 µL de oligo DT ® (0,5 µg/µL) e 1 µL de dNTP (mix 10mM), aquecidas a 65°C durante 5 minutos e em seguida colocadas em gelo (choque térmico). Em seguida, foram adicionados 4 µL de Buffer

5x, 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL de RNase OUT (40 U/µL) e as amostras foram incubadas a 42°C por 2 minutos. Após, foi adicionado 1 µL de Superscript II (200 U/µL) e as amostras incubadas novamente a 42°C por 50 minutos. Para interromper a reação, os microtubos com cDNA foram aquecidos a 70°C por 15 minutos e armazenados a -80°C.

3.3.20.3 Reação de polimerase em cadeia (PCR)

Adicionou-se 1 µL da amostra de cDNA em 24,8 µL da mistura de compostos para reação com: PCR buffer 10x, dNTP 10 mM, MgCl₂ 50 mM, primers 10⁻¹¹ M (1 µL-right e 1 µL-left) e água milliQ qsp 24,8 µL. Por fim, foi pipetado 0,2 µL de Taq polimerase 10 µM aos tubos, e as amostras foram colocadas no termociclador Corbett modelo RG 3000 (Austrália). Como controle negativo da reação, foi utilizada a mistura de compostos supracitada sem o cDNA. A seguir, descrevemos a sequência de primers, seus produtos e as condições de tempo e temperatura de cada ciclo após denaturação inicial a 94°C por 3 minutos (quadro 2).

Os produtos do RT-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio 0,5 µg/ml, usando 10 µL de amostra e 2 µL de tampão de amostra por lane. Após 30 minutos de corrida, os produtos (bandas) foram visualizados em um trans-iluminador UV (Eagleye) e fotografados com câmera digital Kodak Digital Science[®] DC120 (Eastman Kodak Company, Rochester, EUA). As bandas foram densitometradas através do software Scion Image e normalizadas pela expressão do GAPDH.

Quadro 2 – Sequência de primers, condições de reação de PCR e seus produtos

	<i>Primers</i>	<i>Condições °C (segundos)</i>			<i>Produtos</i>	<i>nº ciclos</i>
		<i>dissociação</i>	<i>anelamento</i>	<i>extensão</i>		
Nox1	F: CTGGTGGCGTATATGATCTGCCTCCTC R: CTTCAACTGAGGATGCCTACAGTGATGGTC	94 (60)	63 (60)	72 (60)	485pb	35
Nox4	F: GAAGGGGTAAACACCTCTGCCTGCTCA R: GGAATAGCACCATTACCATGCAGACTCCTGT	94 (60)	61 (60)	72 (60)	486 pb	35
OPN	F: CTCCCGGTAAACACGCTGATTC R: AGGATACTGGGCATTAGAGACG	94 (60)	63 (60)	72(60)	498 pb	35
GAPDH	F: TCACCATCTTCCAGGAGCGA R: CACAATGCCGAAGTGTCGT	94(60)	57(60)	72(60)	270 pb	31

3.3.20.4 PCR quantitativo

As soluções de reação para as corridas de PCR quantitativo foram realizadas com: plasmídeo (entre 10^3 a 10^8 cópias/reação), primers (200 nM), reagente Sybr MasterMix (Invitrogen) conforme especificações do fabricante e cDNA 150ng. As reações foram acompanhadas no termociclador Corbett modelo RG 3000 (Austrália). Após denaturação inicial a 95°C por 10 minutos, utilizamos as seguintes condições e sequência de primers (quadro 3).

Quadro 3 – Sequência de primers, condições de reação de PCR quantitativo e seus produtos

	<i>Primers</i>	<i>Condições °C (segundos)</i>			<i>Produtos</i>	<i>n° ciclos</i>
		<i>dissociação</i>	<i>anelamento</i>	<i>extensão</i>		
Nox1	F: CATCATGGAAGGAAGGAGA R: GCTTCCGGATAAACTCCACA	95 (15)	55 (20)	72 (20)	160 pb	45
Nox4	F: CCACAGACTTGGCTTTGGAT R: TACTGGCCAGGTCTTGCTTT	95 (10)	55 (15)	72 (20)	173 pb	45

3.4 Modelo experimental in vitro

3.4.1 Cultura e isolamento de células musculares lisas primárias da aorta de coelhos

Fragmentos da aorta torácica de coelhos foram dissecados pela remoção substancial da camada adventícia visível e seccionados no sentido longitudinal; a camada endotelial foi retirada com o auxílio de um bisturi. Em seguida, os fragmentos foram submetidos à digestão enzimática com solução contendo: colagenase IV (1 mg/ml), elastase (0,125 mg/ml) e inibidor de tripsina (0,375 mg/ml) diluída em DMEM+penicilina+estreptomicina a 37°C por 4 horas (WADA et al. 1999). O tecido parcialmente digerido foi lavado com PBS estéril e colocado em placas de 6-wells com DMEM low glucose suplementado com FBS 10% (v/v), penicilina/estreptomicina 1% (v/v) e solução de aminoácidos não essenciais 0,5% (v/v) e mantido em cultura na estufa a 37°C (5% de CO₂). A cada 3-4 dias o meio foi trocado e a cada 7 dias foram feitas semeaduras secundárias. Para os experimentos seguintes, células da 4ª passagem foram usadas. Adicionalmente, células musculares

lisas de coelho de uma linhagem imortalizada (RASM) foram utilizadas, desenvolvendo-se em meio de cultura F12.

3.4.2 Protocolo experimental

Quando as células atingiram confluência de 60 a 70%, foram incubadas com DMEM low-glucose, suplementado com 10% FBS, 1% de penicilina/estreptomicina, 0,5% de solução de aminoácidos não essenciais e o meio trocado a cada 3-4 dias. Os diferentes estímulos calcificadores e anti-oxidantes foram concomitantemente adicionados ao meio, conforme descrito à seguir e as cultura celular foi mantida por 14 dias.

- Controle negativo (**Controle**)- meio de cultura sem cloreto de cálcio;
- Cloreto de cálcio 6mM (**CaCl₂**);
- Cloreto de cálcio 6mM e β -glicerofosfato 10 mM (**CaCl₂+ β -GP**);
- Cloreto de cálcio 6mM e Vitamina D₃ 0,1 μ M (**CaCl₂+Vit. D₃**);
- Cloreto de cálcio 6mM e tempol 0,1 mM (**CaCl₂+T**);
- Cloreto de cálcio 6mM e ácido lipóico 0,1 mM (**CaCl₂+AL**);
- Cloreto de cálcio 6mM, β -glicerofosfato 10 mM e Vitamina D₃ 0,1 μ M (**CaCl₂+ β -GP+Vit.D₃**);
- Cloreto de cálcio 6mM, β -glicerofosfato 10 mM, Vitamina D₃ 0,1 μ M e tempol 0,1 mM (**CaCl₂+ β -GP+Vit.D₃+T**);
- Cloreto de cálcio 6mM, β -glicerofosfato 10 mM, Vitamina D₃ 0,1 μ M e ácido lipóico 0,1 mM (**CaCl₂+ β -GP+Vit.D₃+AL**).

As concentrações de β -glicerofosfato, Vitamina D₃ e dos anti-oxidantes ácido lipóico e tempol foram assim determinadas a partir de dados de literatura, curvas dose-resposta e de viabilidade celular, realizada com o corante Tripan Blue e contagem das células em câmara de Neubauer, capazes de depurá-lo. Para determinar se o peróxido de hidrogênio tem influência na progressão da calcificação, o meio de cultura destes grupos também foi suplementado com H₂O₂ 50 μ M em alguns experimentos independentes.

3.4.3 Dosagem do cálcio formado na placa de cultura

As células cultivadas em garrafas de 75 cm² foram lavadas 3 vezes com PBS, seguido da adição de 1 ml de HCl 0,6N por garrafa e incubação a 4°C por 24 horas, para que o cálcio extracelular fosse hidrolisado. O HCl coletado foi transferido para tubos 2ml identificados, armazenando-se a 4°C. As células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS para retirar o excesso de HCl e lisadas pela adição de 1 ml de NaOH/0,1% SDS por garrafa, seguida de sonicação e centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram mantidos a -80°C em tubos 2ml identificados, para posterior dosagem de proteína pelo kit Biorad Protein Assay (Biorad) baseado no método de Bradford, utilizando como padrão a albumina bovina.

A concentração de cálcio no HCl foi medida utilizando o método colorimétrico baseado na reação do cálcio com a orto-cresoftaleína em meio alcalino, que resulta na formação de um complexo colorido que absorve a 570 nm. Logo, a

intensidade da cor lida no espectrofotômetro é proporcional à concentração do cálcio. Os valores de absorbância das amostras foram comparados a uma curva padrão.

3.4.4 Obtenção do homogenato total e da fração de membrana

Todo o procedimento foi realizado sobre gelo ou com soluções resfriadas a 4°C. Utilizamos células ainda aderentes às garrafas de cultura de 75 cm² com aproximadamente 90% de confluência, que foram lavadas três vezes com PBS, seguido de adição de tampão 50 mM Tris (com 1 mM PMSF, 2µM pepstatina A e 2µM leupeptina pH 7,4) e de raspagem das células para tubos devidamente identificados. Em seguida, as amostras foram sonicadas 3 vezes por 10 segundos com 4W; o material foi então centrifugado a 1000 rpm por 3 minutos para remoção de células intactas e de grandes aglomerados.

Uma parcela de 200 µl do sobrenadante de cada amostra foi retirada, centrifugada a 12000 rpm por 12 minutos a 4°C; o sobrenadante foi então armazenado a -80°C para futuras análises do homogenato total.

O restante das amostras foi transferido para tubos de ultracentrifugação. Após serem submetidas a 18000 g por 15 minutos (para precipitação de núcleos celulares, mitocôndrias e grandes organelas), os sobrenadantes foram centrifugados a 100000 g por 60 minutos. Os precipitados, contendo principalmente microssomas e vesículas de membrana plasmática, foram ressuspensos em 50µl de tampão 50 mM Tris com inibidores de protease e congelados a -80°C até a análise.

As concentrações de proteína das soluções do homogenato total e da fração de membrana foram medidas utilizando-se o kit Biorad Protein Assay (Biorad) baseado no método de Bradford, utilizando como padrão a albumina bovina.

3.4.5 Análise da atividade da NADPH oxidase pela lucigenina

A quimiluminescência amplificada por lucigenina foi analisada nas frações de membrana dos diversos grupos de células estudados. A fração de membrana (30 μ l/30 μ g proteína) foi adicionada em 815 μ L de solução de PBS/10 μ M EDTA e NADPH 300 μ M a 37°C. Após termostatização e contagem basal, lucigenina (5 μ M) foi adicionada ao tubo de cintilação e as contagens de luminescência foram registradas continuamente por 20 minutos em um luminômetro Berthold 9505 (EG& Instruments GmbH, Munique, Alemanha). Essa concentração de lucigenina foi escolhida pelo fato de induzir redução significativa de artefatos relacionados ao “redox cycling”, verificados com concentrações mais elevadas (BRANDES et al., 1997; LI et al., 1998; JANISZEWSKI et al., 2002). Os sinais da linha de base foram subtraídos daqueles obtidos no branco (amostra contendo somente PBS/10 μ M EDTA e lucigenina). O resultado foi normalizado pela quantidade de proteína (determinado pelo kit Biorad Protein Assay, baseado no método de Bradford, utilizando como padrão a albumina bovina) e expresso em contagens por minuto (cpm) por mg de tecido.

3.4.6 Análise de proteínas por Western Blotting

Lisados dos diferentes grupos estudados foram submetidos à análise por Western blotting para determinar a expressão da osteopontina (OPN) com diluição 1:1000. Como normalizador, usamos a β -actina (1:2000).

As proteínas desses lisados (alíquota de 30 μ g por canaleta) foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (12%) e transferidas para membranas de nitrocelulose. Após bloqueio com 5% de leite sem ácidos graxos com 0,1% de Tween 20 por 2 horas, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário durante a noite (12hs) e, logo após, com anticorpo secundário anti-camundongo por 1 hora. As membranas foram reveladas por quimioluminescência utilizando kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech) e expostas em câmara escura ao filme fotográfico. A densitometria das bandas foi realizada com o software Scion Image.

3.4.7 Análise dos produtos de oxidação da DHE por HPLC

Células cultivadas em placas de 6 wells com 80% de confluência dos grupos descritos foram lavadas duas vezes com PBS/DTPA 0,1mM. A partir daí, todo o procedimento foi realizado ao abrigo de luz. Foi adicionado dihidroetídio (DHE) 100 μ M em PBS/DTPA 0,1mM e incubou-se as células por 30 minutos em estufa 37°C. As células foram então lavadas cuidadosamente com PBS/DTPA 0,1mM gelado, extraídas posteriormente com acetonitrila (300 μ L/poço), raspadas, sonicadas 3 vezes por 10 segundos a 4W e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. O

sobrenadante foi seco sob vácuo (Speed Vac®Plus SC-110A, Thermo Savant) e o pellet mantido a -20°C no escuro até a análise.

As amostras foram ressuspensas em 120 µL de PBS/DTPA 0,1mM e injetadas (100 µL) no sistema de HPLC (Waters Corporation), conforme método modificado e validado recentemente em nosso laboratório (FERNANDES et al., 2007). Foi utilizada uma coluna NovaPak C18 (3,9 x 150 mm, com partículas de 5 µm de tamanho), solução A (acetonitrila pura) e solução B (água/10% de acetonitrila/0,1% ácido tricloroacético) como fase móvel num fluxo de 0,4 ml/min. As corridas foram iniciadas com 0% de A, aumentando linearmente para 40% de A durante os 10 minutos iniciais, mantendo essa proporção pelos 10 min adicionais, mudando para 100% de A pelos 5 minutos seguintes e 0% de A pelos 10 min finais.

Foram feitas detecções simultâneas de DHE remanescente e de seus produtos derivados de oxidação (2-hidroxietídio e o etídio), usando respectivamente a detecção por ultravioleta a 245 nm (detector photodiode array W2996) e a fluorescência com excitação de 510 nm e emissão em 595nm (detector de fluorescência W2475) sob condições ideais. A quantificação foi feita por comparação entre a integral das áreas dos picos obtidos e as soluções padrões com condições cromatográficas idênticas. Os produtos derivados da oxidação da DHE foram expressos na razão de 2-hidroxietídio ou etídio gerado por DHE consumida (concentração inicial de DHE menos DHE remanescente).

4. ESTATÍSTICA

Os dados são expressos em média $\pm$ SEM (ou desvio padrão quando especificado). Analisamos os resultados, através de ANOVA e, posteriormente, fizemos o teste de Student Newman-Keuls entre os grupos. Para comparação de cada grupo individualmente com o grupo Normal (ou controle no caso das valvas humanas e modelo *in vitro*), foi realizado o teste de Dunnett. Consideramos significância estatística quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Valvas aórticas humanas

Na figura 2, mostramos a morfologia da valva aórtica humana normal (controle) e estenótica pelo H&E e Verhoeff-Van Gieson. O espessamento da válvula pela deposição de matriz extracelular, fibras colágenas, infiltrado inflamatório, colesterol, calcificação que se inicia na face aórtica e ocupa também a porção da espongirosa (camada intermediária entre face aórtica e ventricular da cúspide) e a diminuição da quantidade e qualidade (espessamento e rotura) das fibras elásticas são característicos da estenose aórtica.

Figura 2 - Microscopia óptica de valvas aórticas humanas (H&E e Verhoeff-Van Gieson). Face aórtica para cima e face ventricular para baixo. Observa-se a valva controle (painéis superiores) com espessura fina, sem calcificação e com distribuição homogênea de fibras colágenas e elásticas (tênuas)- seta. A valva estenótica (abaixo) apresenta calcificação evidente na face aórtica, maior deposição de fibras colágenas e espessamento das fibras elásticas (seta), além de escassez e rotura (elastólise) à margem da calcificação.

Quanto ao estresse oxidativo, a fluorescência dos produtos de oxidação da dihidroetidina por microscopia confocal aumentou na face aórtica da cúspide com esclerose ($1,5 \pm 0,07$) e, especialmente, ao redor da calcificação na valva estenótica ($2,2 \pm 0,13$) em comparação ao controle (adotado valor de referência 1 - figura 3 A), o que é similar ao modelo experimental em coelhos. A inibição pela SOD peguila ($1,27 \pm 0,07$) demonstra que a fluorescência ocorreu principalmente devido ao superóxido.

