

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Contribuição do complexo NAD(P)H oxidase na disfunção de aorta torácica de camundongos jovens tratados com colesterol

Rafael Pires Moreira

Ribeirão Preto – SP  
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Contribuição do complexo NAD(P)H oxidase na disfunção de aorta torácica de camundongos jovens tratados com colesterol

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

**Orientado:** Rafael Pires Moreira

**Orientadora:** Profa Dra. Ana Maria de Oliveira

\*Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 04/04/2014. A versão original encontra-se disponível na faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP\*.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Moreira, Rafael Pires

Contribuição do complexo NAD(P)H oxidase na disfunção de aorta torácica de camundongos jovens tratados com colesterol. Ribeirão Preto, 2014. 69p; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Oliveira, Ana Maria

1. NAD(P)H oxidase. 2. Angiotensina II. 3. Colesterol  
4. Camundongos jovens

Rafael Pires Moreira

Contribuição do complexo NAD(P)H oxidase na disfunção de aorta torácica de camundongos jovens tratados com colesterol

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Ciências Farmacêutica para obtenção do Título de Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Oliveira

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## RESUMO

MOREIRA, R. P. **Contribuição do complexo NAD(P)H oxidase na disfunção de aorta torácica de camundongos jovens tratados com colesterol.** 2014. 69f Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Vários fatores são responsáveis pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares, dentre eles o alto consumo de colesterol. Segundo a AHA, o consumo recomendado de colesterol é de 300mg/dia. No entanto esses valores nem sempre são respeitados. Na maioria das vezes a consequência do alto consumo de colesterol é o desenvolvimento da dislipidemia, a qual favorece o desenvolvimento da disfunção endotelial. É descrito que o alto consumo de colesterol pode levar ao risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares antes mesmo do desenvolvimento da dislipidemia, uma vez que, em alguns casos o consumo recomendado de colesterol na dieta diária é ultrapassado, e mesmo em estágios crônicos desse consumo não se observa o seu desenvolvimento. Dessa forma o consumo crônico de altas concentrações de colesterol poderia favorecer alterações no sistema vascular, antes mesmo da instalação do processo dislipidêmico. O objetivo desse trabalho foi estudar os efeitos da ingestão de altas concentrações de colesterol por camundongos sobre as repostas de angiotensina II (Ang II) em aorta torácica, bem como avaliar a participação da NAD(P)H oxidase nesse processo. Os animais foram divididos em grupo tratados com ração colesterol 1% (RC) ou ração colesterol padrão (RP), durante 1 mês ou 3 meses. O tratamento com RC não alterou o peso dos animais nem foram observadas alterações morfológicas em aorta torácica, sugerindo que a alteração na funcionalidade deste tecido não foi decorrente de modificações estruturais. O tratamento com RC acarretou no aumento dos níveis basais de  $O_2^-$  produzido em parte pela NOX-1 e NOX-4, além do aumento da expressão proteica de NOX-1 em aorta torácica de animais tratados 3 meses. No estudo funcional foi observado um aumento do *E<sub>max</sub>* da Ang II em animais tratados durante 1 mês e 3 meses, uma resposta independente de endotélio. Esse aumento foi restaurado na presença de Tiron, mostrando a contribuição de  $O_2^-$  no aumento do *E<sub>max</sub>* de Ang II em aorta torácica. Na presença de inibidores de NOX-1 e NOX-4 também foi observada a restauração do *E<sub>max</sub>* observada na ausência dos mesmos, mostrando a participação das subunidades na produção de  $O_2^-$ . Os animais tratados com RC não apresentaram alterações no perfil lipídico, esse fato deve-se principalmente pela falta do ácido cólico na dieta. O *E<sub>max</sub>* da Ang II foi aumentado em aorta torácica de camundongos tratados com RC em decorrência de aumento nos níveis basais de  $O_2^-$  produzido pela NOX-1 e NOX-4. Os níveis basais de  $O_2^-$  aumentados possivelmente devem estar reagindo com o NO diminuindo sua disponibilidade, aumentando assim os efeitos contrateis da Ang II em aorta torácica. Algumas hipóteses são levantadas para explicar o aumento basal de  $O_2^-$  em aorta torácica. 1º Aumento na concentração de colesterol nos bolsões lipídicos presente nas caveolas. 2º Formação de oxisterois, 3º formação de micropartículas. Os resultados obtidos e as hipóteses levantadas nesse trabalho, como, aumento na produção de oxisterois e micropartículas podem servir como possíveis alvos de estudos para o desenvolvimento de novos marcadores, e no diagnóstico precoce de alterações vasculares decorrentes do consumo excessivo de colesterol iniciada em indivíduos jovens.

Palavras Chave: NAD(P)H oxidase; Angiotensina II; Colesterol; Camundongos jovens.

## ABSTRACT

MOREIRA, R. P. **Contribution of NAD(P)H oxidase complex in dysfunction of the thoracic aorta of young mice treated with cholesterol.** 2014.69f. Dissertation. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Several factors are responsible for the development of cardiovascular disease, including high cholesterol intake. According to AMH, the recommended intake of cholesterol is 300 mg/daily, however these values are not always respected. Most often the consequence of high cholesterol consumption is the development of dyslipidemia, which favors the development of endothelial dysfunction. It is described that a high intake of cholesterol can lead to the risk of developing cardiovascular disease even before the development of dyslipidemia, since in some cases the recommended daily intake of cholesterol in the diet is exceeded, and even chronic stages of consumption not observing the development. Thus, chronic exposure to high concentrations of cholesterol could promote changes in the vascular system, even before the installation process dyslipidemic. The aim of this work was to study the effects of ingestion of high concentrations of cholesterol in mice on the responses to angiotensin II (Ang II) in the thoracic aorta, as well as evaluate the involvement of NAD(P)H oxidase in this process. The animals were divided into groups treated with 1% cholesterol diet (CD) or standard chow (SC) for 1 month or 3 months. Treatment with SC did not change the weight of the animals was not observed morphological changes in the thoracic aorta, suggesting that the change in the functionality of this tissue was not due to structural changes. Treatment with SC resulted in increased basal levels of  $O_2^-$ , produced in part by NOX- 1 and NOX- 4, in addition to increased protein expression of NOX- 1 in the thoracic aorta of animals treated three months . In the functional study, we observed an increase in the *E<sub>max</sub>* of Ang II in animals treated for 1 month and 3 months, an independent response of endothelium. This increase was restored in the presence of Tiron, showing the contribution of  $O_2^-$  in increasing the *E<sub>max</sub>* of Ang II in the thoracic aorta. In the presence of inhibitors of NOX-1 and NOX-4 was also observed *E<sub>max</sub>* restoration observed in the absence thereof, showing the involvement of subunits for the production of  $O_2^-$ . The animals treated with CD showed no changes in lipid profile, this is due largely to the lack of cholic acid in the diet. The *E<sub>max</sub>* of Ang II was increased in the thoracic aorta of mice treated with CD as a result of an increase in basal levels of  $O_2^-$ , produced by NOX- 1 and NOX- 4. The basal levels of  $O_2^-$  increased this should possibly reacting with NO decreasing its availability, thereby increasing the contractile effects of Ang II in thoracic aorta. Some hypotheses were proposed to explain the increased basal  $O_2^-$  in the thoracic aorta. 1° Increase in the concentration of cholesterol in lipid pockets present in caveolae. 2° Formation of oxysterols; 3° microparticle formation . The results obtained and the hypotheses in this work, as an increase in the production of oxysterols and microparticles can serve as potential targets for the development of studies of new markers, and early diagnosis of vascular alterations caused by excessive consumption of cholesterol began in young individuals.

Key words: NAD(P)H oxidase , angiotensin II , Cholesterol , young mice.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação adaptada das subunidades de NOX-1 e NOX-4 (SCHRODER, 2010) ..... 5
- Figura 2** - Efeito do tratamento com ração colesterol (1%) durante 1 mês ou 3 meses no peso corporal dos camundongos. Os dados representam a média  $\pm$  E. P. M. (n = 10). p (>0.05) ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni. .... 17
- Figura 3** - Peso seco de aorta torácica. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M (n = 10) da massa seca de anéis (4 mm) de aorta torácica de animais tratados com ração padrão ou ração colesterol (1%) durante 1 mês ou 3 meses. p (>0.05) ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni..... 18
- Figura 4** - Análise morfológica e morfométrica de anéis de aorta torácica de camundongos C57BL/6, alimentados com dieta padrão (RP) ou rica em colesterol (1%) (RC), por 1 ou 3 meses. Cortes representativos corados com HE de camundongos alimentados com dieta padrão por 1 mês (**A**), com dieta rica em colesterol por 1 mês (**B**), com dieta padrão por 3 meses (**C**) ou com dieta rica em colesterol por 3 meses (**D**). Coloração: HE. Amplificação: 100X. **E** = endotélio; **M** = média; **Adv** = adventícia. One-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni (n=5). .... 19
- Figura 5** - Análise morfométrica de aorta torácica de ratos tratados com ração Padrão ou Ração colesterol (1%) durante 1 ou 3. Os dados representam a média  $\pm$  E. P. M. (n = 5) da espessura das do endotélio das camadas média e adventícia. One-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni (n=5). p (> 0.05). .... 20
- Figura 6** - Curva concentração efeito para Ang II em aorta torácica. Os dados representam a média  $\pm$  E. P. M (n = 9) da contração induzida por Ang II em aorta torácica de animais tratados com RP e RC durante 1 mês e 3 meses em presença (E<sup>+</sup>) ou ausência de endotélio (E<sup>-</sup>). .... 23
- Figura 7** - Contração máxima induzida por Ang II em aorta torácica. Os dados apresentam a média  $\pm$  E. P. M (n=9) do efeito da contração máxima (E<sub>max</sub>) induzida por Ang II em aorta torácica com endotélio (E<sup>+</sup>) ou na sua ausência (E<sup>-</sup>) de animais tratados com RP ou RC durante 1 mês e 3 meses. Significativamente diferente (p < 0,05) em relação à aorta torácica (E<sup>+</sup>) de animais tratados com RP 1 Mês (\*) e 3 Meses (\*\*). e (E<sup>-</sup>) 1 Mês (#) e 3 Meses (##). Teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni. .... 24
- Figura 8** - Curva concentração efeito para Ang II em aorta torácica na presença ou ausência do inibidor de NOX - 1 (ML171). Os dados representam a média  $\pm$  E. P. M (n = 9) da contração induzida por Ang II em aorta torácica de animais tratados com RP e RC durante 1 mês em presença (E<sup>+</sup>) ou ausência de endotélio (E<sup>-</sup>). .... 26
- Figura 9** - Contração máxima induzida por Ang II em aorta torácica em ausência ou presença de ML171. Os dados apresentam a média  $\pm$  E. P. M (n=9) do efeito da contração máxima (E<sub>max</sub>) induzida por Ang II em aorta torácica com endotélio (E<sup>+</sup>) ou na sua ausência (E<sup>-</sup>) de animais tratados com RP ou RC durante 1 mês (A) e 3 meses (B). Significativamente diferente (p < 0,05) em relação à aorta torácica (E<sup>+</sup>) de animais tratados com RC 1 mês (\*) e 3 meses (\*\*). e (E<sup>-</sup>) 1 mês (#) e 3 meses (##). Teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni. .... 27
- Figura 10** - Curva concentração efeito para Ang II em aorta torácica na presença ou ausência do inibidor de NOX - 4 (VAS2870). Os dados representam a média  $\pm$  E. P. M (n = 10) da contração induzida por Ang II em aorta torácica de animais tratados com RP e RC durante 1 mês em presença (E<sup>+</sup>) ou ausência de endotélio (E<sup>-</sup>). .... 30
- Figura 11** - Contração máxima induzida por Ang II em aorta torácica em ausência ou presença de VAS2870. Os dados apresentam a média  $\pm$  E. P. M (n=9) do efeito da contração máxima (E<sub>max</sub>) induzida por Ang II em aorta torácica com endotélio (E<sup>+</sup>) ou na sua ausência (E<sup>-</sup>) de animais tratados com RP ou RC durante 1 mês e 3 meses. Significativamente diferente (p < 0,05) em relação à aorta torácica (E<sup>+</sup>) de animais tratados com RC 1 Mês (\*) e 3 Meses (\*\*). e (E<sup>-</sup>) 1 Mês (#) e 3 Meses (##) em ausência de VAS2870. Teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni. .... 31
- Figura 12** - Curva concentração efeito para Ang II em aorta torácica na presença ou ausência do sequestrador de ânion superóxido (Tiron). Os dados representam a média  $\pm$  E. P. M (n = 9) da

contração induzida por Ang II em aorta torácica de animais tratados com RP e RC durante 1 mês e 3 meses em presença ( $E^+$ ) ou ausência de endotélio ( $E^-$ ). ..... 34

**Figura 13** - Contração máxima induzida por Ang II em aorta torácica em ausência ou presença de Tiron. Os dados apresentam a média  $\pm$  E. P. M (n=9) do efeito da contração máxima ( $E_{max}$ ) induzida por Ang II em aorta torácica com endotélio ( $E^+$ ) ou na sua ausência ( $E^-$ ) de animais tratados com RP ou RC durante 1 mês (A) e 3 meses (B). Significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) em relação à aorta torácica ( $E^+$ ) de animais tratados com RC 1 mês (\*) e 3 meses (\*\*) e ( $E^-$ ) 1 mês (#) e 3 meses (##) na ausência de Tiron. Teste de ANOVA com pós-teste de Boferroni ..... 35

**Figura 14** - Imagens representativas de anéis de aorta torácica marcada com DHE antes ( $t = 0s$ ) e após ( $t = 60s$ ) a adição de Ang II ( $n = 6$ ). A. Anéis de aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão 1 mês, B. Anéis de aorta torácica de camundongos tratados com ração colesterol (1%) 1 mês C. Anéis de aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão 3 meses D. Anéis de aorta torácica de camundongos tratados com ração colesterol (1%) 3 meses..... 38

**Figura 15** - Intensidade de fluorescência emitida pelo músculo liso vascular dos anéis de aorta torácica carregados com DHE. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M (  $n = 6$  ) da intensidade de fluorescência basal e final ( após estímulo com Ang II) do músculo liso vascular de aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão ou com ração colesterol (1%) durante 1 mês ou 3 meses. Significativamente diferente  $p (< 0,05)$  em relação em relação à fluorescência basal de aortas torácicas de camundongos alimentados com ração padrão 1 Mês (\*) e 3 meses (\*\*). ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni. .... 39

**Figura 16** - Intensidade de fluorescência emitida pelo músculo liso vascular dos anéis de aorta torácica carregados com DHE antes e após tratamento com ML171. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M (  $n = 6$  ) da intensidade de fluorescência basal e final ( após estímulo com Ang II) do músculo liso vascular de aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão ou com ração colesterol (1%) durante 1 mês ou 3 meses. Significativamente diferente  $p (< 0,05)$  em relação em relação à fluorescência basal de aortas torácicas de camundongos alimentados com ração colesterol (1%) 1 Mês (\*) e 3 meses (\*\*), na ausência de ML171. ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni. .... 41

**Figura 17** - Intensidade de fluorescência emitida pelo músculo liso vascular dos anéis de aorta torácica carregados com DHE antes e após tratamento com VAS2870. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M (  $n = 6$  ) da intensidade de fluorescência basal e final ( após estímulo com Ang II) do músculo liso vascular de aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão ou com ração colesterol (1%) durante 1 mês ou 3 meses. Significativamente diferente  $p (< 0,05)$  em relação em relação à fluorescência basal de aortas torácicas de camundongos alimentados com ração padrão 1 Mês (\*) e 3 meses (\*\*) na ausência de VAS2870. ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni..... 42

**Figura 18** - Intensidade de fluorescência emitida pelo músculo liso vascular dos anéis de aorta torácica carregados com DHE antes e após tratamento com Tiron. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M (  $n = 6$  ) da intensidade de fluorescência basal e final ( após estímulo com Ang II) do músculo liso vascular de aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão ou com ração colesterol (1%) durante 1 mês ou 3 meses. Significativamente diferente  $p (< 0,05)$  em relação em relação à fluorescência basal de aortas torácicas de camundongos alimentados com ração padrão 1 Mês (\*) e 3 meses (#), a fluorescência basal de aorta torácica de animais tratados com ração colesterol (1%) 1 Mês (\*\*) e 3 meses (##). ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni..... 43

**Figura 19** - Expressão protéica (Western Blot) da subunidade NOX-1 (67 kDa) da enzima NAD(P)H oxidase em anéis de aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão (RP) ou ração colesterol 1 (%) durante 1 mês ou 3 meses ( $n = 4$ ). Significativamente diferente  $p (< 0,05)$  em relação à expressão protéica de NOX-1 em aortas torácicas de camundongos alimentados com ração padrão 3 meses (\*). ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni. .... 44

**Figura 20** - Expressão protéica (Western Blot) da subunidade NOX-4 (67 kDa) da enzima NAD(P)H oxidase em anéis de aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão (RP) ou ração colesterol 1 (%) durante 1 mês ou 3 meses ( $n = 4$ ). Significativamente diferente ( $p > 0,05$ ), ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni. .... 45



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Valores séricos do lipidograma do soro de camundongos C57BL/6 alimentados com RP ou RC, durante 1 ou 3 meses. Os dados apresentam média $\pm$ E.P.M. (n=15). Teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni. ( $p > 0.05$ ).....	22
<b>Tabela 2</b> - Valores pD2 e Emax de Ang II em aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão ou ração colesterol (1%) durante 1 mês e 3 meses .....	25
<b>Tabela 3</b> - Emax de Ang II em aorta torácica em ausência ou na presença de ML171	28
<b>Tabela 4</b> - Potência de Ang II em aorta torácica em ausência ou presença de ML171	29
<b>Tabela 5</b> - Emax de Ang II em aorta torácica em ausência ou na presença de VAS2870.....	32
<b>Tabela 6</b> - Potência de Ang II em aorta torácica em ausência ou presença de VAS2870.....	33
<b>Tabela 7</b> - Emax de Ang II em aorta torácica em ausência ou na presença de Tiron.	36
<b>Tabela 8</b> - Potência de Ang II em aorta torácica em ausência ou presença de Tiron.	37
<b>Tabela 9</b> - Fluorescência emitida pelo músculo liso vascular de aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão (RP) ou ração colesterol (1%) (RC) durante 1 mês ou 3 meses, marcadas com DHE.....	40

**LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS**

**Ach** acetilcolina

**AHA** American Heart Association

**Ang II** angiotensina II

**AT<sub>1</sub>** receptores para angiotensina do tipo 1

**CMLV** Células do musculo liso vascular

**CO<sub>2</sub>** monóxido de Carbono

**C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>** glicose

**CaCl<sub>2</sub>** cloreto de cálcio

**DHE** Dihidroetidina

**EC<sub>50</sub>** concentração efetiva de um agonista que produz 50% do efeito máximo

**E<sub>max</sub>** Efeito máximo

**F<sub>0</sub>** fluorescência basal

**HE** hematoxilina/eosina

**ERO** Espécies reativas de oxigênio

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Peróxido de Hidrogênio

**IF** intensidade de fluorescência

**KCl** Cloreto de Potássio

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** hipofosfito de potássio

**MgSO<sub>4</sub>** Sulfato de Magnésio

**ML171** inibidor específico de NOX-1

**NaCl** Cloreto de Sódio

**NAD(P)H** nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

**NaHCO<sub>3</sub>** bicarbonato de sódio

**pD<sub>2</sub>** antilogaritmo da concentração de uma droga que induz metade do efeito máximo

**NO** oxido nítrico

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** ânion superóxido

**OMS** Organização Mundial da Saúde

**PE** Fenilefrina

**pH** potencial hidrogeniônico

**VAS2870** inibidor específico de NOX-4

**U** unidades

**RC** Ração Colesterol (1%)

**RP** Ração Padrão

## SUMÁRIO

Resumo.....	I
Abstract.....	II
Lista de figuras.....	III
Lista de tabelas.....	V
Lista de abreviaturas e siglas.....	VII
<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2- OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
2.1 - Objetivo geral.....	8
2.2 - Objetivos específicos.....	8
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>9</b>
3.1 – Animais.....	10
3.2 - Divisão dos grupos experimentais.....	10
3.3 - Composição da ração.....	11
3.4- Análises bioquímicas do soro (lipidograma e enzimas ALT e AST).....	11
3.5 - Estudos funcionais de reatividade arterial <i>in vitro</i> .....	11
3.5.1 – Preparo dos anéis arteriais.....	11
3.5.2 – Protocolos experimentais.....	12
3.5.2.1 – Efeitos da ingestão da ração de colesterol sobre a contração induzida por Ang II.....	12
3.5.2.2 - Participação dos metabólitos da NAD(P)H oxidase sobre a contração induzida pela Ang II.....	12
3.5.2.3 Participação O <sub>2</sub> <sup>-</sup> na contração desencadeada pela Ang II.....	13
3.6 - Quantificação dos níveis basais e induzidos por Ang II de EROs em anéis de aortas torácicas por microscopia confocal.....	13
3.6.1 - Preparação dos anéis de aorta torácica .....	13
3.6.2 - Microscopia Confocal.....	13
3.6.3 - Protocolos Experimentais.....	14
3.6.3.1 – Participação da NOX-1 e NOX-4 na produção basal e induzida por Ang II de ERO em aorta torácica.....	14
3.7 – Análises histológicas da aorta torácica.....	14
3.8 - Quantificação protéica de NOX-1 e NOX-4 pela técnica de Western Blot.....	14
3.9 - Análises estatísticas.....	15
<b>4-RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>
4.1 – Efeitos da ingestão da ração com colesterol sobre o peso dos animais e peso seco da aorta torácica.....	17
4.2 – Caracterização dos efeitos da ingestão de colesterol 1% sobre os aspectos morfofuncionais de aorta torácica de camundongos.....	18
4.2.1 – Análises histológicas de aorta torácica.....	18
4.2.1.1 – Morfologia.....	18
4.2.1.2 – Morfometria.....	20
4.3 – Efeitos da ingestão da ração com colesterol sobre os níveis séricos do lipidograma e das enzimas AST e ALT.....	21
4.4 - Estudos funcionais de reatividade arterial <i>in vitro</i> .....	23
4.4.1 – Efeitos da ingestão de colesterol sobre a contração induzida por Ang II em aorta torácica de camundongo.....	23
4.4.2 - Participação de metabólitos derivados de NOX-1 na modulação da contração induzida por Ang II em aorta torácica.....	26

4.4.3 - Participação de metabólitos derivados de NOX-4 na modulação da contração induzida por Ang II em aorta torácica.....	29
4.4.4 – Participação de $O_2^-$ na modulação da contração induzida por Ang II em aorta torácica de camundongos.....	33
4.4.5 - Quantificação dos níveis basais e induzidos por Ang II de EROS em anéis de aorta torácica por microscopia confocal.....	37
4.4.5.1 - Efeitos da ingestão de colesterol sobre os níveis basais e induzidos por Ang II de EROS em aorta torácica de animais tratados com RP ou RC durante 1 mês ou 3 meses.....	37
4.4.5.2 – Efeitos da ingestão de colesterol sobre os níveis basais e induzidos por Ang II de ROS derivados de NOX-1 em aorta torácica de camundongos.....	40
4.4.5.3 – Efeitos da ingestão de colesterol sobre os níveis basais e induzidos por Ang II de ROS derivados de NOX-4 em aorta torácica de camundongos.....	41
4.4.5.4 – Efeitos da ingestão de colesterol (1%) sobre os níveis basais e induzidos por Ang II de $O_2^-$ em aorta torácica de camundongos tratados com RP ou RC durante 1 mês ou 3 meses.....	43
4.4.5.5 – Expressão protéica da enzima NAD(P)H oxidase (NOX-1 e NOX-4) em aorta torácica de camundongos.....	44
<b>5 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>6 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>58</b>
<b>7-REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

## ***1-Introdução***

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares, segundo a organização mundial de Saúde (OMS), são as principais causas de mortes no mundo. No ano de 2008 cerca de 17,3 milhões de pessoas morreram em decorrência de doenças cardiovasculares, o que representa 31% de todas as mortes globais (MENDIS et al., 2011).

No Brasil aproximadamente 27% dos óbitos são decorrentes de doenças cardiovasculares, perfazendo um coeficiente de mortalidade seis a sete vezes superior ao observado para doenças infecciosas e parasitárias. (DATASUS, 2012).

Em 2010 foram registrados aproximadamente 326 mil mortes consequentes de doenças do aparelho circulatório, dentre elas doença isquêmica do coração e doenças cerebrovasculares (DATASUS, 2012). Estima-se que no ano de 2030, 23,6 milhões de pessoas morrerão por conta do desenvolvimento de doenças cardiovasculares no mundo (MENDIS et al., 2011).

Dentre as doenças cardiovasculares, a aterosclerose, é considerada como uma das mais importantes nos países ocidentais (SMITH et al., 2004). Essa doença advém de condições multifatoriais, tendo como principais fatores de risco para o seu desenvolvimento o tabagismo, o sedentarismo, o alcoolismo, a alimentação inadequada, fatores que podem levar ao desenvolvimento de obesidade, o diabetes e a dislipidemia (MENDIS et al., 2011). Todos esses fatores associados ou não, podem favorecer o desenvolvimento do processo aterosclerótico.

A dislipidemia vem sendo apontada como um dos fatores de risco mais importante para o desenvolvimento da aterosclerose, em vários estudos epidemiológicos e clínicos (MANDUTEANU e SIMIONESCU, 2012).

Em adultos já é bem estabelecida a associação entre a dislipidemia e a aterosclerose. Entretanto, nas últimas décadas, a dislipidemia tem acometido com maior frequência em indivíduos na fase da infância e adolescência (GIULIANO E CARAMELLI, 2008; FERNANDEZ et al., 2011).

O desenvolvimento da dislipidemia em idade precoce, muitas vezes se deve ao estilo de alimentação que vem sendo adotado nas últimas décadas. O aumento da ingestão de gordura e colesterol na dieta é um fator determinante para o desenvolvimento prematuro de doenças crônicas como a aterosclerose (MINIHANE & HARLAND, 2007).

Padrões dietéticos que promovem o aumento dos níveis lipídicos modulam de diferentes maneiras o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, reforçando o conceito de que a dieta aumentaria a chance do desenvolvimento da aterosclerose (SANTOS, et al., 2013).

Estudos de meta-análise de trabalhos epidemiológicos sugerem que populações que consomem dieta rica em colesterol podem desenvolver a aterosclerose (CONNOR, et al., 1986; SANTOS, et al., 2013). Visando prevenir o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, a Sociedade Brasileira de Cardiologia, e American Heart Association (AHA) recomendam uma ingestão não superior que 300mg/dia de colesterol (LICHENSTEIN, et al., 2011; SANTOS, et al., 2013).

Entretanto existem várias controvérsias quanto ao consumo de colesterol e o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Estudos envolvendo a ingestão de colesterol em crianças e adultos jovens durante 4 semanas mostraram uma variação na absorção do colesterol, indicando a existência de variação genética quanto a absorção desse composto. Indivíduos que hiper – absorvem o colesterol constituem apenas 25% da população (BARONA & FERNANDEZ, 2012).

Fernandez, (2010) indica que não há nenhuma associação da quantidade de colesterol da dieta, com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Além disso, não foi observada nenhuma relação entre a alta ingestão de colesterol com alterações nos níveis de colesterol plasmático ou suas frações.

Por outro lado, alguns trabalhos epidemiológicos mostram que o colesterol da dieta pode estar associado com o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, havendo ou não alteração nos níveis de colesterol plasmático (MC GEE et al., 1984; SHEKELLE et al., 1981; STAMLER & SHEKELLER, 1988). Essas observações condizem com RIDKER et al., (2008), que demonstram que indivíduos com concentrações sorológicas consideradas normais ( CT <200mg.dL<sup>-1</sup>, LDL <130 mg. dL<sup>-1</sup>, HDL >40mg.dL<sup>-1</sup> e triglicérides <150 mg.dL<sup>-1</sup>) possuem o risco do desenvolvimento de doenças vasculares.

BUSCEMI et al., (2008) avaliaram a ingestão de dieta rica em gordura e colesterol, e pobre em compostos antioxidantes durante um mês. Os indivíduos que faziam o consumo desse tipo de alimentação não apresentaram um quadro de dislipidemia embora, apresentassem alteração do fluxo da artéria basilar caracterizado por um processo inicial de disfunção endotelial.

A disfunção endotelial pode influenciar a ação de diferentes fatores vasculares, tais como a Angiotensina II (Ang II) (DAUGHERTY et al., 2004). Ang II desempenha um papel



central na homeostase vascular (TAUBMAN, 2003), exercendo suas ações biológicas por ativação de receptores AT<sub>1</sub> e/ou AT<sub>2</sub> (SAVOIA e VOLPE, 2011).

Os receptores AT<sub>1</sub> medeiam a maioria dos efeitos fisiológicos e patológicos atribuídos à Ang II, como vasoconstrição (STENMAN & EDVINSSON, 2004), produção de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ou peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por ativação de NAD(P)H oxidase, expressão de moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1) (NICKENIG, 2002) e transcrição de fatores de crescimento responsáveis pela proliferação celular (NICKENIG et al., 1997).

As espécies reativas de oxigênio contribuem para vários aspectos em doenças vasculares incluindo, lesões por isquemia-reperfusão, diminuição da produção de NO e estímulo de processos inflamatórios e hipertrofia (GRANGER & KVIETYS, 2012).

Vários sistemas enzimáticos oxidantes podem produzir O<sub>2</sub><sup>-</sup>, como xantinas oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, citocromo P - 450 e a NOS (GRIENGLING et al., 1994). No entanto, o complexo NAD(P)H oxidase constituem a única fonte enzimática especificamente dedicada à geração de ERO (Espécies Reativas de Oxigênio). O complexo NAD(P)H oxidase pela transferência de elétrons reduz oxigênio a superóxido, utilizando NAD(P)H como doador de elétrons (BEDARD e KRAUSE, 2007).

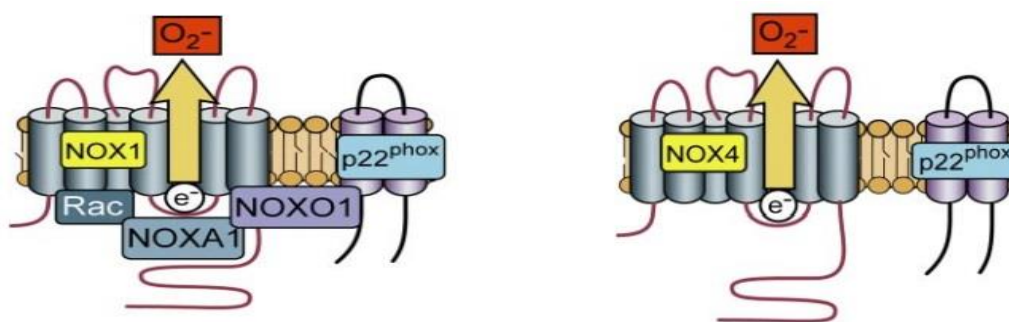
A NAD(P)H oxidase compreende uma família de enzimas denominadas de NOX que catalisam a redução de oxigênio molecular gerando superóxido a partir de NAD(P)H. A NAD(P)H oxidase, primeiramente descoberta em fagócitos, chamada de NOX-2 foi o primeiro exemplo identificado em um sistema gerador de ROS, estando envolvida com atividade microbicida deste tipo celular (BABIOR, et al., 1999). Posteriormente seis homólogos da subunidade gp91<sup>phox</sup> da NAD(P)H oxidase foram descobertos em diferentes tipos celulares e foram denominadas de NOX-1, NOX-3, NOX-4, NOX-5, DUOX-1 e DUOX-2. Os seis homólogos juntamente com a própria com a NOX-2 compõem a família NOX das NAD(P)H oxidases (BEDARD e KRAUSE, 2007). A NAD(P)H oxidase presente em células vasculares, constitui a principal fonte enzimática de geração de ERO em células no sistema vascular (NGUYEN e TOUYZ, 2011).

A estrutura do complexo NAD(P)H oxidase é relativamente complexa composta por uma subunidade catalítica associada à membrana e, também por subunidades regulatórias, as quais se associam para formar o complexo enzimático ativo e produzir EROs. A expressão dessas subunidades varia de acordo com o tipo de célula vascular, então o termo NAD(P)H oxidase vascular se refere às diferentes isoformas da enzima expressas no sistema vascular, pertencente a cada tipo celular (LASSEGUE et al., 2012).

A geração de ERO pela NAD(P)H oxidase vascular é constitutivamente ativa, produzindo uma baixa concentração de ERO intracelular de maneira contínua (LI et al., 2002). Nas CMLV, NOX-1 (figura 1) está localizada na caveola e na membrana plasmática (HILENSKI et al., 2004) e possui capacidade de gerar  $O_2^-$ . A geração de  $O_2^-$  por esta NOX requer a ativação e migração de subunidades regulatórias presente no citosol; p47<sup>phox</sup>, NOXA1 e Rac1 (GARRIDO & GRIENDLING 2009). Fatores humorais, assim como fatores de crescimento, agentes vasoativos e físicos podem regular a atividade da NAD(P)H oxidase vascular (LASSEGUE & CLEMPUS, 2003).

Outra subunidade de bastante importância na produção de ERO, e presente no sistema vascular é NOX – 4 (figura 1). No sistema vascular a NOX - 4 é expressa tanto nas células endoteliais (CE) (AGO et al., 2004), como em células do músculo liso vascular (CMLV) (ELLMARK et al., 2005).

A Ang II constitui um forte estímulo para produção de ERO pela NAD(P)H oxidase vascular que ocorre em duas fases: uma fase rápida e outra lenta e sustentada. O primeiro pico ocorre poucos segundos após a ativação da oxidase pela Ang II e como consequência da fosforilação de p47<sup>phox</sup> e migração de Rac. Esta fase de ativação da oxidase inicial gera ERO capazes de aumentar ainda mais a ativação da enzima e, assim resulta na geração de ERO sustentada e pode manter por horas. Para manter a ativação da NOX-1 requer a ativação da Src que leva a ativação da Rac e consequente ativação da NAD(P)H oxidase em um ciclo de retroalimentação positivo de geração de ERO (SESHIAH et al., 2002).



**Figura 1** - Representação adaptada das subunidades de NOX-1 e NOX-4 (KRAUSE & BEDARD, 2007)

Durante a dislipidemia, a ativação de receptores  $AT_1$  por Ang II contribui com a disfunção vascular que precede o processo aterosclerótico. Em coelhos dislipidêmicos,

eventos pró-inflamatórios são deflagrados, resultando em super-expressão de receptores  $AT_1$  que favorece o aumento da contração induzida por Ang-II em aorta (YANG et al., 1998). Adicionalmente, WASSMANN et al. (2004) demonstraram que a ativação de receptores  $AT_1$  prejudica a função endotelial através da produção de ERO durante a hipercolesterolemia. ZAFARI et al. (1998) mostraram que a produção de  $O_2^-$  gerado por NAD(P)H oxidase, ativada por receptores  $AT_1$ , é seguido por um aumento nos níveis intracelulares de ERO.

Em síntese muitas são as evidências das consequências da dislipidemia sobre o sistema renina angiotensina vascular, entretanto, no limite de nossos conhecimentos não existe na literatura relatos sobre as consequências da ingestão de colesterol que não leve a dislipidemia sobre esse sistema. Até o presente momento, os estudos referentes às consequências da ingestão de colesterol são muito contraditórios. Alguns autores sugerem que a quantidade de colesterol ingerida tem pouca relação com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Por outro lado outros autores já associam o alto consumo de colesterol, com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares mesmo na ausência da alteração do perfil lipídico, como um dos principais fatores para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A ingestão de colesterol está relacionada com a instalação de disfunção endotelial em pessoas que fizeram alta ingestão de colesterol.

Nos dias atuais é cada vez mais evidente a instalação do processo dislipidêmico em individuo jovem, sendo necessário então, uma atenção maior na ingestão de colesterol pelos mesmos. O conjunto de informações da literatura nos leva a levantar a hipótese de que a ingestão de dieta rica em colesterol iniciada na idade jovem, pode não levar a dislipidemia, mas exacerba a produção de ERO com consequente aumento da reatividade vascular decorrente da ativação de receptores  $AT_1$  via ativação da NADPH oxidase.

## ***2 -Objetivos***

## 2.1 - Objetivo geral

Estudar os efeitos da ingestão de colesterol iniciada em camundongos jovens sobre os efeitos basais e a reatividade à angiotensina II em aorta torácica e a participação da NAD(P)H oxidase

## 2.2 - Objetivos específicos

- Avaliar o peso corporal dos animais tratados com colesterol.
- Avaliar as alterações morfológicas e morfométricas da aorta torácica de animais submetidos à ingestão de colesterol.
- Avaliar o perfil lipídico plasmático, e das enzimas aspartato transaminase(AST) e alanina transaminase(ALT) de animais tratados com colesterol.
- Estudar a participação do endotélio e do músculo liso vascular, do ânion superóxido e metabólitos derivados NOX - 1 e NOX - 4 na modulação da contração induzida por Ang II em aorta torácica de animais tratados com colesterol.
- Estudar os níveis basais e induzidos por Ang II de  $O_2^-$  em aorta torácica de camundongos tratados com colesterol.
- Estudar a participação de NOX - 1 e NOX - 4 na produção basal e induzida por Ang II de  $O_2^-$  em aorta torácica de camundongos.
- Avaliar a expressão de NOX - 1 e NOX - 4 em aorta torácica de camundongos tratados com colesterol.

## ***3-Materiais e Métodos***

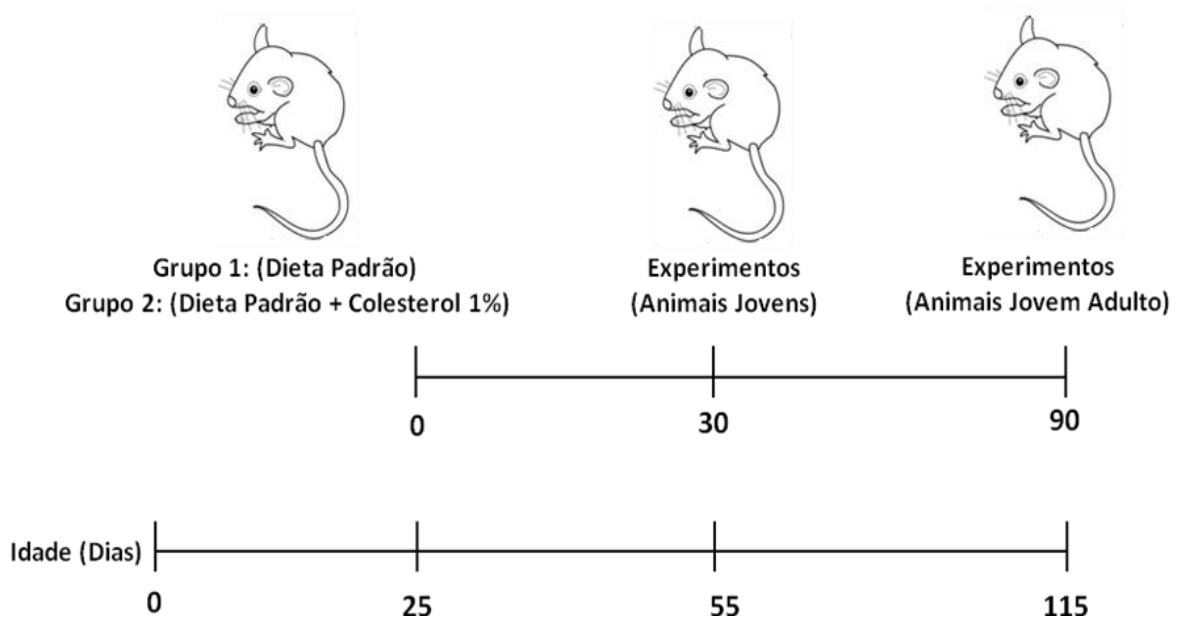
### 3.1 – Animais

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos *C57BL/6 Wild Type* (WT) jovens com idade de 25 dias (10-12g), provenientes do biotério central do *campus* de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos com livre acesso à água e alimento, em ambiente com temperatura controlada de 22° C-25°C e em ciclo de luz de 12 horas (Claro/Escuro).