Figura 3 A - Fluorescência da DHE em valvas aórticas humanas por microscopia confocal e gráfico de quantificação. Fluorescência aumentada dos produtos de oxidação do dihidroetídio em valvas aórticas com esclerose e principalmente ao redor do núcleo de calcificação (C) na estenose aórtica, que diminui após incubação de PEG-SOD 500 U/ml. Ao lado, gráfico mostrando a intensidade de fluorescência (representativo de 3 experimentos independentes). * $p < 0,05$ vs controle; # $p < 0,05$ conforme indicado.

A imunohistoquímica para as subunidades da NAD(P)H oxidase Nox2 e p22phox (anticorpos da Santa Cruz®) foi positiva principalmente na valva com estenose aórtica ao redor do núcleo de calcificação, coincidente com a região de

maior estresse oxidativo pelo DHE (figura 3 B). Houve semelhante marcação ao utilizarmos o anticorpo monoclonal anti-Nox2 clone 54.1, gentilmente cedido pelo Dr. Burritt da Universidade de Montana, EUA (figura 4).

Figura 3 B - Imunohistoquímica para as subunidades da NAD(P)H oxidase p22phox e Nox2 (anticorpos da Santa Cruz®) em valvas aórticas humanas. Marcação coincidente com a maior produção de superóxido (C=calcificação).

Figura 4 - Imunohistoquímica para Nox2 (anticorpo monoclonal clone 54.1) da NAD(P)H oxidase em valvas humanas. Acima à esquerda, um controle negativo, sem marcação; à direita, valva normal com marcação discreta e homogênea principalmente do endotélio e de algumas células da camada fibrosa. Abaixo, cúspide humana estenótica com marcação intensa de células da camada fibrosa e, especialmente, daquelas em torno da calcificação (C).

Na figura 5, observamos que a osteopontina tem expressão constitutiva e homogênea na valva controle e que sua localização migra para a proximidade da calcificação na cúspide com esclerose (fase inicial de espessamento e calcificação valvar) e, praticamente, desaparece na válvula calcificada.

Figura 5 - Imunohistoquímica para osteopontina em valvas aórticas humanas. Acima à esquerda, controle positivo (osso); à direita, valva normal, exibindo marcação constitutiva homogênea junto à face aórtica. Abaixo à esquerda, cúspide com esclerose e maior expressão de OPN ao redor do núcleo de calcificação (C) inicial na face aórtica; à direita, cúspide estenótica com calcificação exuberante e sem marcação para OPN.

Cbfa-1, proteína de diferenciação osteoblástica, esteve presente ao redor da calcificação nas válvulas com estenose aórtica (figura 6), enquanto que ela não é expressa na valva normal.

Figura 6 - Imunohistoquímica para Cbfa-1 em valvas aórticas humanas. Acima à esquerda, controle negativo; à direita, valva normal sem marcação. Abaixo, valvas com estenose, exibindo marcação de células osteoblásticas próximas ao núcleo de ossificação.

5.2 Modelo experimental in vivo

5.2.1 Caracterização do modelo experimental in vivo

Não existiu diferença estatística nos valores plasmáticos e de peso basais entre os grupos (gráficos 1 A-F; tabela 1 A). Após o protocolo, houve um aumento do colesterol total nos coelhos HCD em relação aos Normais (gráfico 1 B; tabela 1 B). O efeito do ergocalciferol se fez notar pelo incremento do produto cálcio x fósforo nos animais HCD vs Normal (gráfico 1 E; tabela 1 B), por levar à hipercalcemia e principalmente à hiperfosfatemia (gráficos 1 C e 1 D; tabela 1 B). Para corroborar com isso, houve um decréscimo da função renal nestes coelhos em comparação aos Normais (gráfico 1 F; tabela 1 B), possivelmente pela nefrocalcinose, constatada na dissecação *pós-mortem*, além de redução de peso por intoxicação pelo ergocalciferol (gráfico 1 A, tabela 1 B).

Gráficos 1 (A à F) - Representação gráfica de peso, colesterol total, cálcio total, fósforo, produto cálcioxfósforo e creatinina sérica antes (basal) e ao final do protocolo experimental em coelhos (mês 3).

Legenda: *p<0,05 vs Normal no mês 3; e #p<0,05, conforme indicado abaixo de cada gráfico (ANOVA, seguido de Newman-Keuls e Dunnett). Os valores basais não tiveram diferença estatística.

Tabelas 1 A e B – Valores de peso (g), colesterol total, cálcio total, fósforo, creatinina (mg/dl) e produto CaxP (mg^2dl^2) séricos dos coelhos antes (basal - A) e ao final de 12 semanas de protocolo (mês 3 - B)

A						
Basal	Peso (g)	Colesterol total (mg/dl)	Ca ⁺⁺ total (mg/dl)	P (mg/dl)	Produto CaxP (mg^2dl^2)	Creatinina (mg/dl)
Normal	2878±114	53±5	15,7±0,1	6,2±0,5	97,1±7,5	1,1±0,04
HC	3094±130	37±4	16,6±0,5	5,9±0,3	97,5±7,5	1,1±0,1
HCD	3032±64	57±4	15,9±0,2	6,9±0,5	109,7±7,0	1,1±0,04
HCDT	2880±84	36±5	15,6±0,2	6,6±0,4	102±5,9	1,2±0,1
HCDL	2721±67	40±6	16,6±0,3	6,5±0,5	108,1±8,6	1,3±0,1

B						
Mês 3	Peso (g)	Colesterol total (mg/dl)	Ca ⁺⁺ total (mg/dl)	P (mg/dl)	Produto CaxP (mg^2dl^2)	Creatinina (mg/dl)
Normal	3221±109	46±6	13,7±0,3	4,6±0,2	63,1±3,7	1,2±0,1
HC	3554±110	1220±113*	13,8±0,4	4,5±0,3	62,2±4,4	1,4±0,1
HCD	2798±127* [#]	1363±90* [¶]	15,8±0,4* [#]	8,0±0,4* [#]	128,4±7,9* [#]	1,6±0,1*
HCDT	2712±130* [#]	971±96*	15±0,4	8,2±0,3* [#]	122±5,8* [#]	1,7±0,1*
HCDL	3060±90	1084±114*	14,1±0,4	7,8±0,5* [#]	110,2±8,4* [#]	1,6±0,2*

Legenda: ANOVA, seguido de Newman-Keuls e Dunnett (*p<0,05 vs Normal; [#]p<0,05 vs HC e [¶]p<0,05 vs HCDT).

A pressão de pulso aumentou nos animais HCD vs Normal, principalmente devido a diminuição da pressão arterial diastólica (gráfico 2).

Gráfico 2- Pressão arterial (PA) sistólica, diastólica e pressão de pulso dos animais ao final do protocolo.

Legenda: ANOVA, seguido de Newman-Keuls e Dunnett (*p<0,05 vs Normal).

À avaliação ecocardiográfica, não se demonstrou diferenças nos valores basais de HCD vs Normal (tabela 2 A e gráficos 3). Houve um aumento da ecogenicidade valvar no grupo HCD (figura 7; gráfico 3 J) e valor negativo do delta da área valvar aórtica final e inicial (gráfico 3 B), apesar de não ocorrerem alterações da área valvar aórtica absoluta, relação de velocidades (aorta/via saída VE) e da massa ventricular esquerda (tabela 2 B; gráficos 3 A, 3 C e 3 H). Houve um remodelamento concêntrico do VE nos coelhos HCD, notadamente pelo aumento da espessura relativa de parede posterior (gráfico 3 I).

Gráficos 3 (A à D)- Representação gráfica das variáveis ecocardiográficas antes (basal) e ao final do protocolo (mês 3).

Legenda: ANOVA, seguido de Newman-Keuls e Dunnett. O gráfico "B" demonstra variáveis ecocardiográficas no mês 3. *p<0,05 vs Normal; #p<0,05 conforme indicado.

Gráficos 3 (E à J)- Representação gráfica das variáveis ecocardiográficas antes (basal) e ao final do protocolo (mês 3).

Legenda: ANOVA, seguido de Newman-Keuls e Dunnett. O gráfico "J" demonstra variáveis ecocardiográficas no mês 3. UA- unidades arbitrárias. *p<0,05 vs Normal; #p<0,05 e ¶p<0,05 conforme indicado.

Mês 3	AVA (cm ²)	Relação de velocidades	Delta D	FE (Teicholz)	PP (cm)	SIV (cm)	Massa VE (g)
Normal	0,193±0,008	0,625±0,017	0,274±0,009	0,569±0,014	0,204±0,004	0,206±0,004	3,396±0,14
HC	0,209±0,015	0,625±0,058	0,346±0,012*	0,675±0,016*	0,218±0,006	0,237±0,012*	3,575±0,21
HCD	0,177±0,008	0,645±0,027	0,328±0,008*	0,649±0,011*	0,238±0,005*	0,237±0,005*	3,904±0,17
HCDT	0,173±0,008	0,611±0,033	0,329±0,017*	0,647±0,024*	0,230±0,006*	0,220±0,007	3,560±0,25
HCDL	0,175±0,010	0,635±0,024	0,329±0,015*	0,651±0,020*	0,240±0,014*	0,239±0,007*	3,465±0,27

Legenda: ANOVA, seguido de Newman-Keuls e Dunnett (* $p < 0,05$ vs Normal, # $p < 0,05$ vs HCdT).

A observação macroscópica mostrou uma profusa aterosclerose e calcificação valvar e vascular (figura 8 A, 8 B), além de um aumento da espessura do miocárdio e diminuição da cavidade ventricular esquerda (figura 8 C) nos animais HCD vs Normal, o que consolidou os achados ecocardiográficos.

Figura 8 A, B e C - Macroscopia da via de saída de VE de coelhos no plano longitudinal e dos ventrículos no plano transversal. Valva HCD à esquerda e Normal à direita (A). Valva HCD em detalhe (B). Ventrículos em corte transversal (C). HCD à esquerda e Normal à direita.

A análise histológica por H&E demonstrou aumento da espessura, deposição de colágeno e de matriz extracelular, infiltração de células inflamatórias, além de núcleos de calcificação, principalmente no terço proximal da face aórtica valvar dos animais HCD em relação ao Normal (figura 9 A). Ocorreu alteração da arquitetura das fibras elásticas (Verhoeff-Van Gieson) no grupo HCD, que sofreram rotura (elastólise) nas proximidades dos núcleos de calcificação (figura 9 B) por elastocalcinose e se tornaram mais espessas na face ventricular em relação ao

Normal (que têm tênues e delicadas fibras elásticas na face ventricular - figura 9 B). A deposição de colágeno, visualizado através do Tricrômio de Masson, concentrou-se na face aórtica e em torno dos núcleos de calcificação nos animais HCD em relação ao Normal (figura 9 C).

Figura 9 - A, B e C - Cúspides aórticas de coelhos cortadas longitudinalmente e coradas com H&E (A), Verhoeff-Van Gieson (B) e Tricrômio de Masson (C). Face aórtica voltada para cima. Setas vermelhas indicam fibras elásticas íntegras na face ventricular de valva Normal; setas pretas indicam núcleos de calcificação com elastólise adjacente.

Observamos importante infiltração de macrófagos na face aórtica do grupo HCD vs Normal através do anticorpo RAM-11 (figura 10), o que é semelhante às fases precoces da EVA humana. Porém, as células da periferia dos núcleos de calcificação foram negativas para esta marcação, o que denota distinta origem celular.

Figura 10 - Imunohistoquímica para macrófagos (MØ) em valvas aórticas de coelho com anticorpo anti-RAM-11. Cúspide Normal (à esquerda.), mostrando ausência de marcação e valva HCD (à direita), apresentando evidente infiltração macrofágica na face aórtica. Na periferia dos núcleos de calcificação, a marcação é ausente, denotando a presença de células de etiologia diferente nesta região. Aumento 100x.

Os indicadores de produção de espécies reativas de oxigênio foram marcadamente elevados no grupo HCD vs Normal. Através de microscopia confocal, a fluorescência tecidual derivada dos produtos de oxidação do DHE aumentou na face aórtica, particularmente ao redor dos núcleos de calcificação ($6,4 \pm 0,4$) vs o Normal (adotado valor de referência 1- figura 11). Para investigar se o aumento de fluorescência foi por incremento do número de células na região de mineralização óssea e, portanto, da maior quantidade de DNA para ligação dos produtos de oxidação do superóxido, realizamos a coloração nuclear fluorescente DAPI (figura 12). Pudemos notar que a contagem celular do grupo HCD aumentou, mas não

atingiu nem mesmo 2 vezes em relação ao Normal em torno dos núcleos de calcificação, o que não explica isoladamente a maior fluorescência nestes animais.

Figura 11- Fluorescência do DHE nas cúspides aórticas de coelho em microscopia confocal. Aumento do sinal fluorescente do dihidroetídio nas cúspides HC -macrófagos (*), mas especialmente em HCD em torno da calcificação (setas) - C e D, que diminuiu em HCDT (G), HCDL (H) e após incubação com Peg-SOD (F). Abaixo, gráfico de quantificação da fluorescência (representativo de 3 experimentos independentes).

Figura 12- Visualização dos núcleos celulares nas cúspides aórticas de coelho com DAPI e quantificação por campo. Observa-se aumento da densidade celular em torno da calcificação (C) nos coelhos HCD em relação ao Normal, que diminuiu em HCDT. Gráfico representativo de pelo menos 3 experimentos independentes (* $p < 0,05$ vs Normal e # $p < 0,05$ vs HCDT).

A fluorescência dos produtos de oxidação do DCF-DA encontrava-se maior ($5,8 \pm 0,5$) no grupo HCD em relação ao Normal (adotado valor de referência 1- figura 13), que foi reduzida após incubação com Peg-Cat *in vitro*. Em paralelo, a positividade para nitrotirosina, um marcador de estresse nitro-oxidativo, ocorreu também ao redor dos núcleos de calcificação (figura 14). Todos estes achados corroboram com os resultados da valva humana.

A imunohistoquímica positiva para as subunidades da NAD(P)H oxidase p22phox e Nox2 e de sua proteína reguladora, recentemente caracterizada, PDI

(JANISZEWSKI et al., 2005) foi coincidente com a região de maior estresse nitro-oxidativo, ou seja, nas proximidades dos núcleos de calcificação (figura 14).

Figura 13- Produtos de oxidação da DCF-DA nas valvas aórticas de coelho por microscopia confocal. A- Normal; B- HCD; C- HCDT; D- HC; E- HCD + *in vitro* Peg-Cat (400U/ml); F- HCDL. A fluorescência aumentou em B (HCD) e mais pronunciadamente em C (HCDT), diminuindo após incubação de PEG-Cat (500 U/ml *in vitro*) e nos animais HCDL. Coelhos HC tiveram fluorescência semelhante aos Normais. Gráfico representando a intensidade da fluorescência de pelo menos 3 experimentos independentes.

Figura 14- Imunohistoquímica para 3-nitrotirosina, NAD(P)H oxidase (p22phox e Nox2) e sua subunidade reguladora PDI em valvas aórticas de coelho. Painéis superiores - valva Normal, painéis intermediários - HCD e painéis inferiores - amplificação de 1000x, mostrando marcação coincidente em torno dos núcleos de calcificação.

Houve co-localização das subunidades p22phox e Nox2 ao redor da calcificação, assim como, da p22phox e da PDI através de microscopia confocal (figura 15).

O RT-PCR mostrou uma diminuição da Nox1 e aumento da Nox4 nos coelhos HCD em comparação aos Normais (figura 16 A e 16 B).

Figura 15- Co-localização da p22phox com Nox2 e PDI na região de calcificação (C) em valvas aórticas de coelho por microscopia confocal.

A osteopontina e o Cbfa-1 (proteínas de diferenciação osteoblástica) apareceram ao redor da calcificação, principalmente nas células que consideramos tratar-se de células vasculares calcificadoras (figura 17 A). O RT-PCR para a osteopontina demonstrou um aumento de sua expressão no animal HCD em relação ao Normal (figura 16 B). Por outro lado, os osteoclastos responsáveis pela reabsorção óssea, foram identificados pelo TRAP nas proximidades da mineralização (figura 17 B).

Figura 16 A e B - RT-PCR para Nox1, Nox4 e osteopontina. RNA extraído de aorta torácica descendente de coelhos. Gráficos representam quantificação por densitometria dos géis de PCR, normalizados pela expressão de GAPDH (representativo de 2 experimentos independentes).

Figura 17 A e B - Células vasculares calcificadoras (CVC) em torno da calcificação. Marcação para osteopontina e Cbfa-1 (osteoblastos em A) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) - osteoclasto (seta em B), ao redor dos núcleos de calcificação.

Ocorreu maior apoptose, caracterizada pelo TUNEL (figura 18 A) e aumento da proliferação celular (Ki-67) ao redor dos núcleos de calcificação nos coelhos HCD em comparação ao Normal (figura 18 B).

Figura 18 A – Apoptose em valvas aórticas de coelhos pelo método de TUNEL. Maior quantidade de células TUNEL positivas (apoptose) nas cúspides HCDT em relação aos HCD e Normal. Gráfico representa a média $\pm$ SEM de pelo menos 3 experimentos diferentes (* $p < 0.05$ vs Normal; # $p < 0.05$ vs HCDT).

Figura 18 B – Proliferação celular nas cúspides aórticas de coelhos (anticorpo Ki-67). Maior proliferação celular em torno da calcificação nas valvas HCD, que foi inibido pelo tempol (HCDT). Coelhos HC demonstraram discreta proliferação celular na região de infiltração macrófagica, que foi quase inexistente em coelhos Normais. Gráfico representa média $\pm$ desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes (* $p < 0.05$ vs Normal; # $p < 0.05$ vs HC e HCDT).

5.2.2 Efeitos dos antioxidantes no modelo experimental *in vivo* e comparação entre os grupos

Ao final do experimento, os coelhos HCD e HCDT tiveram redução do peso em comparação com o grupo Normal, HC, o que não ocorreu com os animais HCDL (tabela 1 B e gráfico 1 A). O colesterol total aumentou significativamente nos animais HCD, HC, HCDT e HCDL em comparação aos Normais. Os coelhos HCDT tiveram colesterol total aproximadamente 20% menor em relação aos HCD no mês 3 (tabela 1 B e gráfico 1 B). Houve aumento do fósforo sérico e do produto cálcio x fósforo nos grupos HCD, HCDT e HCDL em comparação aos Normais e HC (tabela 1 B e gráfico 1 D e 1 E). A creatinina sérica também aumentou nos grupos que receberam Vitamina D₂ (HCD, HCDT e HCDL) em relação aos Normais (tabela 1 B e gráfico 1

F). O tempol (HCDT), assim como a Vitamina D₂ isolada (HCD), aumentou a pressão de pulso, por diminuir a pressão arterial diastólica, ao contrário do ácido lipóico (HCDL), que teve pressão de pulso semelhante ao Normal (gráfico 2).

Os parâmetros ecocardiográficos basais foram semelhantes entre os grupos (tabela 3 A e gráfico 3 A; 3 C; 3 D; 3 E; 3 F; 3 G; 3 H), exceção feita à fração de ejeção e ao delta D no grupo HCDT, que era discretamente maior apenas em comparação ao grupo HCD (tabela 2 A e gráfico 3 D). Ao final das 12 semanas de experimento, ocorreu um aumento da fração de ejeção e do delta D nos grupos HC, HCD, HCDT e HCDL (tabela 2 B e gráfico 3 D e 3 E) em comparação ao Normal. Houve um acréscimo na parede posterior dos grupos HCD, HCDT e HCDL em relação ao Normal (tabela 2 B e gráfico 3 F). Já o septo interventricular elevou-se nos animais HC, HCD e HCDL em comparação aos Normais (tabela 2 B e gráfico 3 G). Estas diferenças, na realidade, refletem um remodelamento concêntrico de ventrículo esquerdo (gráfico 3 I), dado pela espessura relativa de parede posterior (assim calculada: $2 \times \text{parede posterior} / \text{diâmetro diastólico VE}$). A massa de ventrículo esquerdo não teve diferença estatística entre os grupos (tabela 2 B e gráfico 3 H). Observamos que, apesar da ausência de diferença estatística na área valvar aórtica absoluta no mês 3 (tabela 2 B e gráfico 3 A), os grupos que receberam Vitamina D₂ (HCD, HCDT e HCDL) não aumentaram área valvar final em relação às respectivas medidas basais, conforme ocorreu com os animais Normais e HC (representado pelo $\Delta \text{AVA final} - \text{AVA inicial}$ - gráfico 3 B). Na verdade, somente o grupo HCDT que, além de apresentar este valor de Δ negativo, demonstrou diferença estatisticamente significativa em comparação ao Normal e HC. Já a relação das velocidades (relação dos picos de velocidade na via de saída e aorta) não foi diferente entre os grupos no

mês 3 (tabela 2 B e gráfico 3 C). A ecogenicidade valvar (um índice de espessamento e calcificação valvar) aumentou nos grupos HCD e HCDT em relação aos coelhos HC e HCDL que foram semelhantes aos Normais (gráfico 3 J).

A tomografia computadorizada de multi-detectores (64 fileiras), que identifica sinal radiopaco em regiões de calcificação mais organizada e compacta, demonstrou um aumento significativo na atenuação ao Raio-X de segmentos de aorta torácica (*ex-vivo*) apenas no grupo HCDT (gráfico 4).

Gráfico 4 – Atenuação de segmentos de aorta ao Raio-X submetidos à tomografia de muti-detectores. Aumento significativo da atenuação ao Raio-X (UH- Unidades de Housefield) de segmentos de aorta torácica descendente *pós-mortem* (ao final do protocolo) dos coelhos HCDT, submetidos à tomografia computadorizada de multi-detectores (* $p < 0,05$ vs Normal; # $p < 0,05$ conforme indicado).

A análise histológica revelou um aumento significativo da calcificação valvar nos grupos HCD e HCDT em relação ao Normal e HC (gráfico 5 A). A calcificação foi significativamente maior nos grupos HCD e HCDT em relação ao HCDL, que apresentou valores semelhantes ao Normal (gráfico 5 A).

A infiltração macrofágica mostrou-se aumentada nos grupos HCD, HC, HCDT e HCDL em relação ao Normal (gráfico 5 B). O grupo HC teve maior deposição de macrófagos em comparação aos grupos HCD, HCDT e HCDL. As

fibras colágenas (em percentual do tecido), observadas na coloração de Masson, não demonstraram diferença estatística entre os grupos, apesar de que há uma tendência à diminuição no grupo HC e HCD vs Normal e um acréscimo das fibras colágenas nos grupos que receberam antioxidante (HCDT e HCDL) - gráfico 5 C.

Gráfico 5 A, B e C – Calcificação tecidual (A), infiltração macrofágica (B) e colágeno tecidual (C) das cúspides aórticas de coelhos.

Legenda: Valores expressos em percentagem da área total da cúspide. *p<0,05 vs Normal; #p<0,05 e ¶p<0,05 conforme indicado.

Quanto aos índices de estresse oxidativo, a fluorescência derivada dos produtos de oxidação do DHE em microscopia confocal aumentou nos grupos HC ($1,9 \pm 0,1$) e HCD ($2,7 \pm 0,3$) nas áreas de infiltração macrofágica e particularmente em torno dos núcleos de calcificação ($6,4 \pm 0,4$) – figura 11. Esta marcação corresponde às células vasculares calcificadoras, que são positivas para Nox2, p22phox, PDI, nitrotirosina (figura 14) e marcadores de diferenciação óssea (osteopontina, Cbfa-1, TRAP – figura 17 A e B). A fluorescência diminuiu após a incubação com superóxido dismutase peguilada ($1,8 \pm 0,04$), o que indica que a fluorescência da DHE refletiu principalmente a produção do radical superóxido (figura 11). As cúspides dos animais HCDT e HC DL tiveram redução intensa do sinal ($1,5 \pm 0,04$ e $1,9 \pm 0,2$ respectivamente – figura 11).

A fluorescência derivada dos produtos de oxidação da diclorofluoresceína demonstrou um aumento do sinal nas cúspides dos animais HCD ($5,8 \pm 0,5$) e principalmente nas valvas HCDT ($9,9 \pm 0,9$). Houve redução da fluorescência após incubação com catalase peguilada ($1,2 \pm 0,1$), o que demonstra que a oxidação da diclorofluoresceína ocorreu especialmente pelo peróxido de hidrogênio. O grupo HC DL teve grande diminuição da fluorescência ($0,32 \pm 0,16$), semelhante aos animais Normais (valor de referência 1) e HC ($1,9 \pm 0,2$ – figura 13).

Ocorreu aumento da nitrotirosina nas valvas dos coelhos HCD em comparação aos Normais (figuras 14 e 19), que diminuiu com ácido lipóico (HC DL) e principalmente com o tempol (HCDT)- figura 19.

Figura 19 – Efeito dos antioxidantes na expressão de nitrotirosina. Aumento da nitrotirosina nos coelhos HCD, que diminui com o ácido lipóico e particularmente com o tempol próximo à calcificação. À direita, gráfico de quantificação (* $p < 0,05$ vs Normal; # $p < 0,05$ conforme indicado).

O RT-PCR da aorta mostrou um decréscimo na expressão da Nox1 nos coelhos HCD, HCDT e HCDL em comparação com o Normal e um incremento da Nox4 nos coelhos HCD, HCDT e HCDL em relação ao Normal, normalizado pela GAPDH (figura 16 A e 16 B). Estes resultados foram reafirmados pelos achados de PCR quantitativo, que também exibiu um aumento significativo na relação Nox4/Nox1 especialmente nos coelhos HCDT em comparação aos HCDL, HCD e Normais (gráfico 6). Os animais HCDL tiveram relação Nox4/Nox1 semelhante ao Normal (gráfico 6). O RT-PCR para a osteopontina demonstrou um aumento de sua expressão nos animais que receberam Vitamina D₂ em relação ao Normal, principalmente nos coelhos HCD, com menor intensidade nos HCDL e pronunciadamente menor nos HCDT que se aproximou mais ao grupo Normal (figura 16 B).

Gráfico 6 - Expressão RNA mensageiro (Nox4/Nox1) por PCR quantitativo. Aumento da relação Nox4/Nox1 especialmente em coelhos HCDT. RNA extraído de aorta torácica descendente. Cada barra corresponde à média e erro padrão 3 animais diferentes. * $p < 0,05$ vs Normal; # $p < 0,05$ vs HCD e HCDL.

A proliferação celular (Ki-67) em torno da calcificação mostrou uma maior atividade mitótica principalmente no grupo HCD vs Normal e HC, que diminuiu significativamente no grupo HCDT (figura 18 B).

A apoptose celular (TUNEL) em torno da mineralização óssea aumentou no grupo HCDT em relação ao HCD, sendo muito pequena no grupo Normal (figura 18 A).

Através de EPR (espectroscopia paramagnética por ressonância de elétrons), identificamos o tempol no plasma dos coelhos HCDT (na concentração média de $5\mu\text{M}$ - figura 20 B), idêntico ao espectro do tempol padrão (figura 20 D), o que demonstra que a administração oral foi eficaz. Nos Normais, detectamos apenas o radical ascorbil (figura 20 A). Não havia tempol na forma reduzida, pois não evidenciamos aumento do sinal após a administração de ferricianeto (figura 20 C).

Figura 20 A à D - Espectroscopia paramagnética por ressonância de elétrons do plasma dos coelhos após 3 meses de protocolo. A) No grupo Normal, aparece apenas o radical ascorbil (em detalhe à direita). B) O tempol pode ser detectado no plasma dos animais HCDT, que tem traçado característico e idêntico à amostra padrão de tempol 36uM (D). C) O ferricianeto não alterou a amplitude do traçado de EPR do tempol plasmático, demonstrando que o tempol não se encontrava em sua forma reduzida.

5.3 Modelo de calcificação *in vitro*

O uso de CaCl_2 isoladamente aumentou a deposição de cálcio na placa de cultura. A adição de β -glicerofosfato e de Vitamina D_3 resultou em incremento significativo da calcificação. A incubação com tempol juntamente com o estímulo calcificador induziu a maior calcificação dentre as amostras (gráfico 7). O ácido lipóico reduziu a calcificação, sendo significativamente menor em relação à amostra submetida ao tempol e semelhante ao Controle e CaCl_2 (gráfico 7). A adição de H_2O_2 exógeno ao meio calcificador amplificou a mineralização em todos os grupos (gráfico 8).

Gráfico 7 - Concentração de cálcio após 14 dias de cultura de células musculares lisas de coelho com estímulo calcificador, além de tempol e ácido lipóico. O uso adjuvante do tempol ao estímulo calcificador aumentou ainda mais a deposição de cálcio, enquanto que o ácido lipóico reduziu a mineralização para valores semelhantes ao controle.

Gráfico 8 - Efeito do peróxido de hidrogênio exógeno (50μM) na mineralização em cultura de células musculares lisas vasculares submetidas a estímulo calcificador. Aumento da concentração de cálcio diante da exposição ao peróxido de hidrogênio (50μM).

A produção de EOH em células musculares lisas primárias mensurado por HPLC mostrou um padrão semelhante ao da deposição de cálcio. A incubação somente com CaCl_2 aumentou em aproximadamente 2 vezes os níveis de EOH em relação ao Controle. A adição de β -glicerofosfato e de Vitamina D_3 resultou em incremento significativamente maior de EOH em comparação ao Controle (gráfico 9 A), que diminuiu com o tempol e mais pronunciadamente com o ácido lipóico.

A atividade da NAD(P)H oxidase em fração de membrana estava aumentada com o estímulo calcificador, isoladamente com o CaCl_2 e também com a adição de β -glicerofosfato e de Vitamina D_3 . A atividade NAD(P)H oxidase diminuiu significativamente nas culturas celulares incubadas com o estímulo calcificador e tempol (estatisticamente igual ao Controle) e mais intensamente com o estímulo calcificador e ácido lipóico (gráfico 9 B).

Gráfico 9 A e B - Mensuração dos produtos de oxidação do DHE através de HPLC (A) e atividade da NAD(P)H oxidase em fração de membrana (B). A- Mensuração dos produtos de oxidação do DHE através de HPLC (EOH-hidroxi-etídio) pelo DHE consumido. B- Atividade da NAD(P)H oxidase em fração de membrana, normalizado por miligrama de proteína.

A expressão da osteopontina por western-blotting aumentou nas culturas celulares com Vitamina D₃ isoladamente e adicionalmente ao β -glicerofosfato, porém não somente com este último (figura 21). Houve uma redução da expressão da osteopontina após a incubação com o meio calcificador+tempol e também apenas com o tempol.

Figura 21 - Western-blotting para osteopontina de lisados celulares (cultura de células musculares lisas vasculares primárias de aorta de coelho) após estímulo calcificador por 14 dias. Houve um aumento da expressão da osteopontina, principalmente na presença da Vitamina D₃, seja isoladamente ou com o β -glicerofosfato. Com a adição de tempol (T) ao meio, ocorreu diminuição da expressão da proteína. Osso de coelho foi usado como controle positivo. Abaixo, quantificação por densitometria, normalizado por β -actina.