Os protocolos utilizados foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) do *campus* de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (n° 12.1.976.53.2).

### 3.2 - Divisão dos grupos experimentais

Os animais foram divididos em 2 grupos: animais tratados com ração padrão (RP) ou com ração colesterol (RC) tratados durante 1 mês ou 3 meses.



### 3.3 - Composição da ração

Os animais controles foram alimentados com ração padrão (RP) (Nuvlab<sup>®</sup>). O outro grupo de animais receberam à ração Nuvlab<sup>®</sup> acrescida de colesterol (amresco<sup>®</sup>) com concentração final de 1% de colesterol (RC). A ração com colesterol foi obtida moendo-se a ração padrão nuvlab<sup>®</sup> fornecida pelo biotério central, adicionando-se colesterol para uma concentração final de 1%, e então foram peletizadas, e secas em estufa à 37°C, ensacadas e acondicionadas em local seco até sua utilização.

### 3.4 Análises bioquímicas do soro (lipidograma e enzimas ALT e AST)

Ao final do tratamento de 1 mês ou 3 meses, os animais foram anestesiados com quetamina (70mg.Kg<sup>-1</sup>) e xilazina (10mg.kg<sup>-1</sup>), e por punção cardíaca foi realizada a coleta de 1mL de sangue. As amostras foram imediatamente colocadas a coagular em banho-maria (37°C) e centrifugadas durante 15min numa rotação de 3500rpm para obtenção do soro. Amostras de soro de cada animal foram utilizadas para dosagens colorimétricas e cinéticas, utilizando kits comerciais (LABTEST DIAGNÓSTICA S.A - Lagoa Santa-MG) para a determinação sérica de colesterol total (Cat.76), triglicerídeos (Cat. 87), HDL (Cat.128), LDL (Cat. 111). ALT (Cat. 108), AST (Cat. 109). As concentrações de VLDL foram obtidas utilizando a fórmula de Friedwald:  $LDL \text{ colesterol} = \text{Colesterol Total} - (\text{HDL colesterol} + 1/5 \text{ Triglicérides})$ .

### 3.5 – Estudos funcionais de reatividade arterial *in vitro*

#### 3.5.1 – Preparo dos anéis arteriais

Após tratamento de 1 ou 3 meses, os animais foram anestesiados com isoflurano (3%) (forane<sup>®</sup> Abbot). A aorta torácica foi isolada, dissecada de tecidos adjacentes e foram cortados anéis de 4mm de comprimento. Os anéis foram montados num sistema de órgão isolado com sistema de tensão isométrica, em cuba contendo 5 mL de solução nutritora de Krebs-Henseleit (composição em mmol.L<sup>-1</sup>: NaCl 110,8; KCl 5,9; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; MgSO<sub>4</sub>1,07; CaCl<sub>2</sub> 2,49; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,33 e glicose 11,51, pH 7,4.) aerada com mistura



carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>), mantidos à temperatura constante de 37°C, e acoplados a um transdutor para registro da tensão isométrica. Após um período de estabilização de 60min sob tensão basal adequada de (1,0 g), aproximadamente 80% da tensão máxima determinada, a viabilidade da preparação foi averiguada com PE (0,01μM.L<sup>-1</sup>). A integridade funcional do endotélio foi verificada pela adição de ACh (1μM.L<sup>-1</sup>). Anéis que produziram um relaxamento de 80 – 100% após estímulo com ACh foram considerados como anéis com endotélios intacto, enquanto que os anéis que apresentaram 0% de relaxamento induzido por ACh foram considerados como preparações sem endotélio. A tensão isométrica foi registrada através de um transdutor (Tri 201 – Letica, Espanha). Os resultados foram obtidos através do programa computadorizado (Proto5Letica, Espanha) em computador conectado ao transdutor.

Após o término dos protocolos experimentais as aortas torácicas foram desidratadas em estufa (37°C) durante 24h, e posteriormente pesadas em balança analítica. As respostas contráteis foram expressas em (g) de contração por (mg) de tecido seco. A determinação dos valores de E<sub>max</sub> (efeito máximo) e EC<sub>50</sub> (concentração do agonista que produz 50% do efeito máximo), foram realizadas utilizando o programa Graphprism (Graphprism software Corporation 5.0 EUA). Para análise da potência do agonista foi utilizado o valor de pD<sub>2</sub> (logaritmo negativo da concentração da droga que induz metade do efeito máximo).

### **3.5.2 – Protocolos experimentais**

#### **3.5.2.1 – Efeitos da ingestão da ração de colesterol sobre a contração induzida por Ang II**

Para estudar o efeito da dieta colesterol (1%) sobre a contração induzida pela Ang II, realizaram-se curvas cumulativas concentração-efeito para Ang II (10<sup>-10</sup> a 10<sup>-6</sup> mol.L<sup>-1</sup>) em aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão e ração colesterol (1%).

#### **3.5.2.2 - Participação dos metabolitos da NAD(P)H oxidase sobre a contração induzida pela Ang II**

Com o objetivo de estudar a participação de metabolitos derivados da NADPH oxidase na contração induzida pela Ang II, foram realizadas curvas concentração-efeito para

Ang II ( $10^{-10}$  a  $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>), em aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão e ração colesterol (1%) em presença do inibidor específico de NOX - 1 ( $0.5\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) ML171 (MARTINEZ-REVELLES et al., 2013; D GIANNI et al., 2013) ou inibidor específico de NOX - 4 ( $5\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) VAS2870 (WIND et al., 2010), pré-incubados durante 30 minutos.

### **3.5.2.3 Participação $\text{O}_2^-$ na contração desencadeada pela Ang II**

A participação de  $\text{O}_2^-$  na contração induzida pela Ang II foi estudada pela realização da curva de contração-efeito para este agonista ( $10^{-10}$  a  $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) em aorta torácica na presença do seqüestrador de  $\text{O}_2^-$  Tiron ( $10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>) pré - incubados por 30 minutos. O protocolo foi realizado com os quatros grupos de animais estudados

## **3.6 - Quantificação dos níveis basais e induzidos por Ang II de EROs em anéis de aortas torácicas por microscopia confocal**

### **3.6.1 - Preparação dos anéis de aorta torácica**

Os animais foram anestesiados com isoflurano (3%) para remoção da aorta torácica. Anéis de aorta torácica (250  $\mu\text{m}$ ) foram colocados verticalmente em lamínulas cobertas por solução de poli-L-lisina e carregados com DHE (2,5  $\mu\text{m}$ , 30 min, a 37°C), preparada em solução de Hanks (composição em mmol/L:  $\text{CaCl}_2$  1,6;  $\text{MgSO}_4$  1,0;  $\text{NaCl}$  145,0;  $\text{KCl}$  5,0;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,5; dextrose 10,0; HEPES 10,0; pH 7,4).

### **3.6.2 - Microscopia Confocal**

O excesso de sonda foi removido por lavagem com solução de Hanks. Após a lavagem, as lamínulas foram colocadas numa câmara contendo solução de Hanks, e o nível de ERO nos tecidos vasculares foi analisado por microscópio confocal (Leica TSC SP5). DHE foi excitada com laser de argônio a 570 nm e a fluorescência emitida foi medida em 650 nm. As imagens foram capturadas em intervalos de 1,314s (xyt) no modo de aquisição Live Data Mode. As intensidades de fluorescência mínima e máxima foram analisadas em regiões de interesse no músculo liso vascular. A fluorescência inicial em  $t = 0\text{s}$  foi utilizada como

fluorescência basal ( $F_0$ ), enquanto que a fluorescência final ( $F_f$ ) foi registrada em  $t = 300s$  após a adição de Ang II ( $1\text{nmol.L}^{-1}$ ) de acordo com a  $EC_{50}$  previamente determinada para cada grupo experimental nas curvas concentração-efeito para Ang II.

### **3.6.3 - Protocolos Experimentais**

#### **3.6.3.1 – Participação da NOX-1 e NOX-4 na produção basal e induzida por Ang II de ERO em aorta torácica**

A participação de NOX-1 e NOX-4 na produção basal e induzida por Ang II de EROS em aorta torácica foi determinada por microscopia confocal com DHE após o pré-tratamento dos anéis de aorta torácica com inibidor seletivo de NOX - 1 ML171 ( $0.5\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e para NOX - 4 VAS2870 ( $5\mu\text{mol.L}^{-1}$ ).

Os resultados de microscopia confocal, como os valores médios de intensidade fluorescência (IF) basal e final foram expressos em unidades de fluorescência (U).

### **3.7 – Análises histológicas da aorta torácica**

Os animais foram anestesiados com isoflurano (3%), e os segmentos de aorta torácica foram removidos e fixados em formol por 24 horas. Esses tecidos foram fixados, desidratados e incluídos em blocos de parafina. Cortes de  $4\mu\text{m}$  de espessura foram dispostos em lâmina de microscopia. As lâminas foram coradas segundo a técnica de coloração com HE e tricomio de masson. Os cortes foram analisados em microscópio Nikon (Japão) com aumento de 40x, e as imagens foram captadas por câmera digital (Coolpix 4500, RoperScientific, Japão) armazenadas em computador e editadas utilizando o software Adobe Photo Shop 7.0. para análise morfológica e morfométrica.

### **3.8 - Quantificação protéica de NOX-1 e NOX-4 pela técnica de Western Blot**

Após ser trituradas em um compartimento metálico, a aorta torácica foi homogeneizadas durante 2h em tampão a  $4^\circ\text{C}$  em tampão RIPA (Triton-X-100 1%, Tris 100mM (Ph 7,4) pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, ortovanadato de sódio Mm.

A solução com os extratos teciduais foram centrifugados a 12000 rpm a 4 ° C por 15 minutos para remoção do material insolúvel. Após centrifugação o conteúdo protéico total foi quantificado utilizando o método de (BRADFORD, 1976), utilizando BSA para fazer a curva padrão e as análises foram feitas em espectrofotometria em comprimento de onda de 595nm. Amostras nas concentrações de 20-40µg de proteína total foram submetidos a eletroforese de gel de poliacrilamida (extrato total). Em cada gel havia um marcador com peso molecular com valores estabelecidos.

A transferência das proteínas separadas no gel foi realizada eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, durante 1 hora e 40 minutos em 100 V. A membrana de nitrocelulose foi incubada com uma solução bloqueadora (BSA 5% e TBST 100mL (qsp) a 4 °C durante 1 hora para reduzir a ligação inespecífica de proteínas de membrana.

Logo após, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos anti-NOX-4 e anti-NOX-1 ( Rabbit polyclonal, 1:1000, Abcam). As incubações foram realizadas por 14h a 4°C diluído em (TBST e BSA 1%). Após a lavagem em seguida as membranas foram lavadas com TBST 0,1% (3 vezes por 5 minutos cada). Estas membranas foram incubadas com o anticorpo secundário, por 1h em ambiente, e logo após foram revelados com reagente cromogênico (solução de 9mL de água + 1000µL diluente + 200µL de 4CN) sobre a membrana. A intensidade das bandas foi quantificada por densiometria óptica através da utilização do programa de análise de intensidade de bandas (*ImagemJ*).

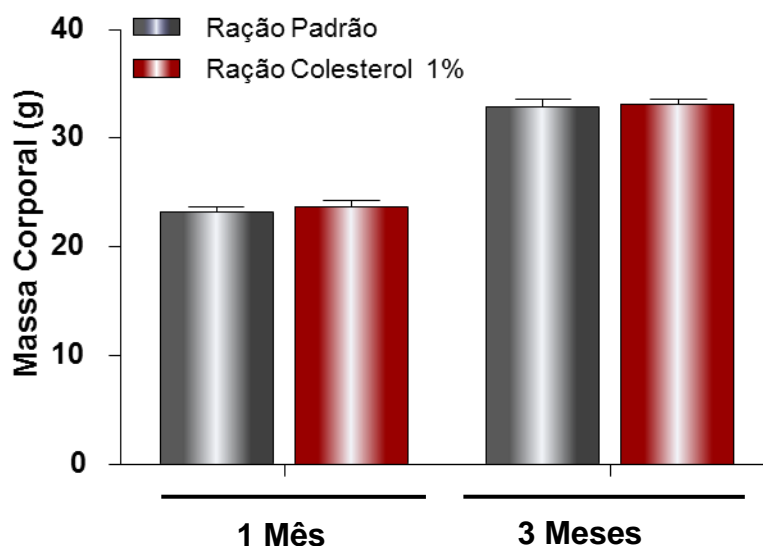
### **3.9 - Análises estatísticas**

A análise estatística utilizada para comparação entre grupos foi análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do pós-teste de Bonferroni, utilizando o programa GraphPadPrism (Versão 5.0 Prism, GraphPad, USA).

## ***4 – Resultados***

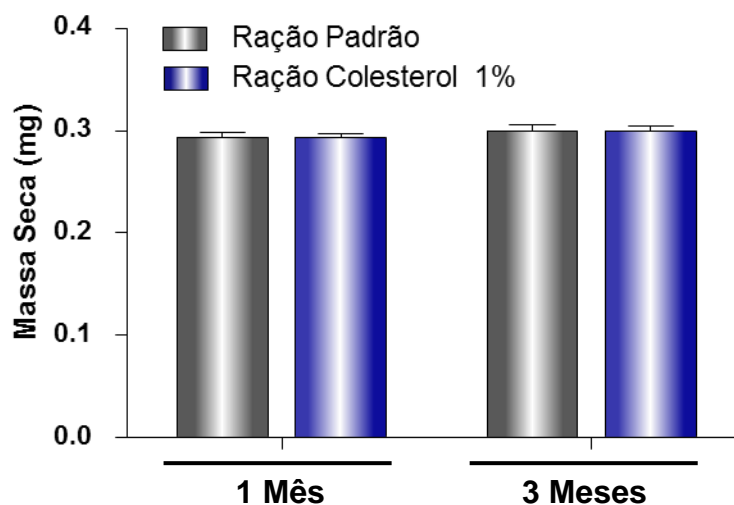
#### 4.1 – Efeitos da ingestão da ração com colesterol sobre o peso dos animais e peso seco da aorta torácica

O desenvolvimento da idade acarretou aumento do peso dos animais alimentados tanto com RP e quanto com RC durante o período estudado. Os animais alimentados com RC durante 1 mês ( $23.21 \pm 1.55$ ,  $n = 10$ ) e 3 meses ( $32.92 \pm 1.79$ ,  $n = 10$ ) não apresentaram diferença quando comparado com os animais tratados com RP durante 1 mês ( $23.74 \pm 1.67$ ,  $n = 10$ ) e 3 meses ( $33.12 \pm 2.12$ ,  $n = 10$ ) (figura 2).



**Figura 2** - Efeito do tratamento com ração colesterol (1%) durante 1 mês ou 3 meses no peso corporal dos camundongos. Os dados representam a média  $\pm$  E. P. M. ( $n = 10$ ).  $p (>0.05)$  ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni.

Camundongos alimentados com RP ou RC não tiveram os pesos secos de anéis de aorta torácica alterados. Camundongos que receberam RP apresentaram os pesos de  $0,28 \pm 0,01$ mg (1mês) e  $0,31 \pm 0,01$ mg (3 Meses), e os que foram tratados com RC apresentaram os seguintes pesos 1 mês ( $0,29 \pm 0,01$ mg) e 3 meses ( $0,30 \pm 0,02$ mg) (figura 3).



**Figura 3** - Peso seco de aorta torácica. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M (n = 10) da massa seca de anéis (4 mm) de aorta torácica de animais tratados com ração padrão ou ração colesterol (1%) durante 1 mês ou 3 meses. p (>0.05) ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni.

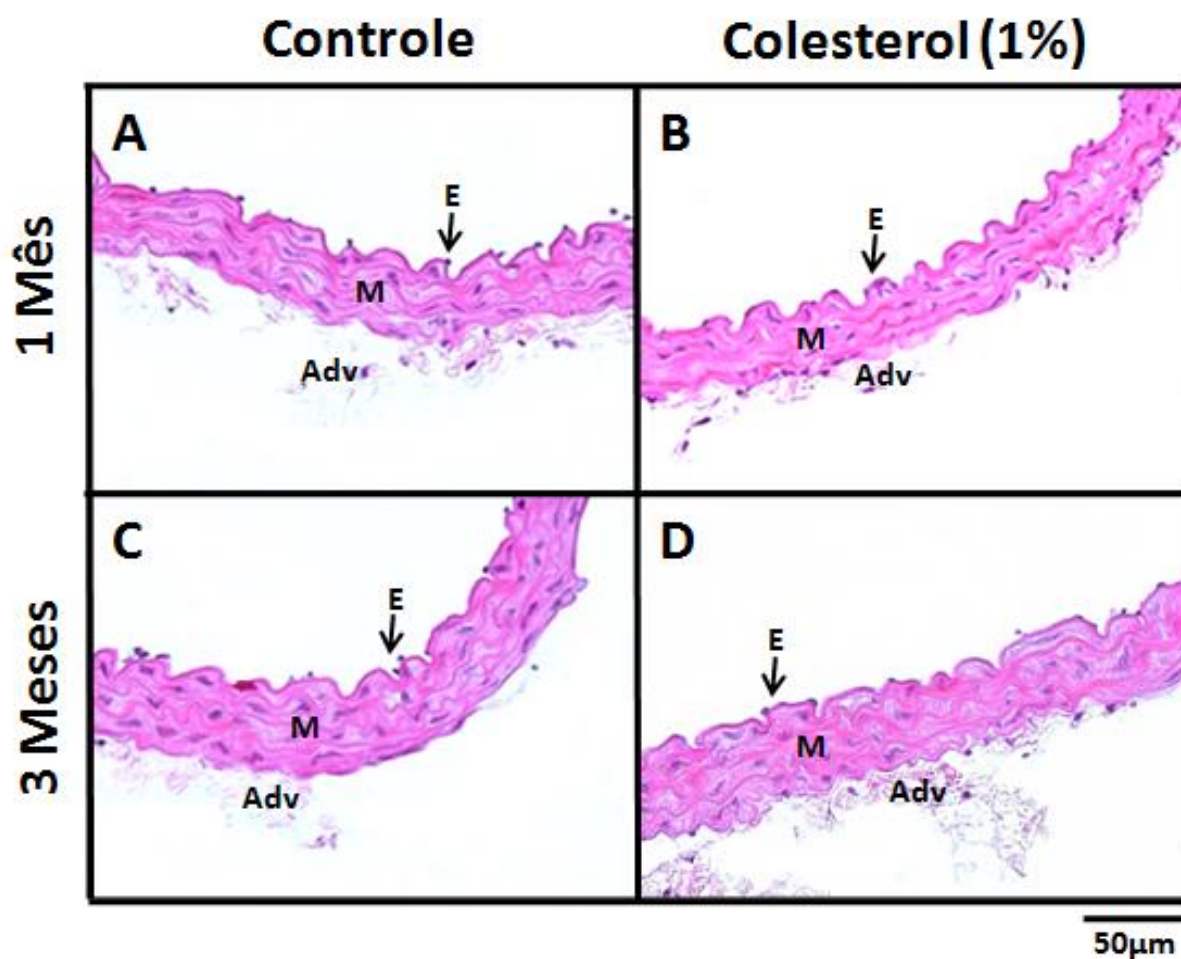
## 4.2 – Caracterização dos efeitos da ingestão de colesterol 1% sobre os aspectos morfofuncionais de aorta torácica de camundongos.

### 4.2.1 – Análises histológicas de aorta torácica

#### 4.2.1.1 – Morfologia

Para avaliar os efeitos da ingestão de colesterol (1%) sobre a estrutura histológica de aorta torácica cortes dessas aortas foram coradas com HE e submetidas à análise morfológica.

A coloração por hematoxilina e eosina evidencia em roxo, estruturas celulares como núcleo, proteínas ácidas do citoplasma e proteoglicanas, e em rosa filamentos protéicos do citoesqueleto, fibras colágenas e proteínas mitocondriais.