6. DISCUSSÃO

Nosso estudo evidenciou vários aspectos relacionados ao papel de processos redox na progressão da calcificação valvar aórtica: indicadores de produção de ERO e de estresse oxidativo aumentados em torno dos núcleos de calcificação, tanto no modelo experimental em coelhos como nas cúspides extremamente calcificadas em pacientes cirúrgicos. A marcação para NAD(P)H oxidase (subunidades Nox2 e p22phox) ao redor da mineralização (figuras 3 B e 4), coincidente com a topografia de ERO (figura 3 A), corrobora a idéia de que a NAD(P)H oxidase é uma de suas principais fontes enzimáticas na valva humana. O estresse oxidativo e nitrosativo foi evidente na calcificação valvar aórtica (figuras 3 A, 11, 13, 14 e 19) e, apesar da grande quantidade de macrófagos no modelo experimental em coelhos (figura 10), ocorreu preferencialmente ao redor dos núcleos de calcificação (figura 11) em células com fenótipo de osteoblastos e osteoclastos (figura 17 A e B). Estas células co-expressaram NAD(P)H oxidase e PDI com topografia semelhante à produção de ERO (figura 15). A calcificação levou à mudança quantitativa da expressão de Nox1 para Nox4 (figura 16 A, 16B e gráfico 6), que pode estar relacionado à diferenciação (figura 17), proliferação (figura 18 B) e apoptose celular (figura 18 A), implicados na mineralização. O uso dos antioxidantes tempol e ácido lipóico afetaram distintas ERO no modelo *in vivo* (figura 11 e 13) e mostrou, *in vivo* e *in vitro*, efeitos opostos na progressão da calcificação: aumento com o tempol e diminuição (ou não alteração) com o ácido lipóico (gráficos 5 A, 6 e 7). Assim, os processos redox estão implicados na patogênese da calcificação valvar, mas podem influenciar a

mineralização de maneira complexa, possivelmente dependendo de quais ERO estejam envolvidas. O modelo de calcificação *in vivo* usado em nosso estudo exhibe um estágio precoce da doença (figuras 8, 9 e 10). Este modelo mostra outras semelhanças com a patologia humana: disfunção endotelial, rotura de fibras elásticas (figura 9 B), infiltração macrofágica na face aórtica (figura 10), secreção de matriz extracelular e de colágeno (figura 9 C), rigidez vascular (aumento da pressão de pulso – gráfico 2) por elastocalcinose (figura 9 B) e calcificação (figura 9 A). A calcificação, processo essencial nesta patologia, foi evidente tanto pelo aumento da ecogenicidade das cúspides dos coelhos HCD (figura 7, gráfico 3 J) e atenuação tecidual ao Raio X na tomografia de multi-detectores (gráfico 4), como pelo aparecimento de núcleos de calcificação vistos à microscopia (figura 9 A), além de demonstrar processo inflamatório (infiltrado macrofágico – figura 10), não ocorrendo diminuição da área valvar aórtica ou desenvolvimento de gradiente pressórico VE-Ao significativo (gráficos 3 A e C). A presença de osteoblastos, pela positividade para Cbfa-1 e osteopontina (figura 17 A) e de osteoclastos (figura 17 B), demonstra que, em torno da calcificação, há uma população celular específica de CVC cuja diferenciação e/ou desdiferenciação, atividade secretória e capacidade de síntese/degradação óssea podem ser reguladas por sinais redox originados da NAD(P)H oxidase. A expressão da osteopontina, proteína inibitória da deposição óssea (WADA et al., 1999; STEITZ et al., 2002), foi constitutiva e homogênea na face aórtica da valva normal humana (figura 5) e eventualmente sugere uma proteção premente contra a mineralização. Em uma fase intermediária da doença humana (esclerose aórtica), a osteopontina mudou sua topografia para a periferia da calcificação (figura 5), provavelmente como um feedback negativo contra a

ossificação. Esta característica é similar ao que encontramos no modelo em coelhos que apresenta uma doença intermediária (figura 14). Com a evolução da EVA humana, há uma diminuição e mesmo ausência da expressão desta proteína quando a calcificação aumenta e a estenose aórtica se instala (figura 5). Portanto, em valvas humanas e do modelo experimental em coelhos identificamos maior estresse nitro-oxidativo (figuras 3 A, 11, 13 e 14) e expressão de sua principal fonte enzimática, a NAD(P)H oxidase, na periferia dos centros de calcificação (figuras 3 B, 4 e 14).

A redução de peso dos coelhos que receberam Vitamina D₂ pode ser explicada pela intoxicação crônica pelo ergocalciferol (MORTENSEN et al., 1993- gráfico 1 A e tabela 1 B), que leva a anorexia, diarreia e desidratação. O aumento do produto cálcio x fósforo foi semelhante em todos os animais que receberam Vitamina D₂, mesmo nos que usaram os antioxidantes (gráfico 1 E, tabela 1 B), o que nos deu um grupo homogêneo para a comparação dos índices de calcificação tecidual, estenose valvar aórtica e estresse oxidativo. Além disso, a destruição das fibras elásticas (elastocalcinose – figura 9 B) diminuiu a complacência arterial e a pressão arterial diastólica (gráfico 2), contribuindo para o aumento da pressão de pulso dos animais HCD (gráfico 2) e maior rigidez vascular. Todo este cenário, acrescido da perda de função renal, observado pelo incremento de creatinina (gráfico 1 F e tabela 1 B) e uréia (dado não mostrado), é compatível com a literatura e torna o modelo ainda mais comparável à população com maior risco de desenvolver calcificação vascular e valvar: pacientes com hipercolesterolemia, insuficiência renal crônica, hipertensão arterial sistêmica, idade maior de 65 anos e diminuição da complacência arterial. Os dados ecocardiográficos mostraram que os animais com hipervitaminose D, apesar de uma AVA semelhante aos Normais, tiveram um delta

da AVA final-AVA inicial com resultado negativo, expressando alterações precoces da doença (gráfico 3 B). Já a relação das velocidades (medida mais específica de estimativa da estenose valvar aórtica) não revelou diferença entre os grupos (gráfico 3 C). O aumento do delta D, fração de ejeção, parede posterior e septo interventricular nos coelhos HC, HCD, HCDT e HCDL (gráficos 3 D, E, F, G e tabela 2 B) pode ser explicado pelo estímulo proliferativo e de hipertrofia de células miocárdicas por ativação do eixo renina-angiotensina-aldosterona e sistema endotelina-1, devido à dieta hipercolesterolêmica (LEE et al., 2005) e hipervitaminose D, além de aumento da pressão de pulso (diminuição da complacência arterial) nos animais HCD e HCDT. Isto demonstra um remodelamento ventricular hipertrófico e concêntrico (dado pela espessura relativa da parede posterior - gráfico 3 I), pois o delta D e a fração de ejeção são calculados a partir do diâmetro sistólico e diastólico de VE ($\text{delta D} = \frac{\text{diâmetro diastólico VE} - \text{diâmetro sistólico VE}}{\text{diâmetro diastólico VE}}$). A mensuração do septo interventricular do coelho às vezes é inadequado, devido à janela ecocardiográfica ruim e de seus limites imprecisos. Assim, a medida da parede posterior é mais acurada, tendo mostrado aumento nos coelhos HCD, HCDT e HCDL. A massa ventricular esquerda não revelou diferença estatística (gráfico 3 H). Como a massa de VE é calculada a partir do SIV e PP, eventualmente o resultado poderia ser significativo se levássemos em conta apenas o valor da PP.

A hipervitaminose D e a calcificação tecidual parecem exercer um papel anti-inflamatório e estabilizador da placa aterosclerótica. Inclusive, a mineralização é o último estágio de processos inflamatórios em geral (tuberculose, corpo estranho, artrite reumatóide e aterosclerose). Isto poderia explicar a menor infiltração

macrofágica nos coelhos que receberam Vitamina D₂ (HCD, HCDDT e HCDDL) em comparação aos hipercolesterolêmicos isolados (HC) – gráfico 5 B. Entretanto, não sabemos se este processo se faz através da diminuição de moléculas de adesão, alteração de secreção de interleucinas ou mesmo por apoptose direta de macrófagos (figura 18 A) e de outras células inflamatórias. O aumento da produção de superóxido e de peróxido de hidrogênio foi evidente nos animais HCD em relação aos Normais (figuras 11 e 13). A maior contribuição de nossos experimentos, porém, foi a identificação do incremento de O₂⁻, principalmente nas células ao redor dos núcleos de calcificação (figuras 3 A e 11) e não apenas na face aórtica, onde os macrófagos predominam (figura 10). A maciça presença de nitrotirosina principalmente na periferia da calcificação (figuras 14 e 19) nos leva a pensar que a NO sintase (desacoplasda) também pode desempenhar um papel fisiopatológico importante e propagar o desequilíbrio redox local. As células que demonstraram maior sinal fluorescente dos produtos de oxidação da DHE, co-expressaram NAD(P)H oxidase (p22phox e Nox2 – figuras 3 B, 4 e 15), sua proteína reguladora PDI e marcaram negativamente para RAM-11 (macrófagos) por imunohistoquímica (figura 10), CD-31 (endotélio- figura não mostrada), CD-68 (macrófago humano- figura não mostrada) e HHF35 (fibroblastos- figura não mostrada) tanto em valvas humanas como no modelo em coelhos. A co-localização da Nox2, p22phox e PDI (figura 15) na valva calcificada de coelhos em microscopia confocal corroborou estes dados. Além disso, estas células ao redor dos núcleos de calcificação tiveram imunohistoquímica positiva para osteopontina e Cbfa-1 (figuras 5, 6 e figura 17 A), que são particularmente expressas por células vasculares calcificadoras (WATSON et al., 1994; STEITZ et al., 2001), originadas da desdiferenciação de células

musculares lisas e/ou fibroblastos ou da diferenciação de células mesenquimais primárias, mediante ao estímulo calcificador. A identificação de osteoclastos pela reação de TRAP (figura 17 B), tanto na região de concentração de macrófagos, como principalmente ao redor dos núcleos de calcificação, sugere que eles participem do processo de ossificação, no que se refere à reabsorção do cálcio. Isso implica em diferenciação controlada de monócitos, macrófagos e células mesenquimais, graças à modulação de proteínas de osso e MCSF-1. Os osteoclastos também podem ser responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio na valva, principalmente o superóxido por meio de isoformas da NAD(P)H oxidase (KEY JR et al., 1990; KEY JR et al., 1994; DARDEN et al., 1996; STEINBECK et al., 1994; YANG et al., 1998). A mudança do padrão de expressão de Nox1 (maior no Normal) para Nox4 , verificada por RT-PCR (figura 16 A e B) pode definir uma alteração do fenótipo celular de um estado de proliferação para diferenciação, além da possível modulação de proteínas de ossificação e da atividade osteoclástica. Isto foi confirmado por PCR quantitativo que revelou maior relação Nox4/Nox1 nas aortas do grupo HCD vs Normal (gráfico 6). Também notamos maior expressão de RNA mensageiro da osteopontina nos coelhos HCD em relação aos Normais (figura 16 B). É possível que este seja um mecanismo inibitório da calcificação (WADA et al., 1999; STEIZ et al., 2002) comparável aos resultados da valva humana – figura 5. Ao redor da calcificação, existe maior atividade proliferativa nos coelhos HCD (figura 18 B), uma forma de reparação tecidual durante a mineralização. Por outro lado, ocorreu apoptose coincidente nesta topografia (figura 18 A), mecanismo importante para a iniciação da mineralização por ser um centro de depósito de hidroxapatita

(PROUDFOOT et al., 2000; PROUDFOOT et al., 2001). Estas observações são consistentes com os achados em valvas humanas.

A diminuição do colesterol total (aproximadamente 20%) nos coelhos HCDT em relação aos HCD (gráfico 1 B e tabela 1 B) ainda não tem um mecanismo bem estabelecido; entretanto, notamos um efeito análogo aos observados em camundongos hiperlipidêmicos após administração de compostos doadores de NO (KRIEGER et al., 2006). Estes compostos podem compartilhar de mecanismos em comum com o tempol, no sentido de aumentar a biodisponibilidade do NO e de reduzir o colesterol sérico. A ecogenicidade valvar ao final do protocolo (mês 3), índice semi-quantitativo de espessamento e calcificação valvar, foi maior nos grupos HCD e HCDT, sendo que o uso do ácido lipóico reduziu este índice a valores semelhantes ao Normal (gráfico 3 J). De maneira análoga, houve aumento da calcificação valvar à histologia nos coelhos HCD e HCDT em comparação aos HC DL, que foram iguais aos Normais (gráfico 5 A). A tomografia computadorizada de multi-detectores revelou maior calcificação exclusivamente nas aortas dos coelhos HCDT (gráfico 4). Este método tem boa sensibilidade para a detecção de calcificação bem estruturada no vaso, o que aconteceu, principalmente, nos animais HCDT. Portanto, percebemos maior calcificação nos coelhos HCDT em relação aos HC DL por 3 métodos distintos. Destacamos que os animais que receberam tempol foram exclusivamente aqueles que exibiram calcificação estruturada evidenciada pela tomografia de multi-detectores e que efetivamente tiveram um aumento do delta da área valvar (AVA final-AVA inicial) – gráfico 3 B, ratificando maior calcificação (gráfico 5 A) e menor AVA. É importante notar que a dispersão das medidas e, portanto, o desvio padrão da média foi maior nos coelhos HCDT, havendo um maior

Coeficiente de Variação ($CV = \text{desvio padrão}/\text{média}$) tanto na calcificação tecidual ($CV_{\text{HCD}}=1,06$; $CV_{\text{HCDT}}=1,24$; $CV_{\text{HCDL}}=1,00$), como na tomografia de multi-detecores ($CV_{\text{Normal}}=0,31$; $CV_{\text{HC}}=0,26$; $CV_{\text{HCD}}=0,28$; $CV_{\text{HCDT}}=0,48$; $CV_{\text{HCDL}}=0,20$)-dados não mostrados. Isto demonstra que alguns coelhos são mais suscetíveis à calcificação exagerada pelo tempol e que o processo acontece em progressão geométrica (BELLAMY et al., 2002). Além disso, o ácido lipóico, em oposição ao tempol, previniu o aumento da pressão de pulso (gráfico 2), provavelmente pela menor calcificação vascular (gráfico 5 A) e elastocalcinose. Os antioxidantes tempol e ácido lipóico aumentaram o colágeno das cúspides aórticas (estatisticamente não significante), perdido nos coelhos HC e HCD (gráfico 5 C), possivelmente pela inibição de collagenases, elastases e metaloproteinases por estes compostos (JIAN et al., 2001; BASALYGA et al., 2004).

O aumento da fluorescência tecidual pela oxidação da DHE nos coelhos HCD (principalmente em torno dos núcleos de calcificação) *versus* Normal foi inibido pelo ácido lipóico (HCDL) e mais intensamente pelo tempol (HCDT) – figura 11. Demonstramos que o ácido lipóico e, principalmente, o tempol diminuíram a quantidade do ânion radical superóxido tecidual, pois a oxidação do DHE se fez principalmente pelo superóxido (redução do sinal após incubação pela superóxido dismutase peguilada - figura 11). Poderíamos atribuir a maior ou menor fluorescência dos animais HCD e HCDT respectivamente, à maior ou menor quantidade de núcleos celulares (figura 12), pois o etídio, produto fluorescente de oxidação do DHE se liga ao DNA celular. Porém, percebemos que o aumento da fluorescência em HCD foi da ordem de 7 vezes, enquanto que o incremento da celularidade foi de apenas 2 vezes. Portanto, este fato não contribuiu isoladamente

para tais diferenças encontradas. De modo evidente, a diminuição do superóxido na lesão provocada pelo tempol e ácido lipóico podem ter reduzido a atividade funcional dos osteoclastos e aumentado a calcificação tecidual. Como a extensão da mineralização foi muito maior nos coelhos HCDT em oposição aos HCDL, poderíamos considerar que a atividade SOD mimética do tempol pode ter aumentado a biodisponibilidade do NO (figura 19), diminuindo a capacidade de diferenciação e reabsorção dos osteoclastos (MACINTYRE et al., 1991; RALSTON e GRABOWSKI, 1996; HOLLIDAY et al., 1997; MANCINI et al., 1998; COLLIN-OSDOBY et al., 2000).

A maior fluorescência pela oxidação da DCF-DA das valvas do grupo HCDT, inclusive em comparação com o HCD (figura 13), se correlacionou com a presença aumentada especialmente de peróxido de hidrogênio (decréscimo da fluorescência quando incubado com a catalase peguilada). Uma maior dismutação do superóxido pelo tempol ou ainda a ativação e/ou inibição enzimática pode ter resultado em maior disponibilidade de H_2O_2 nas valvas destes animais. O ácido lipóico reduziu muito a intensidade do sinal fluorescente, o que consolida sua predileção principalmente pelo peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e peroxinitrito (SKIBSKA et al., 2006). Entretanto, não podemos descartar formas indiretas de depuração de H_2O_2 . Por fim, mesmo com os controles apresentados, precisamos considerar que os estudos de microfluorotopografia tecidual têm limitações de especificidade na análise de ROS. Devido à pequena quantidade de tecido que tínhamos (a valva do coelho tem uma área de aproximadamente $0,2\text{ cm}^2$), este foi o único método possível de coletar tais dados.

O tempol (grupo HCDDT) aumentou a apoptose e diminuiu a proliferação celular ao redor da calcificação (figura 18 A e B), em linearidade aos resultados de menor contagem celular pelo DAPI quando comparamos com os animais HCD (figura 12). Como a morte celular é o passo inicial para a nucleação da calcificação (PROUDFOOT et al., 2000), a apoptose pode ter participado de maneira fundamental para uma maior mineralização valvar nestes animais.

Houve aumento na relação Nox4/Nox1 por PCR quantitativo nas aortas dos animais que receberam tempol (HCDDT) vs Normal, HCD e HCDDL (gráfico 6), o que poderia, eventualmente, explicar a maior calcificação vascular e valvar nestes coelhos. A redução da expressão da osteopontina nas aortas dos coelhos HCDDT em comparação aos HCD por RT-PCR (figura 16 B) também é uma das formas de entender a maior mineralização valvar e vascular nos primeiros.