**Figura 4** - Análise morfológica e morfométrica de anéis de aorta torácica de camundongos C57BL/6, alimentados com dieta padrão (RP) ou rica em colesterol (1%) (RC), por 1 ou 3 meses. Cortes representativos corados com HE de camundongos alimentados com dieta padrão por 1 mês (A), com dieta rica em colesterol por 1 mês (B), com dieta padrão por 3 meses (C) ou com dieta rica em colesterol por 3 meses (D). Coloração: HE. Amplificação: 100X. E = endotélio; M = média; Adv = adventícia. One-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni (n=5).

Em aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão e ração colesterol (1%), não foram observadas alterações na camada íntima composta por células endoteliais, camadas formadas por células musculares lisas na camada média, e camada adventícia formada por fibroblastos e contínua ao tecido conjuntivo frouxo de tecidos adjacentes (figura 4).

Em aorta torácica de animais tratados com ração padrão ou ração colesterol (1%) durante 1 mês apresentaram uma monocamada de células endoteliais na camada íntima, seguida de três ou quatro camadas de células musculares lisas na camada média, e uma

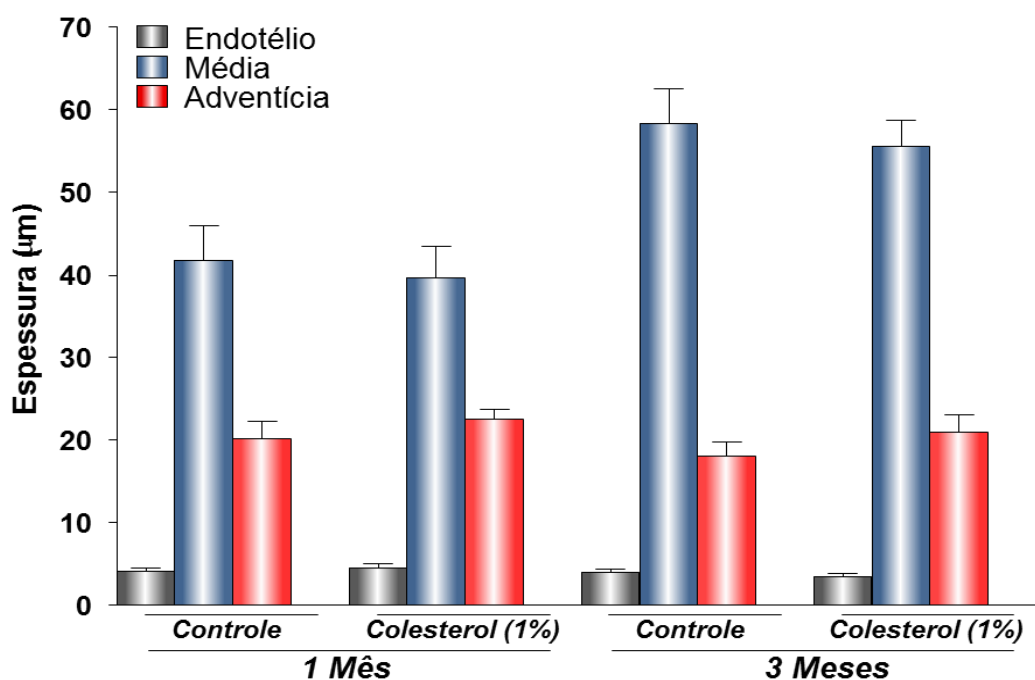


camada adventícia formada por fibroblastos e tecido conjuntivo frouxo e tecidos adjacentes (figura 4).

Já em aorta torácica de animais tratados durante 3 meses apresentaram de quatro ou cinco camadas celulares musculares lisas na camada média, a qual diferença está ligada à idade dos animais, e não ao tratamento. As análises morfológicas realizadas em aorta torácica de animais tratados com ração colesterol (1%) mostraram que, o tratamento não acarretou alterações morfológicas quando comparado com os animais tratados com ração padrão (figura 4).

#### 4.2.1.2 – Morfometria

Com o objetivo de avaliar os efeitos da ingestão de colesterol (1%) sobre a espessura das camadas da aorta torácica de camundongos, imagens representativas dessas aortas foram submetidas à análise morfométrica.



**Figura 5** - Análise morfométrica de aorta torácica de ratos tratados com ração Padrão ou Ração colesterol (1%) durante 1 ou 3. Os dados representam a média  $\pm$  E. P. M. ( $n = 5$ ) da espessura das do endotélio das camadas média e adventícia. One-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni ( $n=5$ ).  $p (> 0.05)$ .

As aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão durante 1 meses apresentaram espessura equivalente a  $4,10 \pm 0,45 \mu\text{m}$  na camada íntima (células endoteliais),

41,8 ± 4,11µm na camada média e 20,20 ± 2,00µm na camada adventícia. Animais tratados durante 1 mês apresentaram 3,90 ± 0,39µm na camada íntima ( células endoteliais), 58,30 ± 4,23µm na camada média e 18,00 ± 1,80µm na camada adventícia em animais tratados durante 3 meses (figura 5).

Em aorta torácica de camundongos tratados com ração colesterol (1%) não foram observadas diferenças de espessura quando comparado com os animais tratados com ração padrão quanto a espessura equivalente da camada íntima (células endoteliais) 4,50 ± 0,47µm, na camada média 39,70 ± 3,80µm e camada adventícia 22,50 ± 1,29µm de animais tratados durante 1 mês e, 3,50 ± 0,35µm na camada íntima ( células endoteliais), 55,60 ± 3,19µm na camada média e 21,00 ± 2,10µm na camada adventícia em animais tratados durante 3 meses ( figura 5).

#### **4.3 – Efeitos da ingestão da ração com colesterol sobre os níveis séricos do lipidograma e das enzimas AST e ALT.**

Com o objetivo de avaliar as alterações no perfil lipídico e das enzimas AST e ALT, sobre a ingestão da RC, foram feitas análises dos níveis séricos das mesmas.

Não foram observadas alterações no perfil lipídico, nem das enzimas AST e ALT, nos animais tratados com RP ou nos perfis dos animais tratados com RC (Tabela 1).

**Tabela 1** - Valores séricos do lipidograma do soro de camundongos C57BL/6 alimentados com RP ou RC, durante 1 ou 3 meses. Os dados apresentam média  $\pm$  E.P.M. (n=15). Teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni. ( $p > 0.05$ )

	LINHAGEM	C57BL/6			
	TRATAMENTO	CONTROLE 1 MÊS	COLESTERO L1 MÊS	CONTROLE 3 MESES	COLESTEROL3 MESES
	IDADE	55 DIAS	55 DIAS	115 DIAS	115 DIAS
PARÂMETROS	UNIDADE	RESULTADOS			
TGP/ALT	U.L <sup>-1</sup>	32.50 $\pm$ 2.64	35.60 $\pm$ 2.02	34.8 $\pm$ 2.38	36.9 $\pm$ 3.40
TGO/AST	U.L <sup>-1</sup>	54.09 $\pm$ 2.37	55.05 $\pm$ 1.30	54.18 $\pm$ 1.75	52.54 $\pm$ 1.36
Colesterol Total	mg.dL <sup>-1</sup>	98.30 $\pm$ 2.53	97.10 $\pm$ 2.63	96.20 $\pm$ 1.79	99.60 $\pm$ 1.99
Triglicérides	mg.dL <sup>-1</sup>	57.60 $\pm$ 2.04	56.20 $\pm$ 2.55	55.40 $\pm$ 2.16	55.50 $\pm$ 1.64
VLDL	mg.dL <sup>-1</sup>	11.40 $\pm$ 0.45	11.00 $\pm$ 0.47	11.20 $\pm$ 0.38	10.90 $\pm$ 0.38
HDL	mg.dL <sup>-1</sup>	32.70 $\pm$ 0.97	30.20 $\pm$ 0.74	32.20 $\pm$ 0.94	30.08 $\pm$ 1.72
LDL	mg.dL <sup>-1</sup>	57.30 $\pm$ 2.06	58.30 $\pm$ 2.30	58.00 $\pm$ 1.52	61.10 $\pm$ 1.64

### Conclusões parciais

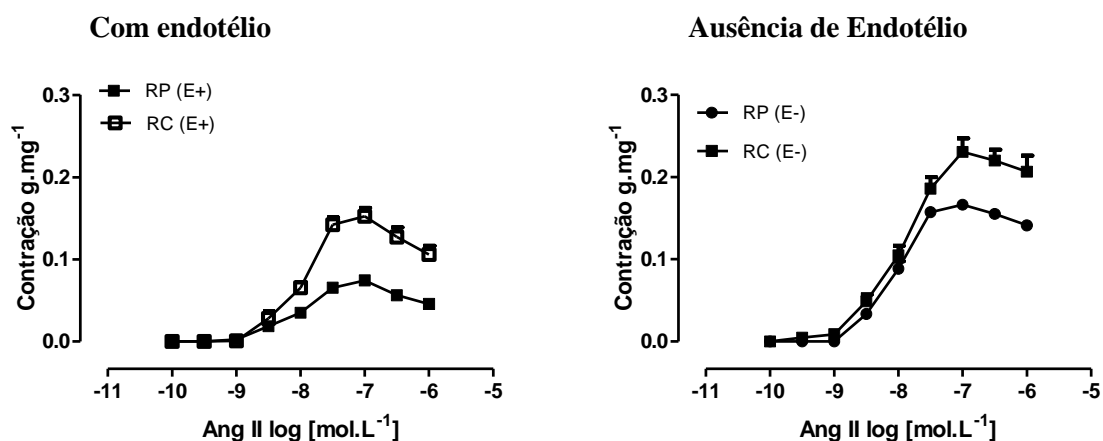
- Animais alimentados com RC não tiveram seu peso alterado mostrando que o colesterol nessa concentração não é capaz de aumentar o peso corporal durante esse período de tratamento em camundongos C57BL/6.
- O tratamento com ração colesterol (1%) durante 1 mês e 3 meses não acarretou alterações morfológicas em aorta torácica de camundongos.
- O peso seco dos anéis não foi alterado em animais que se alimentaram com RC, o que exclui a necessidade de ajustar os resultados de contração/peso de anéis da aorta torácica entre os animais alimentados com RP ou RC.
- A ingestão de colesterol nessa concentração e nesse período de tempo não é capaz de alterar o perfil lipídico e, às concentrações plasmáticas das enzimas AST e ALT quando comparado com os valores de referência.

#### 4.4 - Estudos funcionais de reatividade arterial in vitro

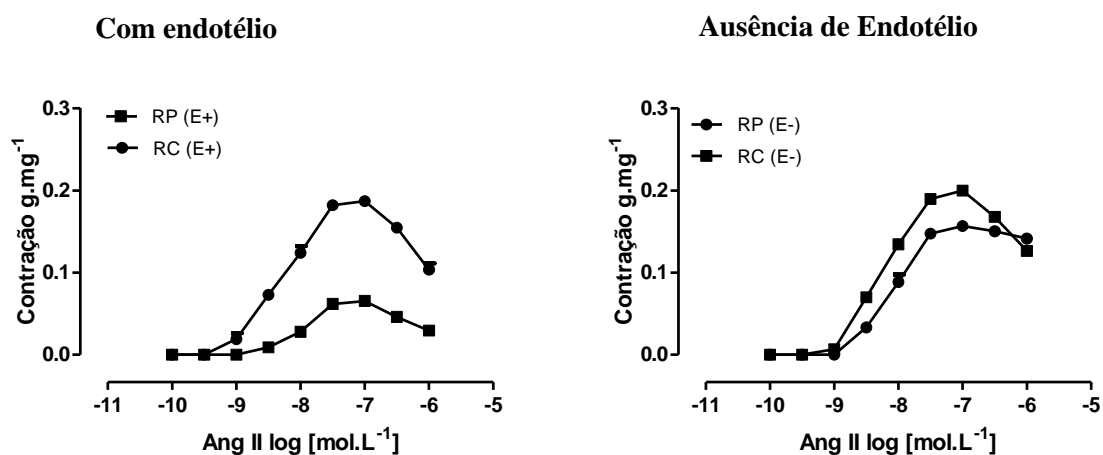
##### 4.4.1 – Efeitos da ingestão de colesterol sobre a contração induzida por Ang II em aorta torácica de camundongo

Com o objetivo de verificar os efeitos da ingestão de colesterol sobre a contração induzida por Ang II em aorta torácica de camundongos, curva concentração-efeito cumulativas para Ang II foram obtidas.

#### Tratamento 1 Mês



#### Tratamento 3 Meses



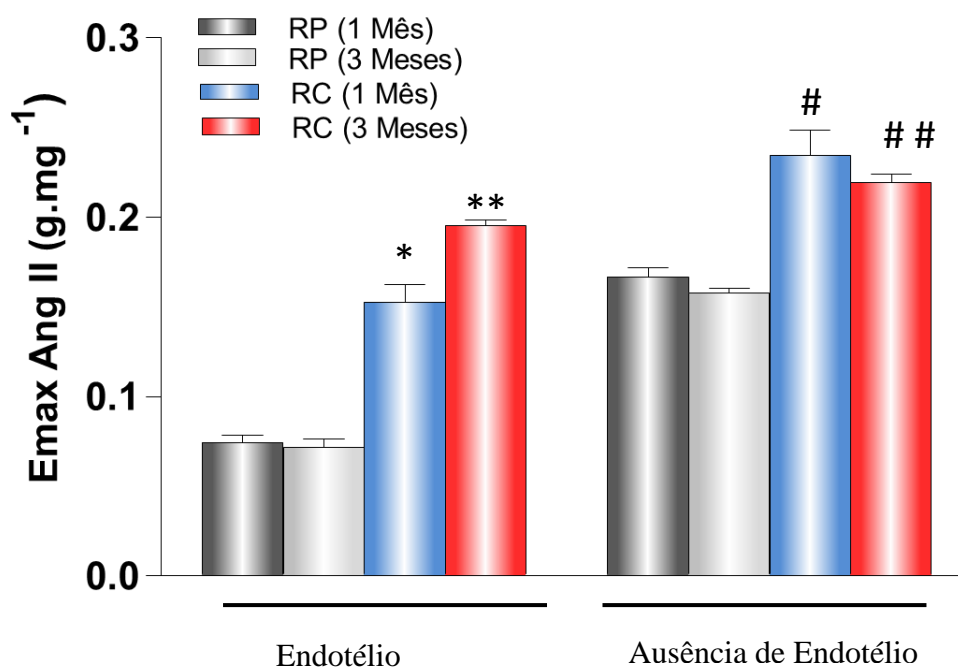
**Figura 6** - Curva concentração efeito para Ang II em aorta torácica. Os dados representam a média  $\pm$  E. P. M (n = 9) da contração induzida por Ang II em aorta torácica de animais tratados com RP e RC durante 1 mês e 3 meses em presença (E<sup>+</sup>) ou ausência de endotélio (E<sup>-</sup>).

Em aorta torácica ( $E^+$ ) de animais tratados com RP durante 1 mês e 3 meses, a Ang II produziu uma resposta de contração concentração-dependente com amplitude máxima ( $E_{max}$ ) ( $0.074 \pm 0.005 \text{ g.mg}^{-1}$ ,  $n = 9$ ) e ( $0.0714 \pm 0.006 \text{ g.mg}^{-1}$ ,  $n = 9$ ) respectivamente (figura 6, tabela 2).

Em aorta torácica ( $E^-$ ) de animais tratados com RP durante 1 mês e 3 meses, Ang II produziu uma resposta de contração concentração-dependente com amplitude máxima ( $E_{max}$ ) de  $0.166 \pm 0.005 \text{ g.mg}^{-1}$  e  $0.158 \pm 0.001 \text{ g.mg}^{-1}$  respectivamente (figura 6, tabela 2).

O tratamento dos animais com RC aumentou os valores de  $E_{max}$  de Ang II na aorta torácica ( $E^+$ ) de camundongos tratados durante 1 mês ( $0.152 \pm 0.009 \text{ g.mg}^{-1}$ ,  $n=9$ ) e 3 meses ( $0.195 \pm 0.003 \text{ g.mg}^{-1}$ ,  $n=9$ ) quando comparado com os animais tratados com RP (figura 6, tabela 2).

O valor de  $E_{max}$  de Ang II em aorta torácica ( $E^-$ ) de camundongos tratados com RC durante 1 mês ( $0.234 \pm 0.014 \text{ g.mg}^{-1}$ ,  $n=9$ ) foi exacerbado quando comparado com o valor de  $E_{max}$  de Ang II em aorta torácica ( $E^+$ ). No entanto, não foi observada essa diferença de  $E_{max}$  para Ang II em aorta torácica ( $E^-$ ) ( $0.219 \pm 0.004 \text{ g.mg}^{-1}$ ,  $n = 9$ ) de animais tratados com RC durante 3 meses (figura 6, tabela 2).



**Figura 7** - Contração máxima induzida por Ang II em aorta torácica. Os dados apresentam a média  $\pm$  E. P. M ( $n=9$ ) do efeito da contração máxima ( $E_{max}$ ) induzida por Ang II em aorta torácica com endotélio ( $E^+$ ) ou na sua ausência ( $E^-$ ) de animais tratados com RP ou RC durante 1 mês e 3 meses. Significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) em relação à aorta torácica ( $E^+$ ) de animais tratados com RP 1 Mês (\*) e 3 Meses (\*\*) e ( $E^-$ ) 1 Mês (#) e 3 Meses (##). Teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

A potência ( $pD_2$ ) de Ang II em aorta torácica ( $E^+$ ) de camundongos tratados com RP durante 1 e 3 meses foram  $8.26 \pm 0.08$  ( $n = 9$ ) e  $8.02 \pm 0.06$  ( $n=9$ ) respectivamente. Os valores de  $pD_2$  para Ang II não foram alterados com a retirada de endotélio da aorta torácica de animais tratados com RP 1 mês ( $pD_2=8.08 \pm 0.05$ ,  $n=9$ ) e 3 meses ( $pD_2= 8.30 \pm 0.06$ ,  $n=9$ ) (tabela 2).

Em aorta torácica ( $E^+$ ) de camundongos tratados com RC durante 1 mês e 3 meses o valor de  $pD_2$  de Ang II ( $pD_2 = 8.01 \pm 0.03$ ,  $n = 9$ ) e ( $pD_2 = 8.29 \pm 0.06$ ,  $n=9$ ) respectivamente o valor de  $pD_2$  não foi alterado em relação a aorta torácica de camundongos tratados com RP. A ausência de endotélio não alterou os valores de  $pD_2$  de Ang II ( $pD_2 =7.93\pm 0.03$ ,  $n = 9$ ) e ( $pD_2 = 8.30\pm 0.06$ ,  $n = 9$ ) quando comparado com aorta torácica ( $E^+$ ), e em comparação com animais tratados com RP durante 1 mês e 3 meses (tabela 2).

**Tabela 2** - Valores  $pD_2$  e  $E_{max}$  de Ang II em aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão ou ração colesterol (1%) durante 1 mês e 3 meses .

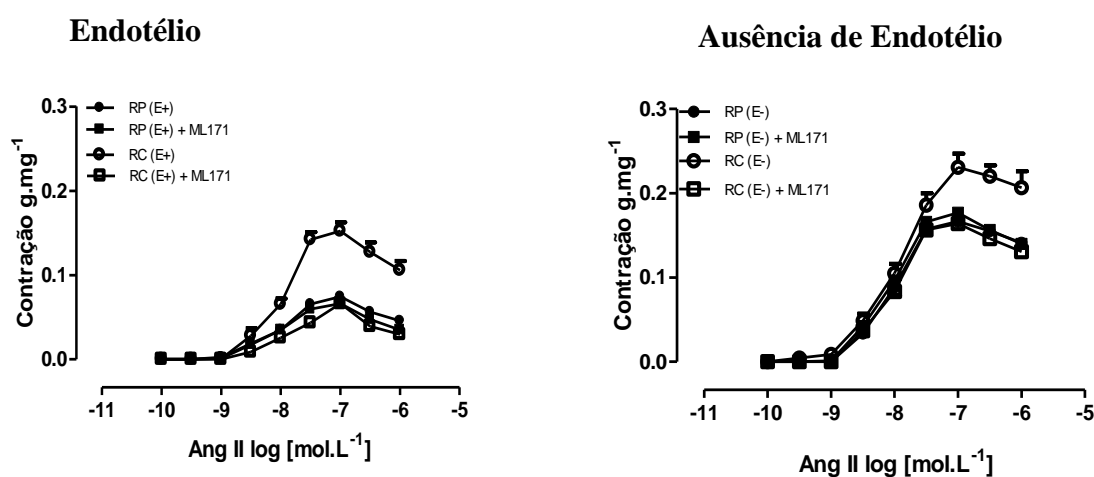
GRUPOS	$E_{max}$ Ang II ( $g.mL^{-1}$ )	$pD_2$ Ang II (-log $EC_{50}$ )
Aorta torácica ( $E^+$ ) RP 1 Mês	$0.074 \pm 0.005$	$8.26 \pm 0.08$
Aorta torácica ( $E^+$ ) RC 1 Mês	$0.152 \pm 0.009$ *	$8.01 \pm 0.03$
Aorta torácica ( $E^+$ ) RP 3 Meses	$0.071 \pm 0.006$	$8.02 \pm 0.06$
Aorta torácica ( $E^+$ ) RC 3 Meses	$0.195 \pm 0.003$ #	$8.29 \pm 0.06$
Aorta torácica ( $E^-$ ) RP 1 Mês	$0.166 \pm 0.005$	$8.08 \pm 0.05$
Aorta torácica ( $E^-$ ) RC 1 Mês	$0.234 \pm 0.014$ **	$7.93 \pm 0.03$
Aorta torácica ( $E^-$ ) RP 3 Meses	$0.158 \pm 0.001$	$8.20 \pm 0.05$
Aorta torácica ( $E^-$ ) RC 3 Meses	$0.219 \pm 0.004$ ##	$8.30 \pm 0.06$

Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 9$ ). Significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) em relação as aorta torácica de camundongos tratados com ração RP 1 mês (\*) e 3 meses (#) na presença de endotélio e em sua ausência 1 mês (\*\*) e 3 meses (##).

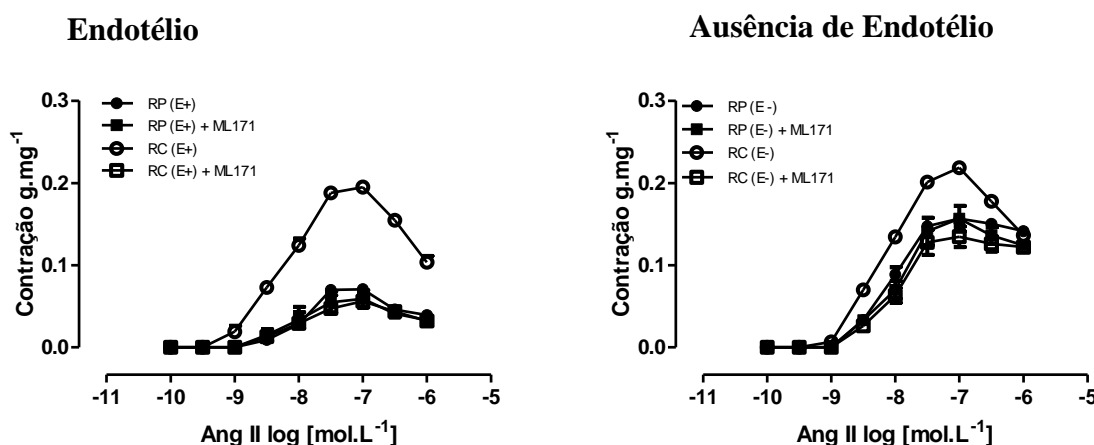
#### 4.4.2 - Participação de metabólitos derivados de NOX-1 na modulação da contração induzida por Ang II em aorta torácica

Com o objetivo de verificar o papel de metabólitos de NOX-1 na modulação de contração induzida por Ang II em aorta torácica de camundongos tratados com colesterol, curvas concentração-efeito cumulativas foram obtidas, em presença do inibidor de NOX-1 (ML171).

##### Tratamento 1 Mês



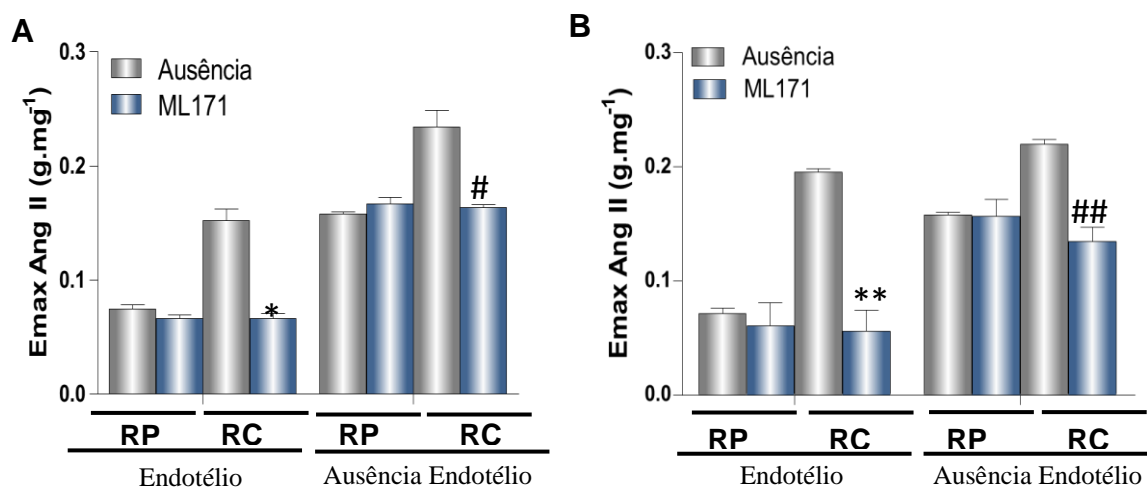
##### Tratamento 3 Meses



**Figura 8** - Curva concentração efeito para Ang II em aorta torácica na presença ou ausência do inibidor de NOX - 1 (ML171). Os dados representam a média  $\pm$  E. P. M (n = 9) da contração induzida por Ang II em aorta torácica de animais tratados com RP e RC durante 1 mês em presença (E<sup>+</sup>) ou ausência de endotélio (E<sup>-</sup>).

Em aorta torácica ( $E^+$ ) e ( $E^-$ ) de camundongos tratados com RP o pré-tratamento com ML171 não alterou o valor e  $E_{max}$  de Ang II em animais tratados durante 1 mês ( $E_{max} = 0,066 \pm 0,003$   $n = 9$ ) e ( $E_{max} = 0,166 \pm 0,005$ ,  $n = 9$ ) e em animais tratados durante 3 meses ( $E_{max} = 0,061 \pm 0,020$ ,  $n = 9$ ) e ( $E_{max} = 0,156 \pm 0,015$ ,  $n = 7$ ) em relação à ausência do inibidor (figura 8, figura 9 e tabela 3).

Já em aorta torácica ( $E^+$ ) e ( $E^-$ ) de camundongos tratados com RC o valor de  $E_{max}$  de Ang II foi reduzido em presença de ML171 em animais com 1 mês ( $E_{max} = 0,067 \pm 0,005$ ,  $n = 9$ ) e ( $E_{max} = 0,164 \pm 0,002$ ,  $n = 9$ ) e 3 meses de tratamento ( $E_{max} = 0,056 \pm 0,018$ ,  $n = 7$ ) e ( $E_{max} = 0,134 \pm 0,012$ ,  $n = 7$ ) em relação à ausência de inibidor ( figura 8, figura 9 e tabela 3).



**Figura 9** - Contração máxima induzida por Ang II em aorta torácica em ausência ou presença de ML171 . Os dados apresentam a média  $\pm$  E. P. M ( $n=9$ ) do efeito da contração máxima ( $E_{max}$ ) induzida por Ang II em aorta torácica com endotélio ( $E^+$ ) ou na sua ausência ( $E^-$ ) de animais tratados com RP ou RC durante 1 mês (A) e 3 meses (B). Significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) em relação à aorta torácica ( $E^+$ ) de animais tratados com RC 1 mês (\*) e 3 meses (\*\*) e ( $E^-$ ) 1 mês (#) e 3 meses (\*\*#). Teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni.



**Tabela 3** - Emax de Ang II em aorta torácica em ausência ou na presença de ML171

GRUPOS	Emax Ang II g.mg <sup>-1</sup>	
	Ausência	ML171
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RP 1 Mês	0.074 ± 0.005	0.066 ± 0.003
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RC 1 Mês	0.152 ± 0.009	0.066 ± 0.005 *
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RP 3 Meses	0.074 ± 0.005	0.061 ± 0.002
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RC 3 Meses	0.195 ± 0.003	0.053 ± 0.018 **
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RP 1 Mês	0.158 ± 0.003	0.166 ± 0.006
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RC 1 Mês	0.234 ± 0.014	0.164 ± 0.002 #
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RP 3 Meses	0.158 ± 0.001	0.156 ± 0.015
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RC 3 Meses	0.219 ± 0.004	0.134 ± 0.012 ##

Os dados representam a média +E.P.M. (n = 9). Significativamente diferente (p < 0,05) em relação a aorta torácica (E<sup>+</sup>) de animais tratados com RC durante 1 mês (\*) e 3 meses (\*\*) e em aorta torácica (E<sup>-</sup>) de animais tratados com RC 1 mês (#) e 3 meses (##), em ausência de ML171

Em camundongos tratados com RP, o pré-tratamento com ML171 não alterou os valores de pD<sub>2</sub> de Ang II em aorta torácica (E<sup>+</sup>) de animais tratados durante 1 mês (pD<sub>2</sub> = 8.19 ± 0.04, n = 9) e 3 meses (pD<sub>2</sub> = 8.02 ± 0.05, n = 9) em relação à ausência de inibidor (tabela 4).

Em aorta torácica na ausência de endotélio também não foi observado diferença nos valores de pD<sub>2</sub> de Ang II de animais tratados durante 1 mês (pD<sub>2</sub> = 8.10 ± 0.02, n = 9) e animais tratados durante 3 meses (pD<sub>2</sub> = 8.00 ± 0.03, n = 9) em relação à ausência de inibidor (tabela 4).

Em camundongos tratados com RC, o pré-tratamento com ML171 também não alterou os valores de pD<sub>2</sub> de Ang II em aorta torácica (E<sup>+</sup>) e (E<sup>-</sup>) de animais tratados durante 1 mês (pD<sub>2</sub> = 8.03 ± 0.04, n = 9) e (pD<sub>2</sub> = 8.06 ± 0.03, n = 9) e tratados durante 3 meses (pD<sub>2</sub> = 8.06 ± 0.05, n = 9) e (pD<sub>2</sub> = 7.98 ± 0.02, n = 9) em relação à ausência do inibidor (tabela 4).

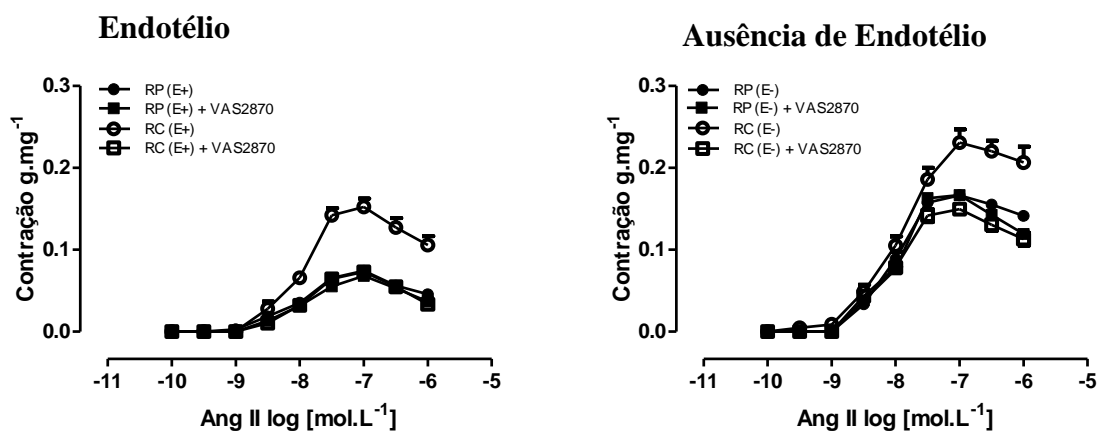
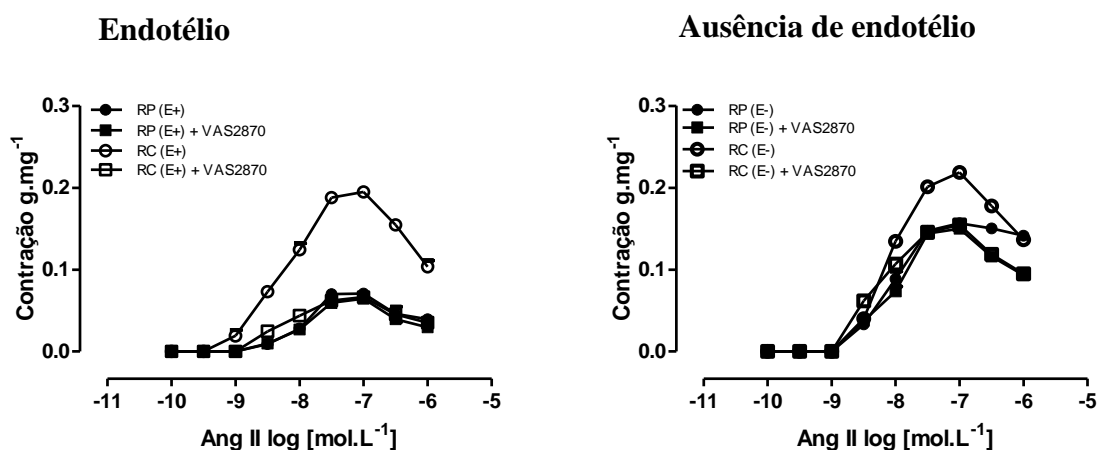
**Tabela 4** - Potência de Ang II em aorta torácica em ausência ou presença de ML171

GRUPOS	<i>p</i> D2 Ang II (-log EC <sub>50</sub> )	
	Ausência	ML171
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RP 1 Mês	8.26 ± 0.08	8.19 ± 0.04
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RC 1 Mês	8.01 ± 0.03	8.03 ± 0.04
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RP 3 Meses	8.02 ± 0.06	8.02 ± 0.05
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RC 3 Meses	8.29 ± 0.06	8.06 ± 0.05
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RP 1 Mês	8.08 ± 0.05	8.10 ± 0.02
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RC 1 Mês	7.93 ± 0.03	8.06 ± 0.03
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RP 3 Meses	8.20 ± 0.05	8.00 ± 0.03
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RC 3 Meses	8.30 ± 0.06	7.98 ± 0.02

*Os dados representam a média ± E.P.M (n = 9). (p > 0.05). Teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni.*

#### 4.4.3 - Participação de metabólitos derivados de NOX-4 na modulação da contração induzida por Ang II em aorta torácica

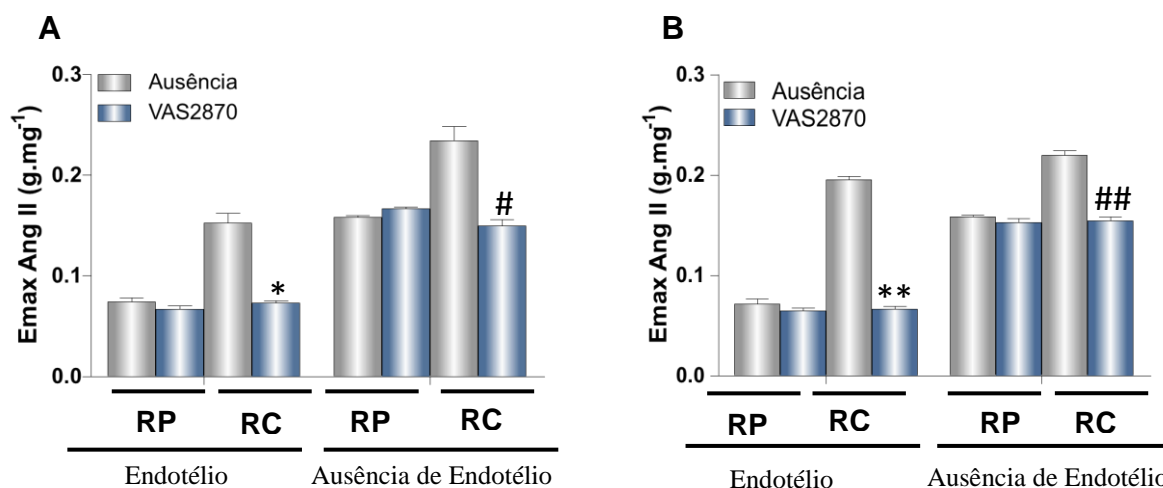
Com o objetivo de verificar o papel dos metabólitos derivados de NOX-4 na modulação de contração induzida por Ang II em aorta torácica de camundongos tratados com colesterol, curvas concentração-efeito cumulativas para Ang II foi obtidas, em presença do inibidor de NOX-4 (VAS2870).

**Tratamento 1 Mês****Tratamento 3 Meses**

**Figura 10** - Curva concentração efeito para Ang II em aorta torácica na presença ou ausência do inibidor de NOX - 4 (VAS2870). Os dados representam a média  $\pm$  E. P. M ( $n = 10$ ) da contração induzida por Ang II em aorta torácica de animais tratados com RP e RC durante 1 mês em presença ( $E^+$ ) ou ausência de endotélio ( $E^-$ ).

Em aorta torácica ( $E^+$ ) e ( $E^-$ ) de camundongos tratados com RP o pré-tratamento com VAS2870 não alterou o valor e  $E_{max}$  de Ang II em animais tratados durante 1 mês ( $E_{max} = 0,066 \pm 0,003$ ,  $n = 9$ ) e ( $E_{max} = 0,166 \pm 0,005$ ,  $n = 9$ ), e em animais tratados durante 3 meses ( $E_{max} = 0,064 \pm 0,020$ ,  $n = 9$ ) e ( $E_{max} = 0,152 \pm 0,002$ ,  $n = 7$ ) em relação à ausência do inibidor ( figura 10, 11, tabela 5)

Já em aorta torácica ( $E^+$ ) e ( $E^-$ ) de camundongos tratados com RC durante 1 mês o valor de  $E_{max}$  de Ang II foi reduzido em presença de VAS2870 (inibidor de NOX-1) ( $E_{max} = 0.073 \pm 0.002$ ,  $n = 9$ ) e ( $E_{max} = 0.149 \pm 0.006$ ,  $n = 9$ ). A redução de  $E_{max}$  também foi observada em relação aos animais tratados durante 3 meses ( $E_{max} = 0.066 \pm 0.003$ ,  $n = 7$ ) e ( $E_{max} = 0.154 \pm 0.003$ ,  $n = 7$ ) em relação à ausência de inibidor (figura 10, 11, tabela 5).



**Figura 11** - Contração máxima induzida por Ang II em aorta torácica em ausência ou presença de VAS2870. Os dados apresentam a média  $\pm$  E. P. M ( $n=9$ ) do efeito da contração máxima ( $E_{max}$ ) induzida por Ang II em aorta torácica com endotélio ( $E^+$ ) ou na sua ausência ( $E^-$ ) de animais tratados com RP ou RC durante 1 mês (A) e 3 meses (B). Significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) em relação à aorta torácica ( $E^+$ ) de animais tratados com RC 1 Mês (\*) e 3 Meses (\*\*) e ( $E^-$ ) 1 Mês (#) e 3 Meses (##) em ausência de VAS2870. Teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

**Tabela 5** - *E<sub>max</sub>* de Ang II em aorta torácica em ausência ou na presença de VAS2870.

GRUPOS	<i>E<sub>max</sub></i> Ang II g.mg <sup>-1</sup>	
	Ausência	VAS2870
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RP 1 Mês	0.074 ± 0.004	0.066 ± 0.003
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RC 1 Mês	0.152 ± 0.009	0.073 ± 0.002 *
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RP 3 Meses	0.071 ± 0.005	0.064 ± 0.002
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RC 3 Meses	0.195 ± 0.004	0.066 ± 0.003 **
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RP 1 Mês	0.158 ± 0.002	0.166 ± 0.002
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RC 1 Mês	0.234 ± 0.014	0.149 ± 0.006 #
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RP 3 Meses	0.158 ± 0.002	0.152 ± 0.002
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RC 3 Meses	0.219 ± 0.004	0.154 ± 0.003 ##

Os dados representam a média +E.P.M. (n = 9). Significativamente diferente (p < 0,05) em relação à aorta torácica (E<sup>+</sup>) tratados com RC 1 mês (\*) e 3 meses (\*\*) e em aorta torácica (E<sup>-</sup>) 1 mês (#) e 3 meses (##), na ausência de VAS2870.