Enfim, o tempol e o ácido lipóico mostraram resultados fisiológicos opostos com relação à calcificação tecidual, expressão das Nox e da osteopontina. Estas diferenças podem ser devidas a distintas propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e influência nos processos redox direta e indiretamente. Nossos dados sugerem uma interessante diferença no mecanismo do efeito antioxidante: o tempol diminuiu o superóxido na valva e aumentou particularmente o peróxido de hidrogênio, enquanto que o ácido lipóico diminuiu o superóxido e mais intensamente o peróxido de hidrogênio. Não podemos, contudo, descartar a possibilidade de que estes resultados fisiológicos opostos sejam decorrentes de ação indireta destes compostos em processos enzimáticos redox, ou mesmo na atividade osteoclástica, na secreção de matriz óssea pelas células vasculares calcificadoras e na modulação de

outras proteínas que regulam a calcificação (osteopontina, por exemplo). A correlação entre todas estas alterações, entretanto, não está clara até o momento.

O modelo de calcificação *in vitro* permitiu investigar isoladamente os processos metabólicos da calcificação, sem a influência do colesterol. Os resultados mostraram: aumento da mineralização com o estímulo calcificador, especialmente após a suplementação de tempol (gráfico 7); maior geração de superóxido após estímulo calcificador analisado por HPLC (aumento de hidroxietídio – gráfico 9 A) e incremento na atividade da NAD(P)H oxidase em fração de membrana que foi inibido pelo tempol e pelo ácido lipóico (gráfico 9 B). O aumento da expressão da osteopontina por western-blotting após a incubação da cultura de células musculares lisas com Vitamina D₃ e β-glicerofosfato coincidem com os resultados do modelo animal (figura 21). Da mesma maneira, a diminuição expressão da osteopontina após o suplemento de tempol ao estímulo calcificador também apóia a hipótese deste ser um dos mecanismos responsáveis pelo aumento da mineralização valvar e vascular nos coelhos HCDT (figura 21), pois a osteopontina é uma proteína inibidora da mineralização (WADA et al., 1999; STEITZ et al., 2002). Além disso, houve uma amplificação da mineralização diante da incubação da cultura de células musculares lisas com o peróxido de hidrogênio exógeno (gráfico 8), denotando que esta molécula pode ser importante para a indução da calcificação e que o ácido lipóico poderia retardar este processo por sua capacidade de depurar o H₂O₂ no sistema (figura 13).

Estudos clínicos com os antioxidantes tempol e ácido lipóico estão sendo conduzidos em diversas patologias como a hipertensão arterial sistêmica, diabetes, doença arterial coronária, câncer e doenças neurodegenerativas. Esta população, em

sua maioria, tem fatores de risco comuns à calcificação vascular e valvar. A amplificação da mineralização extrínseca com o tempol, tanto *in vivo* como *in vitro*, é uma advertência ao uso deste composto em pacientes suscetíveis à calcificação.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Desta forma, verificamos que existe um aumento do estresse oxidativo na estenose valvar aórtica humana e no modelo animal com grande similaridade topográfica e evolutiva, além do modelo de calcificação *in vitro* também corroborar com estes resultados. A NAD(P)H oxidase é uma das principais fontes enzimáticas de produção de ERO na valva durante o processo de calcificação, assim como ocorre no vaso. A sinalização redox via NAD(P)H oxidase, o aumento de peróxido de hidrogênio, a diminuição do superóxido, apoptose, além de outros mecanismos redox de ativação/inibição enzimática e de modificação da expressão/atividade de proteínas regulatórias envolvidas na secreção/reabsorção óssea, parecem ser mecanismos de integração importantes para o desenvolvimento da doença, como observado também no modelo *in vitro*, através da diminuição da expressão da osteopontina com o suplemento do tempol ao estímulo calcificador. A calcificação, por ser um processo dependente de apoptose e diferenciação celular, foi exacerbada com o uso de tempol *in vivo*, talvez pelo aumento da biodisponibilidade de $\cdot\text{NO}$, diminuição de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e aumento de H_2O_2 . Estes mecanismos parecem ser complexos, mas podem ter influência na atividade osteoclástica, secreção de matriz óssea por CVC e modulação de proteínas de calcificação e de reabsorção óssea.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, J.; BERK, B.C. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. **Trends Cardiovasc Med.** 8:59-63, 1998.

ABEDIN, M.; TINTUT, Y.; DEMER, L.L. Vascular Calcification. Mechanisms and Clinical Ramifications. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 24:1161-1170, 2004.

ADLER, Y.; LEVINGER, U.; KOREN, A.; TANNE, D.; FINK, N.; VATURI, M.; IAKOBISHVILI, Z.; BATTLER, A.; ZELIKOVSKI, A.; SAGIE, A. Relation of nonobstructive aortic valve calcium to carotid arterial atherosclerosis. **Am J Cardiol.** 86:1102-1105, 2000A.

ADLER, Y.; VATURI, M.; WISER, I.; SHAPIRA, Y.; HERZ, I.; WEISENBERG, D.; SELA, N.; BATTLER, A.; SAGIE, A. Nonobstructive aortic valve calcium as a window to atherosclerosis of the aorta. **Am J Cardiol.** 86:68-71, 2000B.

ADLER, Y.; SHEMESH, J.; TENENBAUM, A.; HOVAV, B.; FISMAN, E.Z.; MOTRO, M. Aortic valve calcium on spiral computed tomography (dual slice mode) is associated with advanced coronary calcium in hypertensive patients. **Coron Artery Dis.** 13:209-213, 2002A.

ADLER, Y.; VATURI, M.; HERZ, I.; IAKOBISHVILI, Z.; TOAF, J.; FINK, N.; BATTLER, A.; SAGIE, A. Nonobstructive aortic valve calcification: a window to significant coronary artery disease. **Atherosclerosis.** 161:193-197, 2002B.

AGMON, Y.; KHANDHERIA, B.K.; MEISSNER, I.; SICKS, JR.; O'FALLON, W.M.; WIEBERS, D.O.; WHISNANT, J.P.; SEWARD, J.B.; TAJIK, A.J.; Aortic valve sclerosis and aortic atherosclerosis: different manifestations of the same disease? Insights from a population-based study. **J Am Coll Cardiol.** 38:827-234, 2001.

ALLEN, R.G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radic Biol Med.** 28:463-499, 2000.

ANDERSON, H.C. Calcific diseases: a concept. **Arch Pathol Lab Med.** 107:341-348, 1983.

ANDERSON, T.J.; MEREDITH, I.T.; YEUNG, A.C.; FREI, B.; SELWYN, A.P.; GANZ, P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. **N Engl J Med.** 332:488-493, 1995A.

ANDERSON, T.J., UEHATA, A.; GERHARD, M.D.; MEREDITH, I.T.; KNAB, S.; DELAGRANGE, D.; LIEBERMAN, E.H.; GANZ, P.; CREAGER, M.A.; YEUNG, A.C. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. **J Am Coll Cardiol.** 26:1235-1241, 1995B.

ARONOW, W.S.; SCHWARTZ, K.S.; KOENIGSBERG, M. Correlation of serum lipids, calcium, and phosphorus, diabetes mellitus and history of systemic hypertension with presence or absence of calcified or thickened aortic cusps or root in elderly patients. **Am J Cardiol.** 59:998-999, 1987.

ARONOW, W.S.; AHN, C.; KRONZON, I.; GOLDMAN, M.E. Association of coronary risk factors and use of statins with progression of mild valvular aortic stenosis in older persons. **Am J Cardiol.** 88:693-695, 2001.

ASOU, Y.; RITTLING, S.R.; YOSHITAKE, H.; TSUJI, K.; SHINOMIYA, K.; NIFUJI, A.; DENHARDT, D.T.; NODA, M. Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. **Endocrinology.** 142:1325-1332, 2001.

BABIOR, B. NADPH oxidase: an update. **Blood.** 93:1464-1476, 1999.

BASALYGA, D.M.; SIMIONESCU, D.T.; XIONG, W.; BAXTER, B.T.; STARCHER, B.C.; VYAVAHARE, N.R. Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model. Role of matrix metalloproteinases. **Circulation.** 110:3480-3487, 2004.

BELLAMY, M.F.; PELLIKKA, P.A.; KLARICH, K.W.; TAJIK, A.J.; ENRIQUEZ-SARANO, M. Association of cholesterol levels, hydroxymethylglutaryl coenzyme-A reductase inhibitor treatment, and progression of aortic stenosis in the community. **J Am Coll Cardiol.** 40:1723-1730, 2002.

BENNETT, M.R. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. **Cardiovasc Res.** 41:361-368, 1999.

BONINI, M.G.; MASON, R.P.; AUGUSTO, O. The Mechanism by which 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (tempol) diverts peroxynitrite decomposition from nitrating to nitrosating species. **Chem Res Toxicol.** 15:506-511, 2002.

BONOW, R.O.; CARABELLO, B.; DE LEON JR, A.C.; EDMUNDS JUNIOR, L.H.; FEDDERLY, B.J.; FREED, M.D.; GAASCH, W.H.; MCKAY, C.R.; NISHIMURA, R.A.; O'GARA, P.T.; O'ROURKE, R.A.; RAHIMTOOLA, S.H.; RITCHIE, J.L.; CHEITLIN, M.D.; EAGLE, K.A.; GARDNER, T.J.; GARSON JR, A.; GIBBONS, R.J.; RUSSELL, R.O.; RYAN, T.J.; SMITH JR, S.C. Guidelines for the management of patients with valvular heart disease: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Patients with Valvular Heart Disease). **Circulation.** 98:1949-1984, 1998.

BOON, A.; CHERIEX, E.; LODDER, J.; KESSELS, F. Cardiac valve calcification: characteristics of patients with calcification of the mitral annulus or aortic valve. **Heart.** 78:472-474, 1997.

BOSTROM, K.; WATSON, K.E.; HORN, S.; WORTHAM, C.; HERMAN, I.M.; DEMER, L.L. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. **J Clin Invest.** 91:1800-1809, 1993.

BOSTROM, K.; WATSON, K.E.; STANFORD, W.P.; DEMER, L.L. Atherosclerotic calcification: relation to developmental osteogenesis. **Am J Cardiol.** 75:88-91, 1995.

BOSTROM, K.; TSAO, D.; SHEN, S.; WANG, Y.; DEMER, L.L. Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells. **J Biol Chem.** 276:14044–14052, 2001.

BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S.; LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature.** 423; 337-42, 2003.

BRANCH, K.R.; O'BRIEN, K.D.; OTTO, C.M. Aortic valve sclerosis as a marker of active atherosclerosis. **Curr Cardiol Rep.** 4:111-117, 2002.

BRANDES, R.P.; BARTON, M.; PHILIPPENS, K.M.; SCHWEITZER, G.; MUGGE, A. Endothelial-derived superoxide anions in pig coronary arteries: evidence from lucigenin chemiluminescence and histochemical techniques. **J Physiol.** 500:331-342, 1997.

BRANDES, R.P.; MILLER, F.J.; BEER, S.; HAENDELER, J.; HOFFMANN, J.; HA, T.; HOLLAND, S.M.; GORLACH, A.; BUSSE, R. The vascular NADPH oxidase subunit p47phox is involved in redox-mediated gene expression. **Free Rad Biol Medicine.** 32:1116-1122, 2002.

BRAUNWALD, E. Valvular heart disease: aortic stenosis, etiology and pathology. In: BRAUNWALD, E. **Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine**, WB Saunders Co. 1035-1036, 1992.

BROWN, B.G.; ZHAO X.Q.; SACCO D.; ALBERS J.J. Lipid lowering and plaque regression: new insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. **Circulation.** 87:1781-1791, 1993.

BROWNER, W.S.; LUI, L.Y.; CUMMINGS, S.R. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. **J Clin Endocrinol Metab.** 86:631-637, 2001.

BUWAY, N.; SAROSI, I.; DUNSTAN, C.R.; MORONY, S.; TARPLEY, J.; CAPPARELLI, C.; SCULLY, S.; TAN, H.L.; XU, W.; LACEY, D.L.; BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. **Genes Dev.** 12:1260-1268, 1998.

CAI, H.; HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in Cardiovascular diseases – the role of oxidant stress. **Circ Res.** 87:840-844, 2000.

CARABELLO, B.A. Evaluation and management of patients with aortic stenosis. **Circulation.** 105:1746-1750, 2002.

CARROLL, R.T.; GALATSIS, P.; BOROSKY, S.; KOPEC, K.K.; KUMAR, V.; ALTHAUS, J.S.; HALL, E.D. 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Tempol) inhibits peroxynitrite-mediated phenol nitration. **Chem Res Toxicol.** 4:294-300, 2000.

CHEN, N.X.; O'NEILL, K.D.; DUAN, D.; MOE, S.M. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. **Kidney Int.** 62:1724-1731, 2002.

CHUI, M.C.; NEWBY, D.E.; PANARELLI, M.; BLOOMFIELD, P.; BOON, N.A. Association between calcific aortic stenosis and hypercholesterolemia: is there a need for a randomized controlled trial of cholesterol-lowering therapy? **Clin Cardiol.** 24:52-55, 2001.

COLLIN-OSDOBY, P.; ROTHE, L.; BEKKER, S.; ANDERSON, F.; OSDOBY, P.; Decreased nitric oxide levels stimulate osteoclastogenesis and bone resorption both in vitro and in vivo on the chick chorioallantoic membrane in association with neoangiogenesis. **J Bone Miner Res.** 15:474-488, 2000.

COLLIN-OSDOBY, P.; ROTHE, L.; ANDERSON, F.; NELSON, M.; MALONEY, W.; OSDOBY, P. Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. **J Biol Chem.** 276:20659-20672, 2001.

COWELL, S.J.; NEWBY, D.E.; PRESCOTT, R.J.; BLOOMFIELD, P.; REID, J.; NORTHBRIDGE, D.B.; BOON, N.A. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. **N Engl J Med.** 352:2389-2397, 2005.

DARDEN, A.G.; RIES, W.L.; WOLF, W.C.; RODRIGUIZ, R.M.; KEY JR, L.L. Osteoclastic superoxide production and bone resorption: stimulation and inhibition by modulators of NADPH oxidase. **J Bone Miner Res.** 11:671-675, 1996.

DELLA CROCE, C.; BONZETTI, G.; CINI, M.; CALTAVUTURO, L.; POI, G. Protective effect of lipoic acid against hydrogen peroxide in yeast cells. **Toxicology in Vitro.** 17:753-759, 2003.

DEMER, L.L. Cholesterol in vascular and valvular calcification. **Circulation.** 104:1881-1883, 2001.

DEMER, L.L.; TINTUT, Y.; PARHAMI, F. Novel mechanisms in accelerated vascular calcification in renal disease patients. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension.** 11:437-443, 2002.

DHORE, C.R.; CLEUTJENS, J.P.; LUTGENS, E.; CLEUTJENS, K.B.; GEUSENS, P.P.; KITSLAAR, P.J.; TORDOIR, J.H.; SPRONK, H.M.; VERMEER, C.; DAEMEN, M.J. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 21:1998-2003, 2001.

DOHERTY, M.J.; ASHTON, B.A.; WALSH, S.; BERESFORD, J.N.; GRANT, M.E.; CANFIELD, A.E. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. **J Bone Miner Res.** 13:828-838, 1998.

DOHERTY, T.M.; FITZPATRICK, L.A.; INOUE, D.; QIAO, J.H.; FISHBEIN, M.C.; DETRANO, R.C.; PREDIMAN, K.; SHAH, P.K.; RAJAVASHISTH, T.B. Molecular, Endocrine, and Genetic Mechanisms of Arterial Calcification. **Endocrine Reviews.** 25:629-672, 2004.

DROLET, MC.; ARSENAULT, M.; COUET, J. Experimental aortic valve stenosis in rabbits. **J Am Coll Cardiol.** 41:1211-1217, 2003.

EDWARDS, W.D. Surgical pathology of the aortic valve: degenerative disease. In: WALLER, B.F. ed. **Pathology of the Heart and Great Vessels**. New York, NY: Churchill Livingstone; p.71-74, 1988.

FARZANEH-FAR, A.; PROUDFOOT, D.; WEISSBERG, P.L.; SHANAHAN, C.M. Matrix gla protein is regulated by a mechanism functionally related to the calciumsensing receptor. **Biochem Biophys Res Commun**. 277:736-740, 2000.

FARZANEH-FAR, A.; PROUDFOOT, D.; SHANAHAN, C.; WEISSBERG, P.L. Vascular and valvar calcification: recent advances. **Heart**. 85:13-17, 2001.