Em camundongos tratados com RP, o pré-tratamento com VAS2870 não alterou os valores de *pD*<sub>2</sub> de Ang II em aorta torácica (E<sup>+</sup>) de animais tratados durante 1 mês (*pD*<sub>2</sub> = 8.05 ± 0.03, n = 9) e 3 meses (*pD*<sub>2</sub> = 8.03 ± 0.03, n = 9) em relação à ausência de inibidor (tabela 6).

Em aorta torácica na ausência de endotélio (E<sup>-</sup>) também não foi observado diferença nos valores de *pD*<sub>2</sub> de Ang II de animais tratados durante 1 mês (*pD*<sub>2</sub> = 8.00 ± 0.02, n = 9) e animais tratados durante 3 meses (*pD*<sub>2</sub> = 8.02 ± 0.03, n = 9) em relação à ausência de inibidor (tabela 6).

Em camundongos tratados com RC, o pré-tratamento com VAS2870 não alterou os valores de *pD*<sub>2</sub> de Ang II em aorta torácica (E<sup>+</sup>) e (E<sup>-</sup>) de animais tratados durante 1 mês (*pD*<sub>2</sub> = 8.03 ± 0.02, n = 9) e (*pD*<sub>2</sub> = 8.07 ± 0.02, n = 9) e tratados durante 3 meses (*pD*<sub>2</sub> = 8.18 ± 0.05, n = 9) e (*pD*<sub>2</sub> = 7.90 ± 0.04, n = 9) em relação à ausência do inibidor (tabela 6).

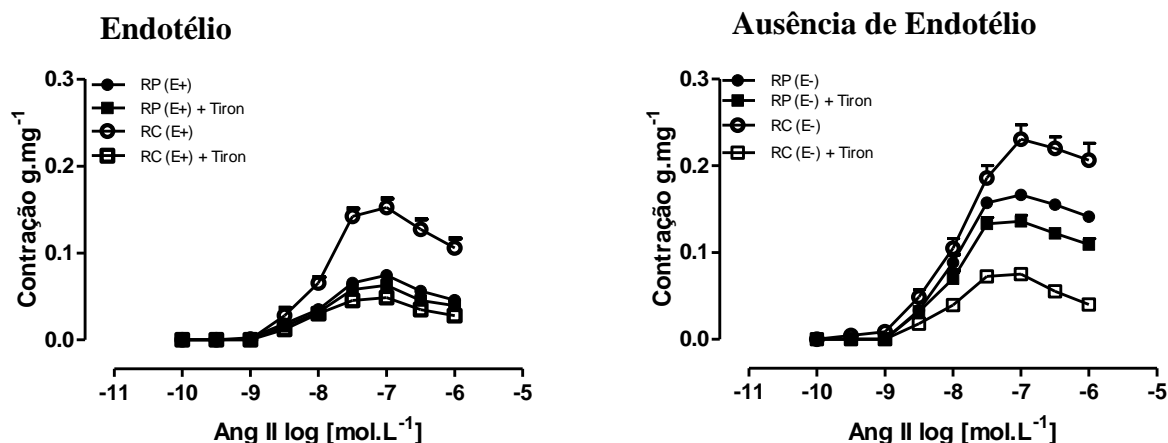
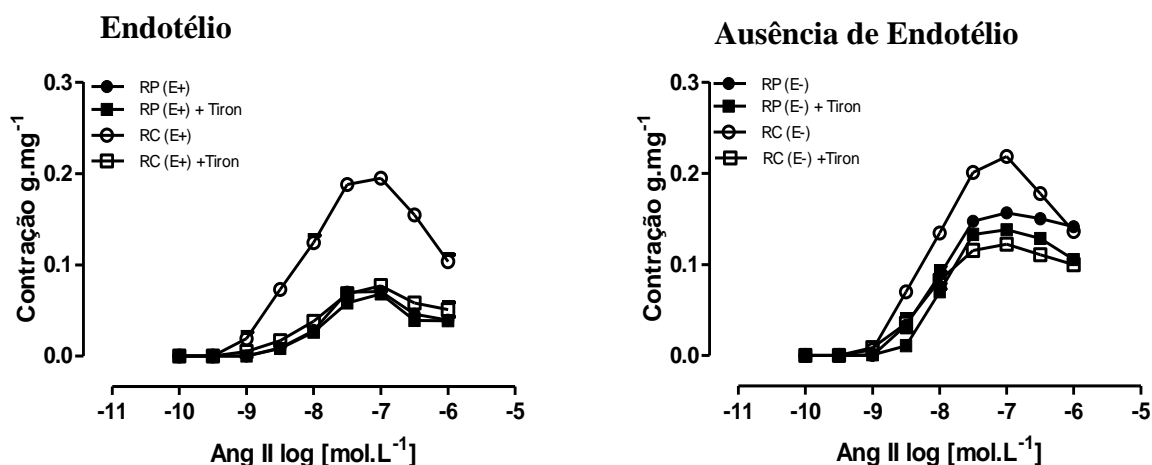
**Tabela 6** - Potência de Ang II em aorta torácica em ausência ou presença de VAS2870.

GRUPOS	<i>p</i> D2 Ang II (-log EC <sub>50</sub> )	
	Ausência	VAS2870
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RP 1 Mês	8.26 ± 0.08	8.05 ± 0.03
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RC 1 Mês	8.01 ± 0.03	8.03 ± 0.02
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RP 3 Meses	8.02 ± 0.06	8.03 ± 0.03
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RC 3 Meses	8.29 ± 0.06	8.18 ± 0.05
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RP 1 Mês	8.08 ± 0.05	8.00 ± 0.02
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RC 1 Mês	7.93 ± 0.03	8.07 ± 0.02
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RP 3 Meses	8.20 ± 0.05	8.02 ± 0.03
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RC 3 Meses	8.30 ± 0.06	7.90 ± 0.04

Os dados representam a média ± E.P.M (n = 9). (p > 0.05). Teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

#### 4.4.4 – Participação de O<sub>2</sub><sup>-</sup> na modulação da contração induzida por Ang II em aorta torácica de camundongos

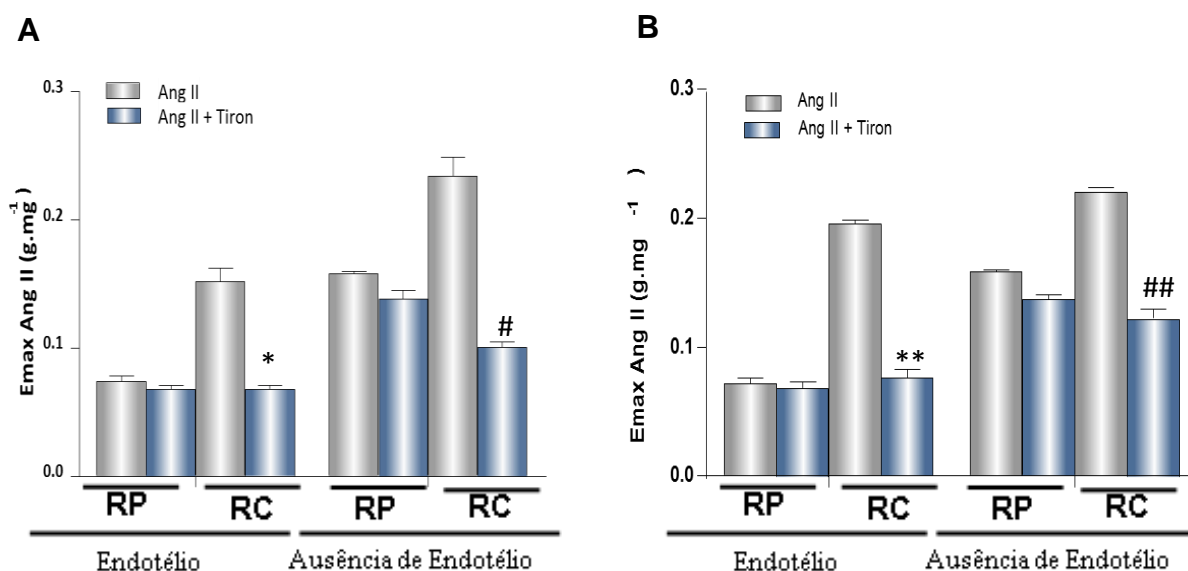
Com o objetivo de verificar a contribuição do O<sub>2</sub><sup>-</sup> na modulação de contração induzida por Ang II em aorta torácica de camundongos tratados com RC curvas concentração-efeito cumulativas para Ang II foram obtidas, em presença de Tiron.

**Tratamento 1 Mês****Tratamento 3 Meses**

**Figura 12** - Curva concentração efeito para Ang II em aorta torácica na presença ou ausência do sequestrador de ânion superóxido (Tiron). Os dados representam a média  $\pm$  E. P. M ( $n = 9$ ) da contração induzida por Ang II em aorta torácica de animais tratados com RP e RC durante 1 mês e 3 meses em presença ( $E^+$ ) ou ausência de endotélio ( $E^-$ ).

O valor de  $E_{max}$  de Ang II em aorta torácica ( $E^+$ ) e ( $E^-$ ) de camundongos tratados com RP não foi alterado em presença de Tiron em animais tratados durante 1 mês ( $E_{max} = 0.067 \pm 0.003$   $n = 9$ ) e ( $E_{max} = 0.138 \pm 0.007$   $n = 9$ ) e animais tratados durante 3 meses ( $E_{max} = 0.069 \pm 0.003$   $n = 9$ ) e ( $E_{max} = 0.137 \pm 0.006$   $n = 9$ ) respectivamente ( figura 12,13 e tabela 7).

Em aorta torácica ( $E^+$ ) e ( $E^-$ ) de camundongos tratados com RC durante 1 mês o valor de  $E_{max}$  de Ang II foi reduzido em presença do Tiron ( $E_{max} = 0.068 \pm 0.002$ ,  $n = 9$ ) e ( $E_{max} = 0.101 \pm 0.003$ ,  $n = 9$ ). A redução de  $E_{max}$  também foi observada em relação aos animais tratados durante 3 meses ( $E_{max} = 0.076 \pm 0.006$ ,  $n = 7$ ) e ( $E_{max} = 0.122 \pm 0.007$ ,  $n = 7$ ) em relação à ausência de inibidor (figura 12, 13 e tabela 7).



**Figura 13** - Contração máxima induzida por Ang II em aorta torácica em ausência ou presença de Tiron. Os dados apresentam a média  $\pm$  E. P. M ( $n=9$ ) do efeito da contração máxima ( $E_{max}$ ) induzida por Ang II em aorta torácica com endotélio ( $E^+$ ) ou na sua ausência ( $E^-$ ) de animais tratados com RP ou RC durante 1 mês (A) e 3 meses (B). Significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) em relação à aorta torácica ( $E^+$ ) de animais tratados com RC 1 mês (\*) e 3 meses (\*\*) e ( $E^-$ ) 1 mês (#) e 3 meses (##) na ausência de Tiron. Teste de ANOVA com pós-teste



**Tabela 7** - Emax de Ang II em aorta torácica em ausência ou na presença de Tiron.

GRUPOS	Emax Ang II g.mg <sup>-1</sup>	
	Ausência	Tiron
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RP 1 Mês	0.074 ± 0.004	0.067 ± 0.003
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RC 1 Mês	0.152 ± 0.009	0.068 ± 0.002 *
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RP 3 Meses	0.071 ± 0.005	0.069 ± 0.003
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RC 3 Meses	0.195 ± 0.004	0.076 ± 0.006 **
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RP 1 Mês	0.158 ± 0.002	0.138 ± 0.007
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RC 1 Mês	0.234 ± 0.014	0.101 ± 0.003 #
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RP 3 Meses	0.158 ± 0.002	0.137 ± 0.006
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RC 3 Meses	0.219 ± 0.004	0.122 ± 0.007 ##

Os dados representam a média ± E.P.M. (n = 9). Significativamente diferente (p < 0,05) em relação à aorta torácica (E<sup>+</sup>) tratados RC durante 1 mês (\*) e 3 meses (\*\*) e em aorta torácica (E<sup>-</sup>) em ausência (#) ou presença (##), na ausência de Tiron.

Em camundongos tratados com RP, o pré-tratamento com Tiron não alterou os valores de pD<sub>2</sub> de Ang II em aorta torácica (E<sup>+</sup>) de animais tratados durante 1 mês (pD<sub>2</sub> = 8.21 ± 0.03, n = 9) e 3 meses (pD<sub>2</sub> = 8.23 ± 0.03, n = 9) em relação à ausência do sequestrador.

Em aorta torácica na ausência de endotélio também não foi observado diferença nos valores de pD<sub>2</sub> de Ang II de animais tratados durante 1 mês (pD<sub>2</sub> = 8.20 ± 0.02, n = 9) e animais tratados durante 3 meses (pD<sub>2</sub> = 8.31 ± 0.02, n = 9) em relação à ausência de inibidor (tabela 8).

Em camundongos tratados com RC, o pré-tratamento com Tiron também não alterou os valores de pD<sub>2</sub> de Ang II em aorta torácica (E<sup>+</sup>) e (E<sup>-</sup>) de animais tratados durante 1 mês (pD<sub>2</sub> = 8.11 ± 0.02, n = 9) e (pD<sub>2</sub> = 8.15 ± 0.04, n = 9) e tratados durante 3 meses (pD<sub>2</sub> = 8.20 ± 0.09, n = 9) e (pD<sub>2</sub> = 8.32 ± 0.03, n = 9) em relação à ausência do inibidor (tabela 8).

**Tabela 8** - Potência de Ang II em aorta torácica em ausência ou presença de Tiron.

GRUPOS	$pD_2$ Ang II (-log EC50)	
	Ausência	Tiron
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RP 1 Mês	8.26 ± 0.08	8.21 ± 0.03
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RC 1 Mês	8.01 ± 0.03	8.11 ± 0.02
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RP 3 Meses	8.02 ± 0.06	8.23 ± 0.03
Aorta torácica (E <sup>+</sup> ) RC 3 Meses	8.29 ± 0.06	8.20 ± 0.09
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RP 1 Mês	8.08 ± 0.05	8.20 ± 0.02
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RC 1 Mês	7.93 ± 0.03	8.15 ± 0.04
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RP 3 Meses	8.20 ± 0.05	8.31 ± 0.02
Aorta torácica (E <sup>-</sup> ) RC 3 Meses	8.30 ± 0.06	8.32 ± 0.03

Os dados representam a média ± E.P.M (n = 9). (p > 0.05). Teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

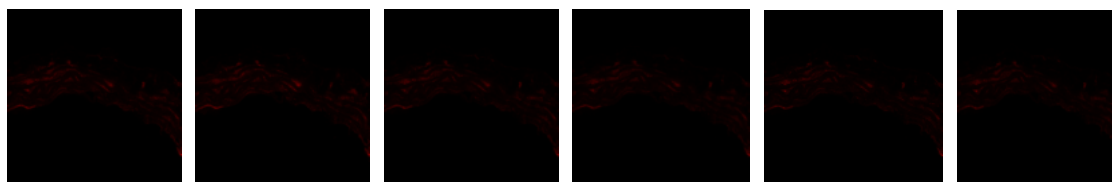
### Conclusões Parciais

- A hiper-reatividade da Ang II observada em aorta torácica de camundongos tratados com RC é independente de endotélio.
- $O_2$  contribui para a hiper-reatividade da Ang II em aorta torácica de camundongos tratados com RC
- A produção de  $O_2$  em aorta torácica de camundongos em parte é derivado das subunidades da NAD(P)H, NOX-1 e NOX-4.

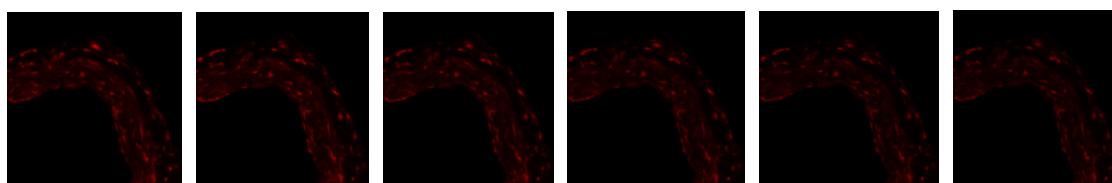
### 4.4.5 - Quantificação dos níveis basais e induzidos por Ang II de EROS em anéis de aorta torácica por microscopia confocal

#### 4.4.5.1 - Efeitos da ingestão de colesterol sobre os níveis basais e induzidos por Ang II de EROS em aorta torácica de animais tratados com RP ou RC durante 1 mês ou 3 meses

##### A – Controle 1 Mês (Ração Padrão)



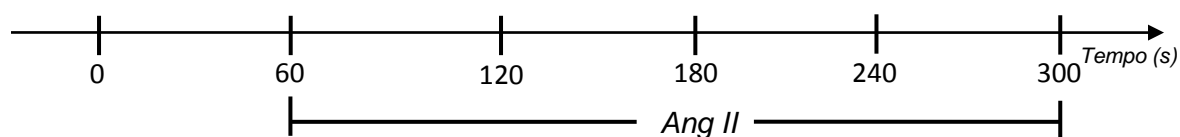
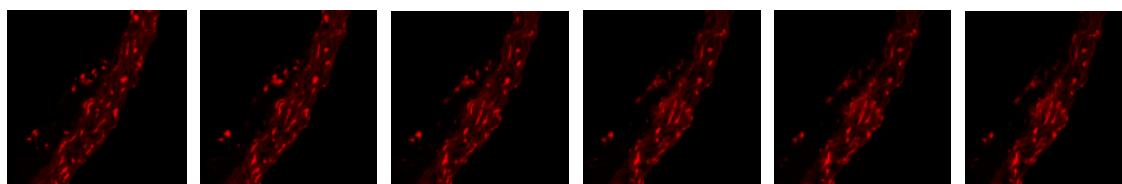
##### B – Tratado 1 Mês ( Ração Colesterol)



##### C – Tratado 3 Meses ( Ração Padrão)



##### D – Tratado 3 Meses (Ração Colesterol)

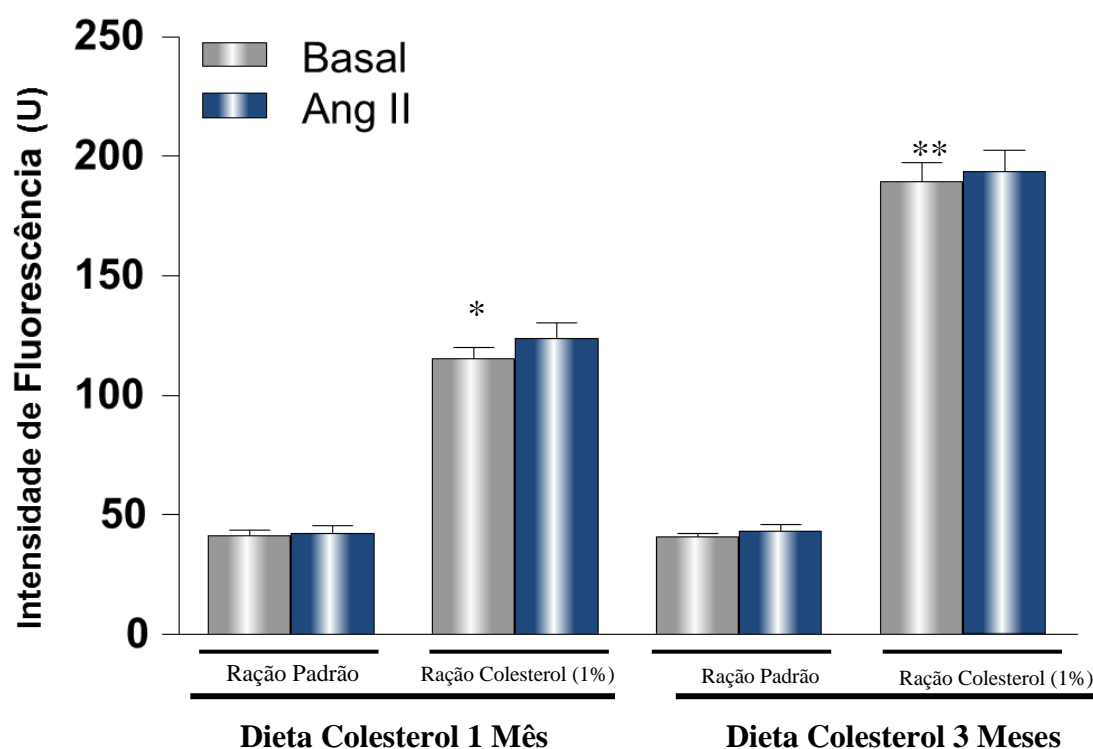


**Figura 14** - Imagens representativas de anéis de aorta torácica marcada com DHE antes ( $t = 0s$ ) e após ( $t = 60s$ ) a adição de Ang II ( $n = 6$ ). A. Anéis de aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão 1 mês, B. Anéis de aorta torácica de camundongos tratados com ração colesterol (1%) 1 mês C. Anéis de aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão 3 meses D. Anéis de aorta torácica de camundongos tratados com ração colesterol (1%) 3 meses.

Em aorta torácica de camundongo tratado com colesterol (1%) carregadas com DHE, a fluorescência basal do músculo liso vascular de animais tratados 1 mês ( $IF = 115,40 \pm 4,78$  U,  $n = 6$ ) foi maior que a fluorescência basal de aorta torácica de animais tratados com ração padrão ( $IF = 41,30 \pm 2,54$  U,  $n = 6$ ) (figura 14, 15, tabela 9).

Animais tratados durante 3 meses apresentaram o mesmo padrão de reposta. Em aorta torácica de camundongos tratados com colesterol (1%) durante 3 meses carregadas com DHE a fluorescência basal do músculo liso vascular ( $IF = 189,41 \pm 8,19$  U  $n = 6$ ), foi maior que a fluorescência basal do músculo liso vascular de animais tratados com ração padrão ( $IF = 189,41 \pm 8,19$  U  $n = 6$ ). (figura 14, 15, tabela 9).

A adição de Ang II não alterou a fluorescência basal no músculo liso vascular em aorta torácica de animais tratados com colesterol (1%) durante 1 mês ( $IF = 123,91 \pm 6,62$  U,  $n = 6$ ) e 3 meses ( $IF = 193,51 \pm 9,11$  U,  $n = 6$ ), e animais tratados com ração padrão tratados durante 1 mês ( $IF = 42,61 \pm 2,80$  U,  $n = 6$ ) e 3 meses ( $IF = 43,45 \pm 2,44$  U,  $n = 6$ ) (figura 14, 15, tabela 9).



**Figura 15** - Intensidade de fluorescência emitida pelo músculo liso vascular dos anéis de aorta torácica carregados com DHE. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M ( $n = 6$ ) da intensidade de fluorescência basal e final (após estímulo com Ang II) do músculo liso vascular de aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão ou com ração colesterol (1%) durante 1 mês ou 3 meses. Significativamente diferente  $p < 0,05$  em relação à fluorescência basal de aortas torácicas de camundongos alimentados com ração padrão 1 Mês (\*) e 3 meses (\*\*). ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni.

**Tabela 9** - Fluorescência emitida pelo músculo liso vascular de aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão (RP) ou ração colesterol (1%) (RC) durante 1 mês ou 3 meses, marcadas com DHE.

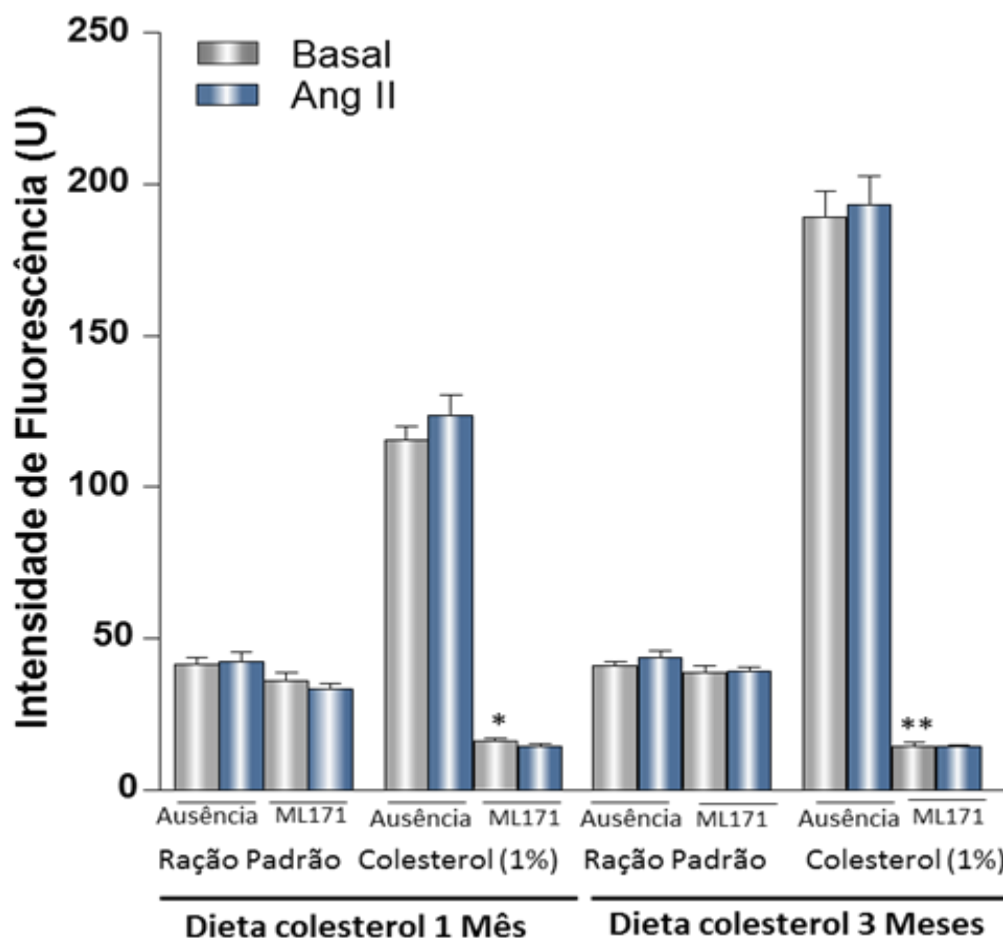
Animais	Intensidade de Fluorescência (U)	
	Basal	Final
Animais tratados com RP 1 Mês	41,30 ± 2,54	42,61 ± 2,80
Animais tratados com RC 1 Mês	115,40 ± 4,78 *	123,91 ± 6,62
Animais tratados com RP 3 Meses	40,93 ± 1,36	43,45 ± 2,44
Animais tratados com RC 3 Meses	189,40 ± 8,19 **	193,51 ± 9,11

*Os dados representam a média ± E.P.M (n = 6) da fluorescência basal entre os grupos de animais. Significativamente diferente (p < 0,05) em relação ao grupo de animais tratados com RP durante 1 mês (\*), ou grupo tratado com RP durante 3 meses (\*\*).*

#### 4.4.5.2 – Efeitos da ingestão de colesterol sobre os níveis basais e induzidos por Ang II de ROS derivados de NOX-1 em aorta torácica de camundongos

Com o objetivo de avaliar a participação de NOX -1 na produção basal e induzida por Ang II de EROS em aorta torácica de camundongo tratado com ração colesterol (1%), os estudos de microscopia confocal com DHE foram conduzidos após tratamento dessas aortas com DHE.

O Pré-tratamento com ML171 reduziu as fluorescências basais do músculo liso vascular de camundongos tratados com RC durante 1 mês ( $F_0 = 16,32 \pm 1,67U$ ,  $n=6$ ) e meses ( $F_0 = 14,42 \pm 1,18U$ ,  $n=6$ ), quando comparado em sua ausência. Em aorta torácica de animais tratados com ração padrão não foi observada redução da fluorescência basal na presença de tiron em animais tratados 1 mês ( $F_0 = 35,86 \pm 2,82 U$ ,  $n = 6$ ) e 3 meses ( $F_0 = 38,96 \pm 2,12 U$ ,  $n = 6$ ) (figura 16).

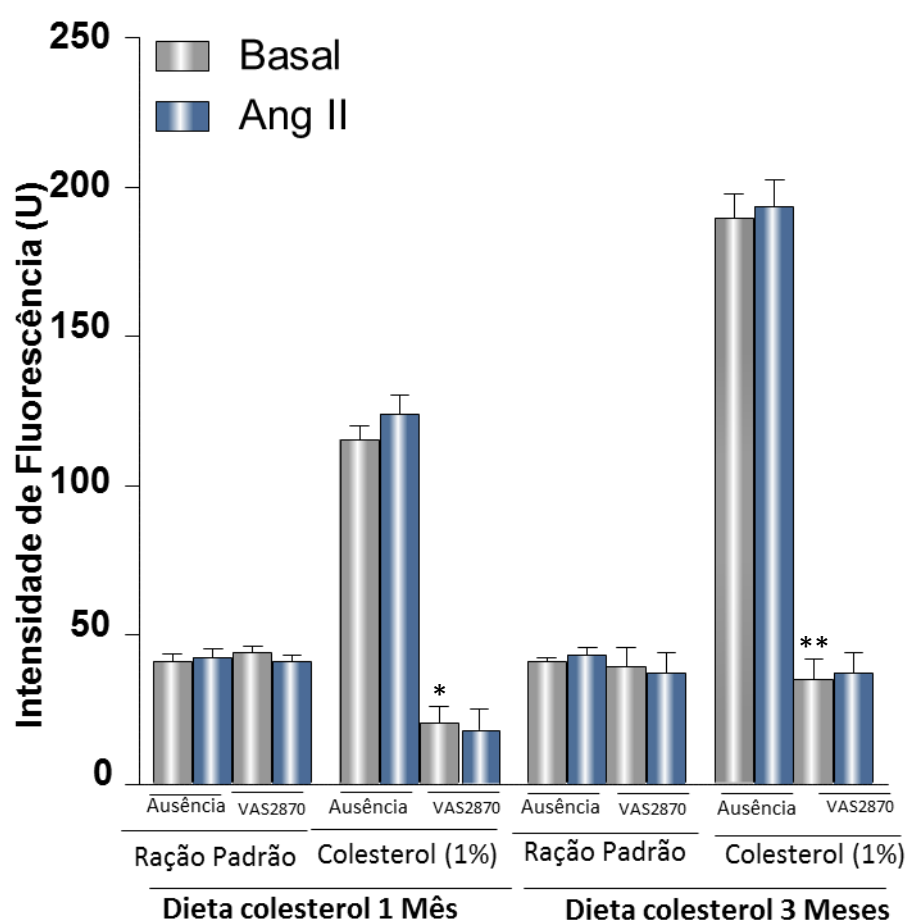


**Figura 16** - Intensidade de fluorescência emitida pelo músculo liso vascular dos anéis de aorta torácica carregados com DHE antes e após tratamento com ML171. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M (n = 6) da intensidade de fluorescência basal e final (após estímulo com Ang II) do músculo liso vascular de aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão ou com ração colesterol (1%) durante 1 mês ou 3 meses. Significativamente diferente  $p$  (< 0,05) em relação em relação à fluorescência basal de aortas torácicas de camundongos alimentados com ração colesterol (1%) 1 Mês (\*) e 3 meses (\*\*), na ausência de ML171. ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni.

#### 4.4.5.3 – Efeitos da ingestão de colesterol sobre os níveis basais e induzidos por Ang II de ROS derivados de NOX-4 em aorta torácica de camundongos

Com o objetivo de avaliar a participação de NOX - 4 na produção basal e induzida por Ang II de EROS em aorta torácica de camundongo tratado com ração colesterol (1%), os estudos de microscopia confocal com DHE foram conduzidos após tratamento dessas aortas com DHE.

O Pré-tratamento com VAS2870 (inibidor de NOX-4), reduziu as fluorescências basais do músculo liso vascular de camundongos tratados com RC durante 1 mês ( $F_0 = 20,71 \pm 5,21U$ ,  $n=6$ ) e 3 meses ( $F_0 = 35,08 \pm 6,67U$ ,  $n=6$ ), quando comparado em sua ausência. Em aorta torácica de animais tratados com ração padrão não foi observada redução da fluorescência basal na presença de VAS2870 em animais tratados durante 1 mês ( $F_0 = 44,23 \pm 1,97 U$ ,  $n = 6$ ) e 3 meses ( $F_0 = 39,34 \pm 6,65 U$ ,  $n = 6$ ) quando comparado em sua ausência (figura 17).

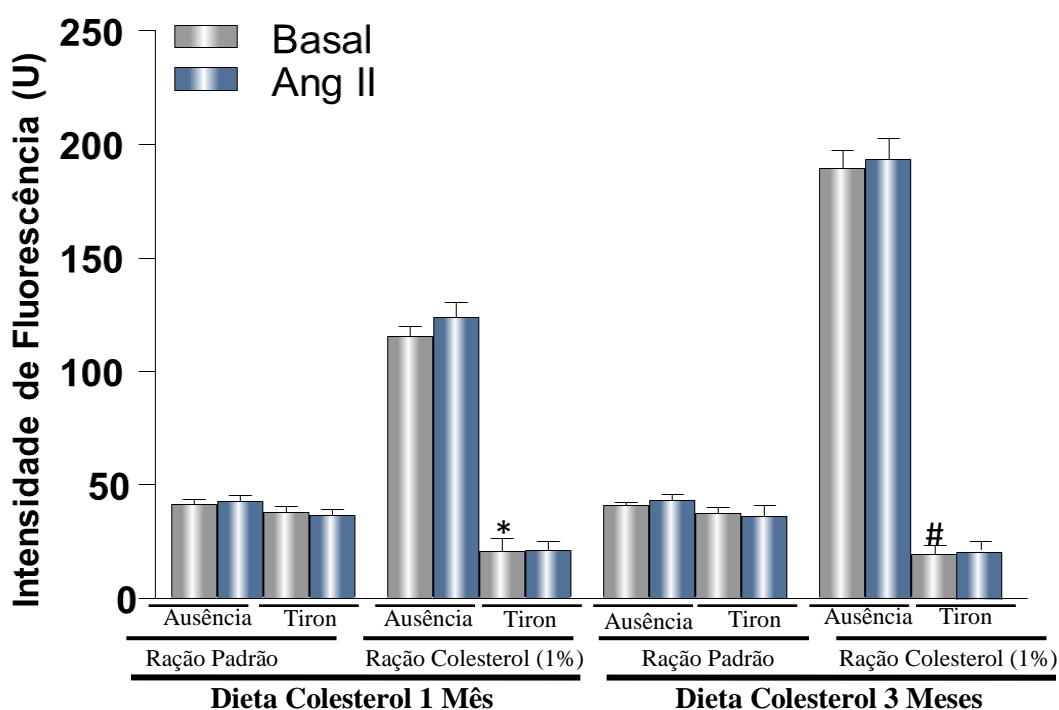


**Figura 17** - Intensidade de fluorescência emitida pelo músculo liso vascular dos anéis de aorta torácica carregados com DHE antes e após tratamento com VAS2870. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M ( $n = 6$ ) da intensidade de fluorescência basal e final (após estímulo com Ang II) do músculo liso vascular de aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão ou com ração colesterol (1%) durante 1 mês ou 3 meses. Significativamente diferente  $p < 0,05$  em relação em relação à fluorescência basal de aortas torácicas de camundongos alimentados com ração padrão 1 Mês (\*) e 3 meses (\*\*) na ausência de VAS2870. ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni.

#### 4.4.5.4 – Efeitos da ingestão de colesterol (1%) sobre os níveis basais e induzidos por Ang II de $O_2^-$ em aorta torácica de camundongos tratados com RP ou RC durante 1 mês ou 3 meses

Com o objetivo de avaliar os efeitos da ingestão de colesterol (1%) sobre os níveis basais e induzidos por Ang II de  $O_2^-$  em aorta torácica de camundongos, os estudos de microscopia confocal com DHE foram conduzidos após o pré-tratamento dessas aortas com tiron.

O pré-tratamento com tiron reduziu as fluorescências basais do músculo liso vascular em aorta torácica de animais tratados 1 mês ( $F_0 = 20,97 \pm 5,65$  U,  $n = 6$ ) e 3 meses ( $F_0 = 19,38 \pm 4,19$  U,  $n = 6$ ), quando comparado em sua ausência. Em aorta torácica de animais tratados com ração padrão não foi observada redução da fluorescência basal na presença de tiron em animais tratados 1 mês ( $F_0 = 36,56 \pm 2,69$  U,  $n = 6$ ) e 3 meses ( $F_0 = 37,43 \pm 2,67$  U,  $n = 6$ ) (figura 18).



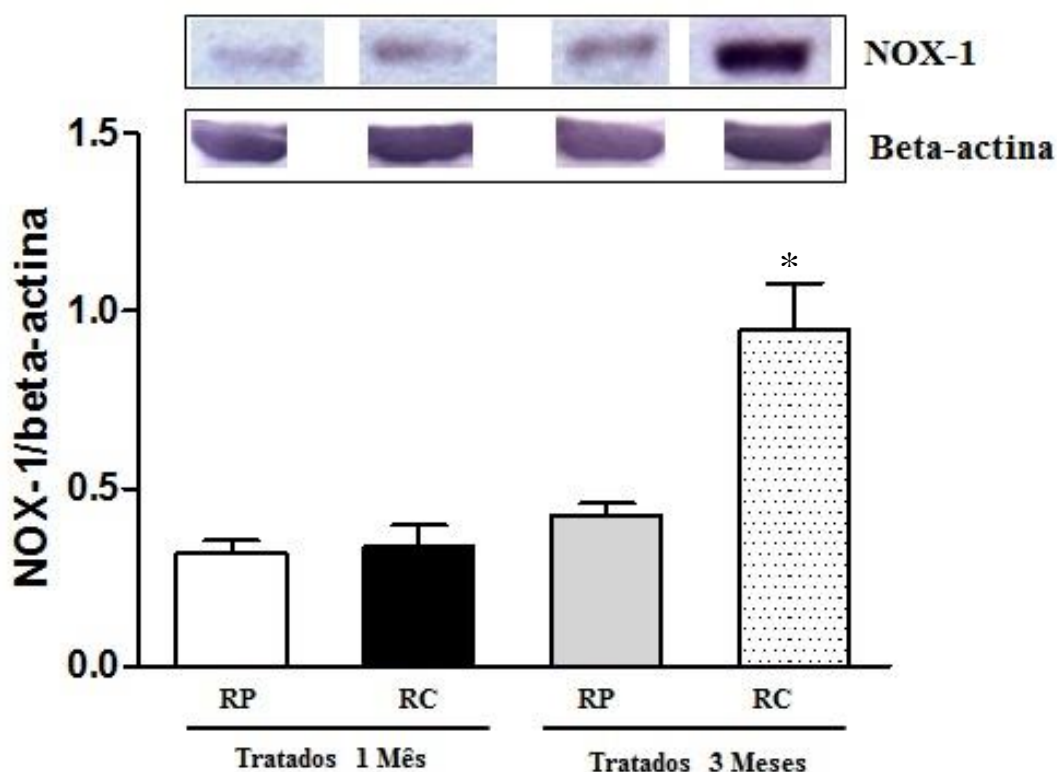
**Figura 18** - Intensidade de fluorescência emitida pelo músculo liso vascular dos anéis de aorta torácica carregados com DHE antes e após tratamento com Tiron. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M ( $n = 6$ ) da intensidade de fluorescência basal e final (após estímulo com Ang II) do músculo liso vascular de aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão ou com ração colesterol (1%) durante 1 mês ou 3 meses. Significativamente diferente  $p < 0,05$  em relação em relação à fluorescência basal de aortas torácicas de camundongos alimentados com ração padrão 1 Mês (\*) e 3 meses (#). ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni.