FERNANDES, D.C.; WOSNIAK, J.; PESCATORE, L.A.; BERTOLINI, M.A.; LIBERMAN, M.; LAURINDO, F.; SANTOS, C.X. Analysis of dihydrorhodium-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NAPH oxidase activity in vascular systems. **Am J Physiol Cell Physiol**. 292:413-422, 2007.

FITZPATRICK, L.A.; SEVERSON, A.; EDWARDS, W.D.; INGRAM, R.T. Diffuse calcification in human coronary arteries: association of osteopontin with atherosclerosis. **J Clin Invest**. 94:1597-1604, 1994.

FRIDOVICH, I. Editorial commentary on “superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is directly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide”. **Free Radical Biology and Medicine**. 34:1357-1358, 2003.

GALANTE, A.; PIETROIUSTI, A.; VELLINI, M.; PICCOLO, P.; POSSATI, G.; DE BONIS, M.; GRILLO, R.L.; FONTANA, C.; FAVALLI, C. C-reactive protein is increased in patients with degenerative aortic valvular stenosis. **J Am Coll Cardiol**. 38:1078-1082, 2001.

GARCIA, D.; DUMESNIL, J.G.; DURAND, L.G.; KADEM, L.; PIBAROT, P. Discrepancies between catheter and Doppler estimates of valve effective orifice area can be predicted from the pressure recovery phenomenon: practical implications with regard to quantification of aortic stenosis severity. **J Am Coll Cardiol.** 41:435-442, 2003.

GELVAN, D.; SALTMAN, P.; POWELL, S.R. Cardiac reperfusion damage prevented by a nitroxide free radical. **Proc Natl Acad Sci USA.** 88:4680-4684, 1991.

GERTZ, S.D.; KURGAN, A.; EISENBERG, D. Aneurysm of the rabbit common carotid artery induced by periarterial application of calcium chloride in vivo. **JCI.** 81:649-656, 1988.

GIACHELLI, C.M.; BAE, N.; ALMEIDA, M.; DENHARDT, D.T.; ALPERS, C.E.; SCHWARTZ, S.M. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. **J Clin Invest.** 92:1686-1696, 1993.

GIACHELLI, C.M. Inducers and inhibitors of biomineralization: lessons from pathological calcification. **Orthod Craniofac Research.** 8:229-231, 2005.

GOLDSMITH, H.L.; LABROSSE, J.M.; MCINTOSH, F.A.; MAENPAA, P.H.; KAARTINEN, M.T.; MCKEE, M.D. Homotypic interactions of soluble and immobilized osteopontin. **Ann Biomed Eng.** 30:840-850, 2002.

GOODMAN, WG. Vascular calcification in chronic renal failure. **Lancet.** 358:1115-1116, 2001.

GÖRLACH, A.; BRANDES, RP.; NGUYEN, K.; DEHGHANI, F.; BUSSE, R. A gp91phox containing NAD(P)H oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. **Circulation Research.** 87:26-32, 2000.

GRIENDLING, K.K.; USHIO-FUKAI, M. NADH/NADPH oxidase and vascular function. **Trends Cardiovascular Med.** 7:302-307, 1997.

GRIENDLING, K.K.; USHIO-FUKAI, M. Redox control of vascular smooth muscle proliferation. **J Lab Clin Med.** 132:9-15, 1998.

GRIENDLING, K.K.; USHIO-FUKAI, M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. **Regul Pept.** 91:21-27, 2000.

GRIENDLING, K.K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ Res.** 86:494-501, 2000A.

GRIENDLING, K.K.; SORESCU, D.; LASSEGUE, B.; USHIO-FUKAI, M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 20:2175-2183, 2000B.

HARRISON, D.; GRIENDLING, K.; LANDMESSER, U.; HORNIG, B.; HELMUT D. Role of oxidative stress in atherosclerosis. **American Journal of Cardiology.** 91: 7-11, 2003.

HASS, G.; TRUEHEART, R.; HEMMENS, A. Experimental arteriosclerosis due to hypervitaminosis D. **Am J Pathol.** 37:521-549, 1960.

HIROTA, S.; IMAKITA, M.; KOHRI, K.; ITO, A.; MORII, E.; ADACHI, S.; KIM, H.M.; KITAMURA, Y.; YUTANI, C.; NOMURA, S. Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques: a possible association with calcification. **Am J Pathol.** 143:1003-1008, 1993.

HISAR, I.; ILERI, M.; YETKIN, E.; TANDOĞAN, I.; CEHRELI, S.; ATAĞ, R.; SENEN, K.; DEMIRKAN, D. Aortic valve calcification: its significance and limitation as a marker for coronary artery disease. **Angiology.** 53:165-169, 2002.

HOFBAUER, L.C.; SHUI, C.; RIGGS B.L.; DUNSTAN, C.R.; SPELSBERG, T.C.; O'BRIEN, T.; KHOSLA, S. Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF-kappaB ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 280:334-339, 2001.

HOLLIDAY, L.S.; DEAN, A.D.; LIN, R.H.; GREENWALD, J.E.; GLUCK, S.L. Low NO concentrations inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures by cGMP-dependent mechanism. **Am J Physiol.** 272:283-291, 1997.

HONG, M.; VOSSOUGH, J.; HAUDENSCHILD, C.; WONG, S.; ZUCKENMAN, B.; LEON, M. Vascular effects of diet-induced hypercalcemia after balloon artery injury in giant Flemish rabbits. **Am Heart J.** 130:758-764, 1995.

HUNT, J.L.; FAIRMAN, R.; MITCHELL, M.E.; CARPENTER, J.P.; GOLDEN, M.; KHALAPYAN, T.; WOLFE, M.; NESCHIS, D.; MILNER, R.; SCOLL, B.; CUSACK, A.; MOHLER III, E.R. Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. **Stroke.** 33:1214-1219, 2002.

IANNONE, A.; BINI, A.; SWARTZ, H.M.; TOMASI, A.; VANNINI, V. Metabolism in rat liver microsomes of the nitroxide spin probe tempol. **Biochem Pharmacol.** 38:2581-2586, 1989.

IKEDA, T.; SHIRASAWA, T.; ESAKI, Y.; YOSHIKI, S.; HIROKAWA, K. Osteopontin mRNA is expressed by smooth muscle-derived foam cells in human atherosclerotic lesions of the aorta. **J Clin Invest.** 92:2814-2820, 1993.

IRANI, K.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P.J. Ras, superoxide and signal transduction. **Biochem Pharmacol.** 55:1339-1346, 1998.

IRANI, K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. **Circ Res.** 87:179-183, 2000.

JANISZEWSKI, M.; SOUZA, H.P.; LIU, X.; PEDRO, M.A.; ZWEIER, J.L.; LAURINDO, F.R. Overestimation of NADH-driven vascular oxidase activity due to lucigenin artifacts. **Free Radic Biol Med.** 32:446-453, 2002.

JANISZEWSKI, M.; LOPES, L.R.; CARMO, A.O.; PEDRO, M.A.; BRANDES, R.P.; SANTOS, C.X.; LAURINDO, F.R. Regulation of NADP(H) oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem** 280:40813-40819, 2005.

JIAN, B.; JONES, P.L.; LI, Q.; MOHLER, E.R.; SCHOEN, F.J.; LEVY, R.J. Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis. **Am J Pathol.** 159:321-327, 2001.

JIE, K.S.; BOTS, M.L.; VERMEER, C.; WITTEMAN, J.C.; GROBBEE, D.E. Vitamin K intake and osteocalcin levels in women with and without aortic atherosclerosis: a population-based study. **Atherosclerosis.** 116:117-123, 1995.

JONO, S.; NISHIZAWA, Y.; SHIOI, A.; MORII, H. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. **Circulation.** 98:1302-1306, 1998.

JONO, S.; MCKEE, M.D.; MURRY, C.E.; SHIOI, A.; NISHIZAWA, Y.; MORI, K.; MORII, H.; GIACHELLI, C.M. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. **Circ Res.** 87:E10-E17, 2000A.

JONO, S.; PEINADO, C.; GIACHELLI, C.M. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. **J Biol Chem.** 275:20197-20203, 2000B.

KARMEI, F.; ELIAKIM, R.; OKON, E.; SAMUNI, A.; RACHMILEWITZ, D. A stable nitroxide radical effectively decreases mucosal damage in experimental colitis. **Gut.** 37:386-393, 1995.

KASTEN, T.P.; COLLIN-OSDOBY, P.; PATEL, N.; OSDOBY, P.; KRUKOWSKI, M.; MISKO, T.P.; SETTLE, S.L.; CURRIE, M.G.; NICKOLS, G.A. Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. **PNAS**. 91: 3569-3573, 1994.

KEY JR, L.L.; RIES, W.L.; TAYLOR, R.G.; HAYS, B.D.; PITZER, B.L. Oxygen derived free radicals in osteoclasts: the specificity and location of the nitroblue tetrazolium reaction. **Bone**. 11:115-119, 1990.

KEY JR, L.L.; WOLF, W.C.; GUNDBERG, C.M.; RIES, W.L. Superoxide and bone resorption. **Bone**. 15:431-436, 1994.

KINSCHERF, R.; WAGNER, M.; KAMENCIC, H.; BONATERRA, G.A.; HOU, D.; SCHIELE, R.A.; DEIGNER, H.P.; METZ, J. Characterization of apoptotic macrophages in atheromatous tissue of humans and heritable hyperlipidemic rabbits. **Atherosclerosis**. 144:33-39, 1999.

KIZER, J.R.; GEFTER, W.B.; DELEMOS, A.S.; SCOLL, B.J.; WOLFE, M.L.; MOHLER III, E.R. Electron beam computed tomography for the quantification of aortic valvular calcification. **J Heart Valve Dis**. 10:361-366, 2001.

KOCKX, M.M.; DE MEYER, G.R.; MUHRING, J.; JACOB, W.; BULT, H.; HERMAN A.G. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. **Circulation**. 97:2307-2315, 1998.

KRIEGER, M.H.; SANTOS, K.F.; SHISHIDO, S.M.; WANSCHER, A.C.; ESTRELA, H.F.; SANTOS, L.; DE OLIVEIRA, M.G.; FRANCHINI, K.G.; SPADARI-BRATFISCH, R.C.; LAURINDO, F.R. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. **Nitric Oxide**. 14:12-20, 2006.

KUNSCH, C.; MEDFORD, R.M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. **Circ Res**. 85:753-766, 1999.

KWON, H.M.; LEE, B.K.; KIM, D.; HONG, B.K.; BYUN, K.H.; KNA, J.S.; KIM, I.J.; OH, S.H.; KIM, H.S. Experimental hypercholesterolemia induces ultrastructural changes in the elastic laminae of rabbit aortic valve. **Yonsei Med J.** 39:345-354, 1998.

LEE, T.M.; LIN, M.S.; CHOU, T.F.; CHANG, N.C. Effect of simvastatin on left ventricular mass in hypercholesterolemic rabbits. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 288:H1352-H1358, 2005.

LI, X.; YING YANG, H.; GIACHELLI, C.M. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. **Circ Res.** 98:905-912, 2006.

LI, Y.; ZHU, H.; KUPPUSAMY, P.; ROUBAUD, V.; ZWEIER, J.L.; TRUSH, M.A. Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. **J Biol Chem.** 273:2015-2023, 1998.

LIBBY, P.; AIKAWA, M. New insights into plaque stabilisation by lipid lowering. **Drugs.** 56:9-13, 1998.

LINDROOS, M.; KUPARI, M.; HEIKKILÄ, J.; TILVIS, R. Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample. **J Am Coll Cardiol.** 21:1220-1225, 1993.

LOESER, R.F.; WALLIN, R. Cell adhesion to matrix Gla protein and its inhibition by an Arg-Gly-Asp-containing peptide. **J Biol Chem.** 267:9459-9462, 1992.

LUO, G.; DUCY, P.; MCKEE, M.D.; PINERO, G.J.; LOYER, E.; BEHRINGER, R.R.; KARSENTY, G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. **Nature.** 386:78-81, 1997.

MACINTYRE, I.; ZAIDI, M.; ALAM, A.S.M.T.; DATTA, H.K.; MOONGA, B.S.; LIDBURY, O.S.; HECKER, M.; VANE, J.R. Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. **PNAS;** 88: 2936-2940, 1991.

MAHER, E.R.; PAZIANAS, M.; CURTIS, J.R. Calcific aortic stenosis: A complication of chronic uraemia. **Nephron**. 47:119-122, 1987.

MANCINI, L.; MORADI-BIDHENDI, N.; BRANDI, M.L.; MACINTYRE, I. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite modulate osteoclast activity. **Biochem Biophys Res Commun**. 243:785-790, 1998.

MASSY, Z.A.; MAZIÈRE, C.; KAMEL, C.S.; BRAZIER, M.; CHOUKROUN, G.; TRIBOUILLOY, C.; SLAMA, M.; ANDREJAK, M.; MAZIÈRE, J.C. Impact of inflammation and oxidative stress on vascular calcifications in chronic kidney disease. **Pediatr Nephrol**. 20:380-382, 2005.

MATSUI, Y.; RITTLING, S.R.; OKAMOTO, H.; INOBE, M.; JIA, N.; SHIMIZU, T.; AKINO, M.; SUGAWARA, T.; MORIMOTO, J.; KIMURA, C.; KON, S.; DENHARDT, D.; KITABATAKE, A.; UEDE, T. Osteopontin deficiency attenuates atherosclerosis in female apolipoprotein e-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 23:1029-1034, 2003.

MATSUZAKI, K.; UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N.; YAMAGUCHI, K.; YASUDA, H.; SHIMA, N.; MORINAGA, T.; TOYAMA, Y.; YABE, Y.; HIGASHIO, K.; SUDA, T. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. **Biochem Biophys Res Commun**. 246:199-204, 1998.

MEHRABI, M.R.; SINZINGER, H.; EKMEKCIOGLU, C.; TAMADDON, F.; PLESCH, K.; GLOGAR, H.D.; MAURER, G.; STEFENELLI, T.; LANG, I.M. Accumulation of oxidized LDL in human semilunar valves correlates with coronary atherosclerosis. **Cardiovasc Res**. 45:874-882, 2000.

MEHRABI, M.R.; SERBECIC, N.; EKMEKCIOGLU, C.; TAMADDON, F.; WILD, T.; PLESCH, K.; SINZINGER, H.; GLOGAR, H.D. Enhanced accumulation of the isoprostane, 8-epi-PGF2 alpha, in human aortic and pulmonary valves of patients with coronary heart disease. **Histol Histopathol**. 17:1053-1059, 2002.

MILLER JR, F.J.; GUTTERMAN, D.D.; RIOS, C.D.; HEISTAD, D.D.; DAVIDSON, B.L. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. **Circ Res.** 82:1298-1305, 1998.

MITCHEL, J.B.; DEGRAFF, W.; KAUFMAN, D.; KRISHNA, M.C.; SAMUNI, A.; FINKELSTEIN, E.; AHN, M.S.; HAHN, S.M.; GAMSON, J.; RUSSON, A. Inhibition of oxygen-dependent radiation-induced damage by the nitroxide superoxide dismutase mimetic, tempol. **Arch Biochem Biophys.** 289:62-70, 1991.

MIYAUCHI, A.; ALVAREZ, J.; GREENFIELD, E.M.; TETI, A.; GRANO, M.; COLUCCI, S.; ZAMBONIN-ZALLONE, A.; ROSS, F.P.; TEITELBAUM, S.L.; CHERESH, D.; HRUSKA, K.A. Recognition of osteopontin and related peptides by an $\alpha_v \beta_3$ integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. **J Biol Chem.** 266:20369-20374, 1991.

MODY, N.; PARHAMI, F.; SARAFIAN, T.A.; DEMER, L.L. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. **Free Radic Biol Med.** 31:509-519, 2001.

MOHLER III, E.R.; ADAM, L.P.; MCCLELLAND, P.; GRAHAM, L.; HATHAWAY, D.R. Detection of osteopontin in calcified human aortic valves. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 17:547-552, 1997.

MOHLER III, E.R.; CHAWLA, M.K.; CHANG, A.W.; VYAVAHARE, N.; LEVY R.J.; GRAHAM, L.; GANNON F.H. Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. **J Heart Valve Dis.** 8:254-260, 1999.

MOHLER III, E.R. Are atherosclerotic processes involved in aortic-valve calcification? **Lancet.** 356:524-525, 2000.

MOHLER III, E.R.; GANNON, F.; REYNOLDS, C.; ZIMMERMAN, R.; KEANE, M.G.; KAPLAN, F.S. Bone formation and inflammation in cardiac valves. **Circulation.** 103:1522-1528, 2001.

MONCKEBERG, J.G. Der normale histologische Bau und die Sklerose der Aortenklappen. **Virchows Arch Pathol Anat Physiol.** 176:472-514, 1904.

MORI, K.; SHIOI, A.; JONO, S.; NISHIZAWA, Y.; MORII, H. Expression of matrix Gla protein (MGP) in an in vitro model of vascular calcification. **FEBS Lett.** 433:19-22, 1998.

MORTENSEN, J.T.; BRINCK, P.; BINDERUP, L. Toxicity of vitamin D analogues in rats fed diets with standard or low calcium contents. **Pharmacol Toxicol.** 72:124-127, 1993.

MOURA, L.M.; RAMOS, S.F.; ZAMORANO, J.L.; BARROS, I.M.; AZEVEDO, L.F.; ROCHA-GONÇALVES, F.; RAJAMANNAN, N.M. Rosuvastatin affecting aortic valve endothelium to slow the progression of aortic stenosis. **J Am Coll Cardiol.** 49:554-561, 2007.

MOVILLI, E.; FELICIANI, A.; CAMERINI, C.; BRUNORI, G.; ZUBANI, R.; SCOLARI, F.; PARRINELLO, G.; CANCARINI, G.C. A high calcium-phosphate product is associated with high C-reactive protein concentrations in hemodialysis patients. **Nephron Clin Pract.** 101:c161-c167, 2005.

NASSIMIHA, D.; ARONOW, W.S.; AHN, C.; GOLDMAN, M.E. Association of coronary risk factors with progression of valvular aortic stenosis in older persons. **Am J Cardiol.** 87:1313-1314, 2001.

NGO, M.V.; GOTTDIENER, J.S.; FLETCHER, R.D.; FERNICOLA, D.J.; GERSH, B.J. Smoking and obesity are associated with the progression of aortic stenosis. **Am J Geriatr Cardiol.** 10:86-90, 2001.

NIEDERHOFFER, N.; BOBRYSHEV, Y.; LARTTAUD-IDJOUADIENE, I.; GUIMMELLY, P.; ATKINSON, J. Aortic calcification produced by vitamin D3 plus nicotine. **J Vasc Res.** 34:386-398, 1997.

NILSSON, U.A.; OLSSON, L.I.; CARLIN, G.; BYLUND-FELLENIIUS, A.C. Inhibition of lipid peroxidation by spin labels: relationships between structure and function. **J Biol Chem.** 19:11131-11135, 1989.

NOVARO, G.M.; TIONG, I.Y.; PEARCE, G.L.; LAUER, M.S.; SPRECHER, D.L.; GRIFFIN, B.P. Effect of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors on the progression of calcific aortic stenosis. **Circulation**. 104:2205-2209, 2001.

O'BRIEN, E.R.; GARVIN, M.R.; STEWART, D.K.; HINOHARA, T.; SIMPSON, J.B.; SCHWARTZ, S.M.; GIACHELLI, C.M. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. **Arterioscler Thromb**. 14:1648-1656, 1994.

O'BRIEN, K.D.; KUUSISTO, J.; REICHENBACH, D.D.; FERGUSON, M.; GIACHELLI, C.; ALPERS, C.E.; OTTO, C.M. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. **Circulation**. 92:2163-2168, 1995.

O'BRIEN, K.D.; REICHENBACH, D.D.; MARCOVINA, S.M.; KUUSISTO, J.; ALPERS, C.E.; OTTO, C.M. Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 16:523-532, 1996.

O'BRIEN, K.D.; SHAVELLE, D.M.; CAULFIELD, M.T.; MCDONALD, T.O.; OLIN-LEWIS, K.; OTTO, C.M.; PROBSTFIELD, J.L. Association of angiotensin-converting enzyme with low-density lipoprotein in aortic valvular lesions and in human plasma. **Circulation**. 106:2224-2230, 2002.

OFFER, T.; RUSSO, A.; SAMUNI, A. The pro-oxidative activity of SOD and nitroxide SOD mimics. **FASEB J**. 14:1215-1223, 2000.

OHMORI, R.; MOMIYAMA, Y.; TANIGUCHI, H.; TAKAHASHI, R.; KUSUHARA, M.; NAKAMURA, H.; OHSUZU, F. Plasma osteopontin levels are associated with the presence and extent of coronary artery disease. **Atherosclerosis**. 170:333-337, 2003.

OLSSON, M.; THYBERG, J.; NILSSON, J. Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 19:1218-1222, 1999.

OTAWARA, Y.; PRICE, P.A. Developmental appearance of matrix GLA protein during calcification in the rat. **J Biol Chem.** 261:10828-10832, 1986.

OTTO, C.M.; PEARLMAN, A.S. Doppler echocardiography in adults with symptomatic aortic stenosis. Diagnostic utility and cost-effectiveness. **Arch Intern Med.** 148:2553-2560, 1988.

OTTO, C.M.; KUUSISTO, J.; REICHENBACH, D.D.; GOWN, A.M.; O'BRIEN, K.D. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. **Circulation.** 90:844-853, 1994.

OTTO, C.M.; LIND, B.K.; KITZMAN, D.W.; GERSH, B.J.; SISCOVICK, D.S. Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. **N Engl J Med.** 341:142-147, 1999.

PACKER, L.; WITF, E.H.; TRITSCHLER, H.J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radical Biology and Medicine.** 19: 227-250, 1995.

PACKER, L.; KRAEMER, K.; RIMBACH, G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. **Nutrition.** 17:888-895, 2001.

PALTA, S.; PAI, A.M.; GILL, K.S.; PAI, R.G. New insights into the progression of aortic stenosis: implications for secondary prevention. **Circulation.** 101:2497-2502, 2000.

PARHAMI, F.; MORROW, A.D.; BALUCAN, J.; LEITINGER, N.; WATSON, A.D.; TINTUT, Y.; BERLINER, J.A.; DEMER, L.L. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 17:680-687, 1997.

PARHAMI, F.; DEMER, L.L. Arterial calcification in face of osteoporosis in ageing: Can we blame oxidized lipids? **Curr. Opin. Lipidol.** 8:312-314, 1997.

PARHAMI, F.; BASSERI, B.; HWANG, J.; TINTUT, Y.; DEMER, L.L. High-density lipoprotein regulates calcification of vascular cells. **Circ Res.** 91:570-576, 2002.

PEARLMAN, A.S. Medical treatment of aortic stenosis: promising, or wishful thinking? **J Am Coll Cardiol.** 40:1731-1734, 2002.

PICCOLI, C.; RIA, R.; SCRIMA, R.; CELA, O.; D'APRILE, A.; BOFFOLI, D.; FALZETTI, F. Characterization of mitochondrial and extra mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells: novel evidence of the occurrence of NADPH oxidase activity. **J. Biol Chem.** 280: 26467-26476 , 2005.

POGGIANTI, E.; VENNERI, L.; CHBUCHNY, V.; JAMBRIK, Z.; BARONCINI, L.A.; PICANO, E. Aortic valve sclerosis is associated with systemic endothelial dysfunction. **J Am Coll Cardiol.** 41:136-141, 2003.

POHLE, K.; MAFFERT, R.; ROPERS, D.; MOSHAGE, W.; STILIANAKIS, N.; DANIEL, W.G.; ACHENBACH, S. Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors. **Circulation.** 104:1927-1932, 2001.

PRICE, P.A.; URIST, M.R.; OTAWARA, Y. Matrix Gla protein, a new γ -carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. **Biochem Biophys Res Commun.** 117: 765-771, 1983.

PRICE, P.A.; JUNE, H.H.; BUCKLEY, J.R.; WILLIAMSON, M.K. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 21:1610-1616, 2001.

PROUDFOOT, D.; SKEPPER, J.N.; HEGYI, L.; BENNETT, M.R.; SHANAHAN, CM.; WEISSBERG, P.L. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. **Circ Res.** 87:1055-1062, 2000.

PROUDFOOT, D.; SKEPPER, J.N.; HEGYI, L.; FARZANEH-FAR, A.; SHANAHAN, C.M.; WEISSBERG, P.L. The role of apoptosis in the initiation of vascular calcification. **Z Kardiol.** 90 Suppl 3:43-46, 2001.

QUINONES, M.A.; OTTO, C.M.; STODDARD, M.; WAGGONER, A.; ZOGHBI, W. Recommendations for Quantification of doppler Echocardiography: A Report From the Doppler Quantification Task Force of the Nomenclature and Standards Committee of the American Society of Echocardiography. **J Am Soc Echocardiogr.** 15:167-184, 2002.

RAGGI, P.; CALLISTER, T.Q.; COOIL, B.; HE, Z.X.; LIPPOLIS, N.J.; RUSSO, D.J.; ZELINGER, A.; MAHMARIAN, J.J. Identification of patients at increased risk of first unheralded acute myocardial infarction by electron-beam computed tomography. **Circulation.** 101:850-855, 2000.

RAJAMANNAN, N.M.; SANGIORGI, G.; SPRINGETT, M.; ARNOLD, K.; MOHACSI, T.; SPAGNOLI, L.G.; EDWARDS, W.D.; TAJIK, A.J.; SCHWARTZ, R.S. Experimental hypercholesterolemia induces apoptosis in the aortic valve. **J Heart Valve Dis.** 10:371-374, 2001.

RAJAMANNAN, N.M.; SUBRAMANIAM, M.; SPRINGETT, M.; SEBO, T.C.; NIEKRASZ, M.; MCCONNELL, J.P.; SINGH, R.J.; STONE, N.J.; BONOW, R.O.; SPELSBERG, T.C. Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced cellular proliferation and bone matrix production in the rabbit aortic valve. **Circulation.** 105:2660-2665, 2002.

RALLIDIS, L.; NAOUMOVA, R.P.; THOMPSON, G.R.; NIHOYANNOPOULOS, P. Extent and severity of atherosclerotic involvement of the aortic valve and root in familial hypercholesterolaemia. **Heart.** 80:583-590, 1998.

RALSTON, S.H.; GRABOWSKI, P.S. Mechanisms of cytokine induced bone resorption: role of nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate, and prostaglandins. **Bone.** 19:29-33, 1996.

RIES, W.L.; KEY, L.L.; RODRIGUIZ, R.M. Nitroblue tetrazolium reduction and bone resorption by osteoclasts in vitro inhibited by a manganese-based superoxide dismutase mimic. **J. Bone Miner. Res.** 7:931-939, 1992.

ROBERTS, W.C. The senile cardiac calcification syndrome. **Am J Cardiol.** 58:572-574, 1986.

RODRIGUIZ, R.M.; KEY, L.L.; RIES, W.L. Combination macrophage-colony stimulating factor and interferon-gamma administration ameliorates the osteopetrotic condition in microphthalmic (mi/mi) mice. **Pediatr. Res.** 33:384-389, 1993.

ROSENHEK, R.; RADER, F.; LOHO, N.; GABRIEL, H.; HEGER, M.; KLAAR, U.; SCHEMPER, M.; BINDER, T.; MAURER, G.; BAUMGARTNER, H. Statins but not angiotensin-converting enzyme inhibitors delay progression of aortic stenosis. **Circulation.** 110:1291-1295, 2004.

SAKATA, N.; NOMA, A.; YAMAMOTO, Y.; OKAMOTO, K.; MENG, J.; TAKEBAYASHI, S.; NAGAI, R.; HORIUCHI, S. Modification of elastin by pentosidine is associated with the calcification of aortic media in patients with end-stage renal disease. **Nephrol Dial Transplant.** 18:1601-1609, 2003.

SARIG, S.; WEISS, T.A.; KATZ, I.; KAHANA, F.; AZOURY, R.; OKON, E.; KRUTH, H.S. Detection of cholesterol associated with calcium mineral using confocal fluorescence microscopy. **Lab Invest.** 71:782-787, 1994.

SCHNACKENBERG, C.G.; WELCH, W.J.; WILCOX, C.S. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. **Hypertension.** 32:59-64, 1998.

SCHNACKENBERG, C.G.; WILCOX, C.S. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin f2-alpha. **Hypertension.** 33:424-428, 1999.

SELZER, A. Changing aspects of the natural history of valvular aortic stenosis. **N Engl J Med.** 317:91-98, 1987.

SEN, C.K.; PACKER, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. **FASEB J.** 10:709-720, 1996.

SHANAHAN, C.M.; CARY, N.R.B.; METCALFE, J.C.; WEISSBERG, P.L. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. **J Clin Invest.** 93:2393-2402, 1994.

SHAO, J.S.; CAI, J.; TOWLER, D.A. Molecular Mechanisms of vascular calcification. lessons learned from the aorta. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 26:1423-1430, 2006.

SHAVELLE, D.M.; TAKASU, J.; BUDOFF, M.J.; MAO, S.; ZHAO, X.Q.; O'BRIEN, K.D. HMG CoA reductase inhibitor (statin) and aortic valve calcium. **Lancet.** 359:1125-1126, 2002.

SHIOI, A.; NISHIZAWA, Y.; JONO, S.; KOYAMA, H.; HOSOI, M.; MORII, H. Beta-glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 15:2003-2009, 1995.

SHIOI, A.; MORI, K.; JONO, S.; WAKIKAWA, T.; HIURA, Y.; KOYAMA, H.; OKUNO, Y.; NISHIZAWA, Y.; MORII, H. Mechanism of atherosclerotic calcification. **Z Kardiol.** 89 Suppl 2:75-79, 2000.

SIMONET, W.S.; LACEY, D.L.; DUNSTAN, C.R.; KELLEY, M.; CHANG, M.S.; LUTHY, R.; NGUYEN, H.Q.; WOODEN, S.; BENNETT, L.; BOONE, T.; SHIMAMOTO, G.; DEROSE, M.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, A.; TAN, H.L.; TRAIL, G.; SULLIVAN, J.; DAVY, E.; BUCAY, N.; RENSHAW-GEGG, L.; HUGHES, T.M.; HILL, D.; PATTISON, W.; CAMPBELL, P.; SANDER, S.; VAN, G.; TARPLEY, J.; DERBY, P.; LEE, R.; BOYLE, W.J. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell.** 89:309-319, 1997.

SKIBSKA, B.; CIEJKA, E.; GORACA, A. Estimation of effect of lipoic acid in the lung homogenates in rats during lipopolisaccharide-induced oxidative stress. **Pol Merkuriusz Lek.** 20:651-654, 2006.

SOMJEN, D.; WEISMAN, Y.; KOHEN, F.; GAYER, B.; LIMOR, R.; SHARON, O.; JACCARD, N.; KNOLL, E.; STERN, N. 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds. **Circulation**. 111:1666-1671, 2005.

SORESCU, D.; SZÖCS, K.; GRIENDLING, K.K. NAD(P)H oxidase and their relevance to atherosclerosis. **Trends in Cardiovascular Medicine**. 11:124-131, 2001.

SPEER, M.Y.; MCKEE, M.D.; GULDBERG, R.E.; LIAW, L.; YANG, H.Y.; TUNG, E.; KARSENTY, G.; GIACHELLI, C.M. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. **J Exp Med**. 196:1047-1055, 2002.

SPEER, M.Y.; GIACHELLI, C.M. Regulation of cardiovascular calcification. **Cardiovascular Pathology**. 13:63-70, 2004.

SQUADRITO, G.L.; PRYOR, W.A. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. **Free Radical Biology and Medicine**. 25:392-403, 1998.

STEINBECK, M.J.; APPEL JR, W.H.; VERHOEVEN, A.J.; KARNOVSKY, M.J. NADPH-oxidase expression and in situ production of superoxide by osteoclasts actively resorbing bone. **J Cell Biol**. 126:765-772, 1994.

STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E.; KHOO, J.C.; WITZTUM, J.L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **N Engl J Med**. 320:915-924, 1989.

STEINBRECHER, U.P.; ZHANG, H.F.; LOUGHEED, M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**. 9:155-168, 1990

STEITZ, S.A.; SPEER, M.Y.; CURINGA, G.; YANG, H.Y.; HAYNES, P.; AEBERSOLD, R.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G.; GIACHELLI, C.M. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. **Circ Res.** 89:1147-1154, 2001.

STEITZ, S.A.; SPEER, M.Y.; MCKEE, M.D.; LIAW, L.; ALMEIDA, M.; YANG, H.; GIACHELLI, C.M. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. **Am J Pathol.** 161:2035-2046, 2002.

STEWART, B.F.; SISCOVICK, D.; LIND, B.K.; GARDIN, J.M.; GOTTDIENER, J.S.; SMITH, V.E.; KITZMAN, D.W.; OTTO, C.M. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. **J Am Coll Cardiol.** 29:630-634, 1997.

SUZUKI, Y.J.; FORMAN, H.J.; SEVANIAN, A. Oxidants as stimulators of signal transduction. **Free Radical Biology and Medicine.** 22:269-285, 1997.

SUZUKI, Y.J.; FORD, D.G. Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle. *Journal Molecular Cell Cardiology* 1999; 31:345-353.

SWEATT, A.; SANE, D.C.; HUTSON, S.M.; WALLIN, R. Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats. **J Thromb Haemost.** 1:178-185, 2003.

SZOC, K.; LASSEGUE, B.; SORESCU, D.; HILENSKI, L.L.; VALPPU, L.; COUSE, T.L.; WILCOX, J.N.; QUINN, M.T.; LAMBETH, J.D.; GRIENDLING, K.K. Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 22:21-27, 2002.

TINTUT, Y.; PATEL, J.; PARHAMI, F.; DEMER, L.L. Tumor necrosis factor- α promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. **Circulation.** 102:2636-2642, 2000.

TINTUT, Y.; ALFONSO, Z.; SAINI, T.; RADCLIFF, K.; WATSON, K.; BOSTROM, K.; DEMER, L.L. Multilineage potential of cells from the artery wall. **Circulation**. 108:2505-2510, 2003.

TOLSTRUP, K.; ROLDAN, C.A.; QUALLS, C.R.; CRAWFORD, M.H. Aortic valve sclerosis, mitral annular calcium, and aortic root sclerosis as markers of atherosclerosis in men. **Am J Cardiol**. 89:1030-1034, 2002.

TRION, A.; LAARSE VAN DER, A. Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis. **Am Heart J**. 147:808-814, 2004.

USHIO-FUKAI, M.; ZFARI, M.A.; FUKUI, T.; ISHIZAKA, N.; GRIENDLING, K.K. P22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NAD(P)H oxidase system and regulates angiotensin II-hypertrophy in vascular smooth muscle cells. **The Journal of Biological Chemistry and Molecular Biology**. 271:23317-23321, 1996.

VAUGHAN, C.J.; GOTTO JR, A.M.; BASSON, C.T. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. **J Am Coll Cardiol**. 35:1-10, 2000.

VLIENGENTHART, R.; OUDKERK, M.; HOFMAN, A.; OEI, H.H.; VAN DIJCK, W.; VAN ROOIJ, F.J.; WITTEMAN, J.C. Coronary calcification improves cardiovascular risk prediction in the elderly. **Circulation**. 112:572-577, 2005.

WADA, T.; MCKEE, M.D.; STEITZ, S.; GIACHELLI, C.M. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. **Circ Res**. 84:166-178, 1999.

WADA, A.; YAMANAKA, O.; YAMAGAMI, S.; HAYASHI, Y.; NAKAYAMA, R.; KANO, T. Calcification in culprit lesions of coronary artery disease. **J Cardiol**. 35:27-32, 2000.

WALLIN, R.; CAIN, D.; HUTSON, S.M.; SANE, D.C.; LOESER, R. Modulation of the binding of matrix Gla protein (MGP) to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). **Thromb Haemost**. 84:1039-1044, 2000.

WALLIN, R.; WAJIH, N.; GREENWOOD, G.T.; SANE, D.C. Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. **Med Res Rev.** 21:274-301, 2001.

WATSON, K.E.; BOSTROM, K.; RAVINDRANATH, R.; LAM, T.; NORTON, B.; DEMER, L.L. TGF- β 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. **J Clin Invest.** 93:2106-2113, 1994.

WAYHS, R.; ZELINGER, A.; RAGGI, P. High coronary artery calcium scores pose an extremely elevated risk for hard events. **J Am Coll Cardiol.** 39:225-230, 2002.

WIERZBICKI, A.; SHETTY, C. Aortic stenosis: an atherosclerotic disease? **J Heart Valve Dis.** 8:416-423, 1999.

WIJSMAN, J.H.; JONKER, R.R.; KEIJZER, R.; VAN DE VELDE, C.J.; CORNELISSE, C.J.; VAN DIERENDONCK, J.H. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. **J Histochem Cytochem.** 41:7-12, 1993.

WILMSHURST, P.T.; STEVENSON, R.N.; GRIFFITHS, H.; LORD, J.R. A case-control investigation of the relation between hyperlipidaemia and calcific aortic valve stenosis. **Heart.** 78:475-479, 1997.

WILSON, P.W.; KAUPPILA, L.I.; O'DONNELL, C.J.; KIEL, D.P.; HANNAN, M.; POLAK, J.M.; CUPPLES, L.A. Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. **Circulation.** 103:1529-1534, 2001.

WITZTUM, J.L.; STEINBERG, D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. **J Clin Invest.** 88:1785-1792, 1991.

WOLISI, G.O.; MOE, S.M. The role of vitamin D in vascular calcification in chronic kidney disease. **Seminars in Dialysis.** 18:307-314, 2005.

XIE, Z.; SINGH, M.; SINGH, K. ERK1/2 and JNKs, but not p38 kinase, are involved in reactive oxygen species-mediated induction of osteopontin gene expression by angiotensin II and interleukin-1beta in adult rat cardiac fibroblasts. **J Cell Physiol.** 198:399-407, 2004.

YAMAGISHI, S.; FUJIMORI, H.; YONEKURA, H.; TANAKA, N.; YAMAMOTO, H. Advanced glycation endproducts accelerate calcification in microvascular pericytes. **Biochem Biophys Res Commun.** 258:353-357, 1999.

YAMANAKA, O.; SAWANO, M.; NAKAYAMA, R.; NEMOTO, M.; NAKAMURA, T.; FUJIWARA, Y.; SUZUKI, S.; HAYASHI, Y.; YAMAGAMI, S.; MINAMISAWA, K.; WADA A.; NYUI, N. Clinical significance of coronary calcification. **Circ J.** 66:473-478, 2002.

YANG, S.; RIES, W.L.; KEY JR, L.L. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in the formation of superoxide in osteoclasts. **Calcif. Tissue Int.** 63:346-350, 1998.

YANG, S.; MADYASTHA, P.; BINGEL, S.; RIES, W.; KEY, L. A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. **J Biol Chem.** 276:5452-5458, 2001.

ZEBBOUDJ, A.F.; IMURA, M.; BOSTROM, K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. **J Biol Chem.** 277:4388-4394, 2002.

ZEBBOUDJ, A.F.; SHIN, V.; BOSTROM, K. Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. **J Cell Biochem.** 90:756-765, 2003.

ZHAO, H.; KALIVENDI, S.; ZHANG, H.; JOSEPH, J.; NITHIPATIKOM, K.; VÁSQUEZ-VIVAR, J.; KALYANARAMAN, B. Superoxide reacts with Hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. **Free Radical Biology and Medicine.** 34:1359-1368, 2003.

ZHAO, X.Q.; YUAN, C.; HATSUKAMI, T.S.; FRECHETTE, E.H.; KANG, X.J.; MARAVILLA, K.R.; BROWN, B.G. Effects of prolonged intensive lipid-lowering therapy on the characteristics of carotid atherosclerotic plaques in vivo by MRI: a case-control study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 21:1623-1629, 2001.

ZHENG, H.; YU, X.; COLLIN-OSDOBY, P.; OSDOBY, P. RANKL stimulates inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production in developing osteoclasts. An autocrine negative feedback mechanism triggered by RANKL-induced interferon-beta via NF-kappaB that restrains osteoclastogenesis and bone resorption. **J Biol Chem.** 281:15809-15820, 2006.

APÊNDICE

Produção científica durante o doutoramento

Artigos completos publicados em periódicos

LIBERMAN, M.; LEITE, P.F.; LAURINDO, F.R.M.; BRITO, F.S. Redox Processes Underlying the Vascular Repair Reaction. **World Journal of Surgery**. 28:331-336, 2004.

TIRAPELLI, C. R.; De ANDRADE, C. R.; LIBERMAN, M.; LAURINDO, F.R.M.; De SOUZA, H.P.; De OLIVEIRA, A.M. Vitamin K1 (phylloquinone) induces vascular endothelial dysfunction: role of oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 213:10-17, 2006.

FERNANDES, D.C.; WOSNIAK JR, J.; PESCATORE, L.A.; BERTOLINE, M.A.; LIBERMAN, M.; LAURINDO, F.R.M. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, 292:C413-422, 2007.

Capítulos de livros publicados

LIBERMAN, M.; LAURINDO, F.R.M.; LEITE, P.F. Substâncias Vasodilatadoras Produzidas pelo Endotélio. In: DA LUZ, P.L., LAURINDO, F.R.M.; CHAGAS, A.C.P. **Endotélio e Doenças Cardiovasculares**. 1 ed. São Paulo: Atheneu. 1:33-42, 2003.

LIBERMAN, M.; LIBERMAN, A.; WAJNGARTEN, M.. Doença Coronária no Idoso: a Fisiopatologia é diferente?. In: CHAGAS, A.C.P. **Doença Coronária**. 1 ed. São Paulo: Atheneu. 1:121-138, 2005

LIBERMAN, M.; LIBERMAN, A.; SARAIVA, J.F.K. Envelhecimento do Sistema Cardiovascular: do Fisiológico ao Patológico. In: LIBERMAN, A.; FREITAS, E.V.; SAVIOLI NETO, F.; TADDEI, C.F.G. **Diagnóstico e Tratamento em Cardiologia Geriátrica**. 1 ed. Barueri- São Paulo: Manole., 1:5-12, 2005

Resumos publicados em anais de congressos

LAURINDO, F.R.M.; SANTOS, C.X.; KALANSKY, M.A.; LIBERMAN, M.; LOPES, L.R. Integration between endoplasmic reticulum stress and antioxidant stress in vascular cells: role of NAD(P)H oxidase association with protein disulfide isomerase . In: Meeting of Society of Free radical biology and medicine, 2004, Virgin Islands. **Free Radical Biology and Medicine**. 37:S67-S67, 2004.

LIBERMAN, M.; LARIO, F.C.; LAURINDO, F.R.M. Increased oxidative stress in a rabbit model of degenerative aortic valve stenosis. In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2004, Caxambu. **Programa da XXXIII Reunião Anual da Sociedade de Bioquímica e Biologia Molecular**. 1:82-82, 2004.

LIBERMAN, M.; LÁRIO, F.C.; LAURINDO, F.R.M.. Increased oxidative stress in a rabbit model of degenerative aortic valve stenosis. In: 59º Congresso da Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2004, Rio de Janeiro. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 83:supp. III- 08-08, 2004..

SANTOS, C.X.; KALANSKY, M.A.; LIBERMAN, M.; LAURINDO, F.R.M.; LOPES, L.R. Marked NAD(P)H oxidase activation by endoplasmic reticulum stressors: evidence for a novel integrative pathway involved in vascular injury repair. In: American Heart Scientific Sessions 2004, 2004, New Orleans. **Circulation**. 110:Supl.S- 158-158, 2004.

LIBERMAN, M.; BASSI, E; LARIO, F.C.; LAURINDO, F.R.M. . Oxidative stress prevents further calcification In a rabbit model of degenerative aortic valve stenosis. In: IV Meeting of the south american group of the society for free radical biology and medicine, 2005, Águas de Lindóia. **Program of the IV Meeting of the South American Group of the Society of Biochemistry and Molecular Biology**, 2005.

SANTOS, C.X.; LIBERMAN, M.; LAURINDO, F.R.M. Marked NAD(P)H oxidase activation by endoplasmic reticulum stressors: Evidence for a novel integrative pathway in vascular injury repair. In: IV Meeting of the south american group of the society for free radical biology and medicine, 2005, Águas de Lindóia. **Program of the IV Meeting of the south american group of the society for free radical biology and medicine**, 2005.

FERNANDES, D.C.; WOSNIAK JR, J.; LIBERMAN, M.; SANTOS, C.X.; BERTOLINI, M.A.; LAURINDO, F.R.M. Dihydroethidium oxidation by vascular NAD(P)H oxidase: Implications for assessment of ROS production in vascular system. In: IV Meeting of the south american group of the society for free radical biology and medicine, 2005, Águas de Lindóia. **Program of the IV Meeting of the south american group of the society for free radical biology and medicine**, 2005.

LIBERMAN, M.; BASSI, E.; LAURINDO, F.R.M. Increased vascular calcification and vessel stiffness by tempol administration in hypercholesterolemic rabbits. In: IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, 2005, Águas de Lindóia. **Program of the IV Meeting of the south american group of the society for free radical biology and medicine**, 2005.

SANTOS, C.X.; FERNANDES, D.C.; LIBERMAN, M.; KALANSKY, M.A.; LOPES, L.R.; LAURINDO, F.R.M. Ativação da NAD(P)H oxidase vascular pelo estresse do retículo endoplasmático: nova via integrativa envolvida no remodelamento vascular. In: XXVI Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2005. **Revista da SOCESP**, 2005.

LIBERMAN, M.; BASSI, E.; MARTINATTI, M. K. ; LÁRIO, F.C.; BORTOLOTTTO, L. A.; GARIPPO, A.L. ; LAURINDO, F.R.M. Increased NAD(P)H Oxidase expression and oxidative stress in calcifying vascular cells do not enhance progression of aortic valve and vascular calcification. In: American Heart Scientific Sessions 2006. **Circulation**. 114:Suppl. II- 119-119, 2006.

LIBERMAN, M.; BASSI, E.; MARTINATTI, M.K.; BORTOLOTTTO, L.A.; LAURINDO, F.R.M. Oxidative stress mediates expansive vascular remodeling in a rabbit model of atherosclerosis and vascular calcification. In: 13th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, 2006, Denver. **Program of 13th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine**. 41:Suppl.1- S39-S39, 2006.

LIBERMAN, M.; BASSI, E.; MARTINATTI, M.K.; LARIO, F.C.; LAURINDO, F.R.M. Estresse oxidativo induzido por células vasculares calcificadoras na estenose valvar aórtica degenerativa em pacientes e em um modelo experimental. In: XXVII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2006, Campos do Jordão. **Revista da SOCESP**. 16:31-31, 2006.

BASSI, E.; LIBERMAN, M.; MARTINATTI, M.K.; BORTOLOTTTO, L.A.; LAURINDO, F.R.M. Estresse oxidativo contribui para o remodelamento expansivo em modelo de aterosclerose e calcificação vascular. In: XXVII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2006, Campos do Jordão. **Revista da Socesp**. 16:57-57, 2006.

Apresentação Oral de Trabalho em Congresso

LIBERMAN, M.; LÁRIO, F.C.; LAURINDO, F.R.M.. Increased oxidative stress in a rabbit model of degenerative aortic valve stenosis. In: **59º Congresso da Sociedade Brasileira de Cardiologia**. Rio de Janeiro, 2004.

LIBERMAN, M.; BASSI, E.; LARIO, F.C.; LAURINDO, F.R.M. Oxidative stress prevents further calcification in a rabbit model of degenerative aortic valve stenosis. In: **IV Meeting of the south american group of the society for free radical biology and medicine**. Águas de Lindóia, 2005.

LIBERMAN, M.; BASSI, E.; MARTINATTI, M.K.; LARIO, F.C.; LAURINDO, F.R.M. Estresse oxidativo induzido por células vasculares calcificadoras na estenose valvar aórtica degenerativa em pacientes e em um modelo experimental. In: **XXVII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**. Campos do Jordão, 2006.

LIBERMAN, M.; BASSI, E.; MARTINATTI, M.K.; LÁRIO, F.C.; BORTOLOTTI, L.A.; GARIPPO, A.L.; LAURINDO, F.R.M. Increased NADP(H) Oxidase Expression and Oxidative Stress in Calcifying Vascular Cells Do Not Enhance Progression of Aortic Valve and Vascular Calcification. In: **American Heart Association Scientific Sessions 2006**. Chicago, 2006.

LIBERMAN, M.; BASSI, E.; MARTINATTI, M.K.; BORTOLOTTI, L.A.; LAURINDO, F.R.M. Oxidative Stress Mediates Expansive Vascular Remodeling in a Rabbit Model of Atherosclerosis and Vascular Calcification. In: **13th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine**. Denver, 2006.

Prêmio SOCESP jovem pesquisador Josef Feher 2006

BASSI, E.; LIBERMAN, M.; MARTINATTI, M.K.; BORTOLOTTI, L.A.; LAURINDO, F.R.M. Estresse oxidativo contribui para o remodelamento expansivo em modelo de aterosclerose e calcificação vascular. In: XXVII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2006, Campos do Jordão. **Revista da Socesp**. 16:57-57, 2006.