#### 4.4.5.5 – Expressão protéica da enzima NAD(P)H oxidase (NOX-1 e NOX-4) em aorta torácica de camundongos

Com o objetivo de avaliar o efeito da ingestão de colesterol (1%) sobre a expressão da NOX-1 e NOX-4 em aorta torácica de camundongos técnica de western blot foi utilizada para avaliar a expressão das proteínas citadas.

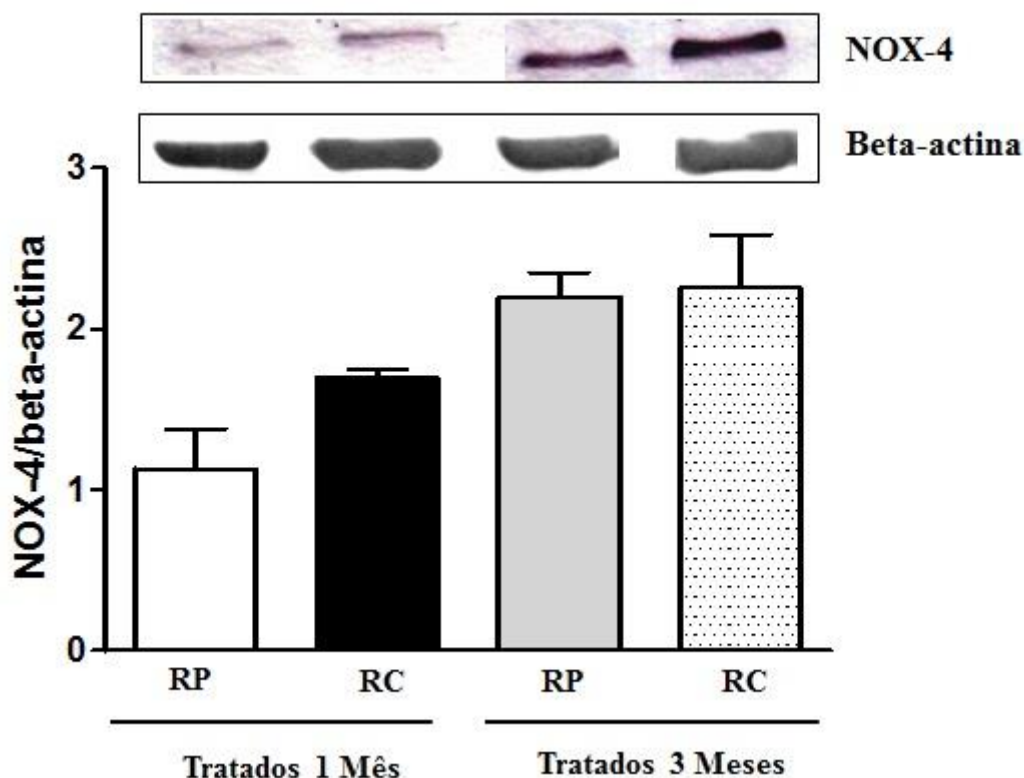
Não foi observado aumento na expressão proteica da subunidade de NOX-1 do complexo NAD(P)H oxidase em animais tratados durante 1 mês com ração colesterol (1%), quando comparado com animais tratados com ração padrão. No entanto em animais tratados com ração colesterol (1%) durante 3 meses foi observado um aumento na expressão proteica de NOX-1 quando comparado com os animais tratados com ração padrão durante o respectivo tempo (figura 19).



**Figura 19** - Expressão protéica (Western Blot) da subunidade NOX-1 (67 kDa) da enzima NAD(P)H oxidase em anéis de aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão (RP) ou ração colesterol 1 (%) durante 1 mês ou 3 meses (n = 4). Significativamente diferente p (< 0,05) em relação à expressão protéica de NOX-1 em aortas

torácicas de camundongos alimentados com ração padrão 3 meses (\*). ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni.

Não foi observado aumento de expressão da subunidade de NAD(P)H oxidase NOX-4 aorta torácica de camundongos tratados com ração colesterol (1%) quando comparado com camundongos tratados com ração padrão durante 1 mês ou 3 meses (figura 19).



**Figura 20** - Expressão protéica (Western Blot) da subunidade NOX-4 (67 kDa) da enzima NAD(P)H oxidase em anéis de aorta torácica de camundongos tratados com ração padrão (RP) ou ração colesterol 1 (%) durante 1 mês ou 3 meses (n = 4). Significativamente diferente ( $p > 0,05$ ), ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni.

### Conclusões Parciais

- A produção de  $O_2^-$  em aorta torácica de camundongos tratados com RC parece ser em partes basal
- O aparente aumento na produção basal de  $O_2^-$  em aorta torácica de camundongos é via produção por NAD(P)H oxidase NOX-1 e NOX-4.

- *O Tratamento crônico com RC é responsável especificamente pelo aumento da expressão proteica de NOX -1 em aorta torácica de camundongos*

## ***5 - DISCUSSÃO***

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da ingestão de colesterol (1%) iniciada em camundongos jovens na contração induzida por Ang II em aorta torácica, e avaliar a participação da NAD(P)H oxidase na produção de ERO.

No presente estudo utilizamos como modelo animal o camundongo C57BL/6. Essa espécie de camundongo é bastante utilizada em estudos como modelo de desenvolvimento da aterosclerose e hipercolesterolemia (SCHREYER et al., 1998; CARMELIET et al., 1998; POTTEAUX et al., 2007), embora essa espécie não apresente o desenvolvimento de placas na coronária e lesões de baixa complexidade na *vaso vasorum*. Ele é bastante útil por apresentar fácil manuseio e curto tempo de reprodução (GODFREY & REARDON, 2012).

Em nosso trabalho a dieta de colesterol (1%) não foi capaz de desenvolver alterações no perfil lipídico nem os pesos dos animais tratados durante 1 mês e 3 meses, o que corrobora com o trabalho desenvolvido por (SAVARD et al., 2013), onde camundongos C56BL/6 tratados durante 30 meses com uma dieta rica em gordura e colesterol 1% não foram capazes de alterar o perfil lipídico nem o peso dos animais em relação ao controle. Esses dados mostram que o colesterol na concentração que utilizamos não é capaz de alterar os níveis séricos de colesterol e das frações lipídica bem como peso de animais alimentados com o mesmo. Pois de acordo com JAWIEN et al (2004) para o desenvolvimento do processo dislipidêmico é necessário uma dietas rica em gordura além de colesterol, na porcentagem final de 1,25%, mais 0,5% de ácido cólico para ajudar na absorção desse colesterol. A adição do ácido cólico é necessário uma vez que, em condições normais apenas 56% do colesterol ingerido é absorvido (BOSNER et al., 1999). Outro fator que favorece o não alteração do colesterol total e suas frações nessa espécie é a ausência da enzima CETP (Proteína de transferência de ester de colesterol) (HOGARTH et al., 2003), a qual favorece o não desenvolvimento de alterações lipídicas plasmáticas devido as características do metabolismo plasmático do colesterol nessa espécie na ausência da mesma.

Não foi necessário à realização de experimentos histológicos com a coloração de Oil red para avaliação da deposição de gorduras em aorta torácica, uma vez que num trabalho realizado anteriormente por YATERA et al., (2010) demonstraram em seus resultados que camundongos tratados com colesterol numa concentração de 1.25% durante 12 semanas não apresentaram diferença no desenvolvimento de placas e deposição de gordura em aorta torácica quando comparado com o respectivo controle.

Aorta torácica de animais tratados tanto com ração padrão quanto com ração colesterol (1%) apresentam as mesmas características morfológicas e morfométricas. Observamos que

ambas apresentam uma monocamada de células endoteliais na camada íntima, seguida de três a cinco camadas de células musculares lisas na camada média, e uma camada adventícia formada por fibroblastos e tecido conjuntivo frouxo e tecidos adjacentes. Esses dados indicam que as alterações funcionais observadas em artérias de animais tratados com RC não estão relacionadas com modificações morfológicas e/ou morfométricas, uma vez que a estrutura dessas aortas é semelhante à de animais tratados com RP.

Os dados de microscopia confocal mostram um aumento basal de  $O_2^-$  em aorta torácica de camundongos, uma vez que na presença do Tiron houve uma redução da intensidade de fluorescência em animais tratados com RC quando comparado com os animais tratados com RP. Também nos dados experimentais de microscopia confocal foi observado que a produção basal de  $O_2^-$  seja em partes pelas subunidades de NAD(P)H oxidase NOX-1 e NOX-4, já que na presença dos inibidores específicos das mesmas foi observada uma redução da intensidade de fluorescência.

Esses dados sugerem que o aumento da intensidade de fluorescência observada no experimento, seja proveniente em partes pelo aumento da produção basal de  $O_2^-$  pelas subunidades de NOX-1 e NOX-4, uma vez que não foi observado aumento da intensidade de fluorescência após estímulo com  $\text{Ang II}$  em anéis de aorta torácica de animais tratados com RP e RC. No entanto devemos ter um pouco de cuidado em falar da produção de  $O_2^-$  pela NOX-4, uma vez que alguns trabalhos relatam que NOX-4 é capaz de produzir o  $O_2^-$  em ensaio de fluorescência, em quanto outros relatam que NOX-4 produz apenas  $H_2O_2$ . Além do mais, a associação do aumento de fluorescência pela produção de  $O_2^-$  por NOX-4, pode ser na verdade uma oxidação da sonda DHE mediada, chegando à conclusão que análises de microscopia de fluorescência não devem ser mais usadas utilizando como sonda DHE, e deve-se admitir que NOX-4 produz predominantemente  $H_2O_2$  (BRANDES et al., 2011; RAY et al., 2011; SCHRODER et al., 2012). Em nossos resultados de estudo de fluorescência observamos uma redução da mesma na presença do inibidor de NOX-4 mostrando uma possível participação da mesma na produção de  $O_2^-$ , no entanto devemos ter um pouco de cautela a fazer tal afirmação baseado nos experimentos realizados anteriormente em outros trabalhos.

Foi observado um aumento na expressão basal da proteína NOX-1 em aorta torácica de animais tratados durante 3 meses. Por outro lado, não foi observamos aumento na expressão da NOX-1 em aorta torácica de camundongos tratados durante 1 mês.

Em relação à subunidade NOX-4 não foi observado aumento de sua expressão em aorta torácica de camundongos tratados com RC durante 1 mês e 3 meses quando comparado com a expressão em aorta torácica de animais tratados com RP. Esses resultados sugerem um aumento basal da produção de  $O_2^-$  via NOX - 1 e NOX - 4, com consequente aumento da expressão de NOX -1 em animais submetidos ao tratamento com colesterol durante um maior tempo.

Mesmo diante dos diversos estudos envolvendo a ingestão de colesterol, avaliação formação de placas ateroscleróticas, análises das frações lipídicas (SCHREYER et al., 1998; CARMELIET et al., 1998; POTTEAUX et al., 2007), não há no limite de nosso conhecimento, trabalhos descritos na literatura descrevendo uma causa aparente para um aumento da produção basal do  $O_2^-$ , em aorta torácica de camundongos que fizeram a ingestão de colesterol antes mesmo do surgimento de alterações do colesterol total e suas frações. Sugerimos três possíveis hipóteses envolvidas nos resultados por nós obtidos até o momento: 1º - formação e alteração na constituição de colesterol nas caveolas, 2º - oxidação dos colesterolis de membrana plasmática, 3º produção de microparticulas.

A primeira hipótese para explicar o aumento da produção basal de  $O_2^-$  é que o consumo de colesterol 1% pode está levando há um aumento da concentração de colesterol na membrana plasmática o que pode influenciar na desestruturação da membrana além de modular a fluidez da mesma, o que pode alterar diretamente a sinalização celular (ANDERSON & FURUCHI, 1998). Esse aumento da concentração de colesterol na membrana plasmática é caracterizado pela formação de bolsões lipídicos evidenciados especificamente nas caveolas.

As caveolas estão presentes em diversos tipos de células, incluindo células endoteliais vasculares, adipócitos, fibroblastos, células epiteliais, mononucleares circulantes e células musculares lisas (RAZANI et al., 2002; CHIDLOW & SESSA, 2010).

São definidas como invaginações identificáveis nas membranas plasmáticas com aproximadamente 50-100 nm de tamanho. Essas invaginações podem formar vesículas no interior da célula desde a membrana até o núcleo. Essas vesículas podem ainda agrupar-se e formar pequenas estruturas no formato de cachos de uva (RANZINI et al., 2002; CHIDLOW & SESSA, 2010).

A membrana plasmática desses pequenos domínios são geralmente ricas em fosfolipídeos insaturados, colesterol e esfingolipídeos. As formas de interação entre o colesterol e os lipídeos de membrana e a concentração de colesterol desempenham um papel

importante na estrutura da caveola e afeta a atividade de proteínas ali ancoradas (BROWN & ROSE, 1992; CINEK & HOREJSI, 1992).

A importância do colesterol e a busca em elucidar as bases físicas bem aprofundar a compreensão de que forma o colesterol contribui para formação e organização das caveolas. Essas evidências indicam que o colesterol livre pode ser um dos elementos mais importantes para o controle e manutenção da membrana plasmática bem como a transmissão de informações pela ativação de algumas vias de transdução e a transcrição de fatores no núcleo. Essa ativação vai depender exclusivamente da concentração de colesterol nas bolsas lipídicas das caveolas e sua interação com a caveolina -1 (LONDON, 2002).

O aumento da concentração de colesterol e sua interação com os fosfolípidos vão reduzir a fluidez de membrana e aumentar sua rigidez, aumentando assim a capacidade de compartimentar as proteínas envolvidas na sinalização celular. Dessa forma o colesterol afeta a mobilidade de compartimentação nas caveolas dessas proteínas e dificulta a ligação dos seus ligantes afetando a capacidade do desencadeamento da sinalização bem como sua eficiência e regulação ao transcorrer da via de sinalização (SIMONS, K & TOOMRE, 2000).

Em nossos resultados podemos observar dados que sugerem uma maior atividade das subunidades de NAD(P)H oxidase NOX -1 e NOX -4 que levaria ao aumento basal da ERO. A formação de caveolas facilita à ativação dessas subunidades uma vez que, para ativação da NOX-1 é necessário a fosforilação 47phox no citoplasma e sua migração para membrana da célula para posterior ativação da NOX-1. Com as modificações estruturais nas caveolas a ativação seria facilitada, e conseqüentemente ocorria um aumento de sua atividade com aumento da produção de ERO.

A segunda hipótese seria auto-oxidação do colesterol presente na membrana plasmática com conseqüente produção de oxisteróis. Oxisteróis são produtos resultantes da auto-oxidação e/ou oxidação enzimática do colesterol, uma molécula com 27 átomos de carbono. A molécula de colesterol é formada por três regiões: uma região rica em hidrocarbonetos, uma região formada por quatro anéis de hidrocarboneto cíclicos e um grupamento hidroxilo. A oxidação da molécula pode ocorrer tanto na cadeia lateral como nos anéis cíclicos. Outro ponto de possível alvo de oxidação é a dupla ligação presente no anel B, o qual é bastante susceptível a ataques de radicais livres sendo então as posições 4, 5, 6 e 7 locais sensíveis a auto-oxidação. A auto-oxidação do colesterol leva a formação de  $7\alpha$  - e  $7SS$  - hidroxicolesterol,  $7$  - cetocolesterol (que constitui um bom marcador de auto-oxidação),  $5\alpha$ ,  $6\alpha$  - epoxicolesterol,  $5-S$ ,  $6-S-S$  - epoxicolesterol e colestano -  $3\beta$ ,  $5\alpha$ ,  $6SS$



– triol. A modificação estrutural da molécula de colesterol a partir da auto-oxidação pode levar a alterações de membranas. Essas alterações podem levar a desestabilização da membrana e conseqüente processo de apoptose (LEMAIRE-EWING et al., 2005; MASSEY, 2006; RIMNER et al., 2005).

A atividade apoptótica da célula está intimamente relacionada com a formação de alguns oxisteróis entre eles: 7 $\beta$  - hidroxicoesterol , 7 - ceto - colesterol , e 5 $\beta$  , 6 $\beta$  - epoxicoesterol são os mais citotóxicos, enquanto os isômeros 25- hidroxicoesterol possui menor toxicidade. Na morte celular de macrófagos ocorre o acúmulo de colesterol dentro das membranas do retículo endoplasmático, diminuindo a fluidez de membrana, diminuindo a atividade de algumas proteínas de membrana (LI et al., 2004).

Estudos demonstraram que o 7 - ceto -colesterol presentes em bolsões lipídicos das caveolas e a membrana plasmática, pode modular a função de proteínas ali presentes, além de interagir com a caveolina 1. A modificação do microdomínio presente nas caveolas pelos oxisteróis pode alterar a homeostase da membrana e contribuir para os efeitos citotóxicos e sua atividade apoptótica (BERTHIER et al., 2004).

As perturbações que ocorrem na membrana do retículo endoplasmático em função das respostas das proteínas ali presentes, provocam um estresse em outras vias o qual podem levar ao desencadeamento do processo de apoptose. O 7 - cetocolesterol e o 7 $\beta$ - hidroxicoesterol e 25 - hidroxicoesterol podem induzir o desdobramento da proteína NAD(P)H oxidase em células do músculo liso e induzir a apoptose, sendo então que o processo apoptótico que ocorre em células do músculo liso pode ser mediada pelas propriedades biofísicas alteradas na membrana plasmática do retículo endoplasmático (PEDRUZZI et al., 2004; TABAS, 2004). PEDRUZZI, 2004 e colaboradores mostram que o 7-cetocolesterol induz um aumento estresse oxidativo com conseqüente evento apoptótico em células musculares de aorta humana. O aumento do estresse oxidativo deve-se principalmente pelo aumento da produção de ERO via ativação da NOX-4, mostrando que a mesma desempenha um papel fundamental na morte celular de células do músculo liso induzida por oxisteróis.

A terceira hipótese seria um aumento na formação de micropartículas nos animais tratados com RC. As micropartículas circulantes podem promover um aumento do estresse oxidativo através da produção de ERO. No entanto mecanismos celulares de sua formação não são muito claros. BURGER et al.; 2011 demonstram o envolvimento direto da Ang II sobre a produção de micropartículas. Eles demonstram que a ativação de AT<sub>1</sub> por Ang II na produção de micropartículas endoteliais mediado por ROS e ativação da NAD(P)H oxidase

posicionados em bolsas lipídicas, essas micropartículas endoteliais pode levar a lesão do próprio tecido endotélio por um sistema de retroalimentação. BUSCEMI et al., 2008, demonstraram que pessoas que fizeram a ingestão de uma dieta rica em gordura e colesterol, mesmo em condições onde não houve alteração no perfil lipídico, tiveram um processo de disfunção endotelial e que, possivelmente essa disfunção poderia ser por conta da produção de micropartículas.

Normalmente nas dietas de hipercolesterolemia há um aumento da produção de ânion superóxido (TAKATA et al., 2013; STOKES et al., 2001). No presente estudo evidenciamos que animais tratados com uma alta concentração de colesterol não apresentam alteração dislipidêmica, no entanto houve um aumento na produção de ERO.

No presente estudo o tratamento com colesterol em animais jovens durante 1 e 3 meses promoveu um aumento responsividade à Ang II, em aorta torácica de camundongos com (E+) ou (E-). Vários fatores poderiam estar relacionados a este fato: aumento da expressão de receptores AT<sub>1</sub> e/ou produção/ ativação ou transcrição de fatores constritores por ativação desses receptores. Nos nosso estudo funcional avaliamos o efeito máximo (*E<sub>max</sub>*) e também a Potência (*pD<sub>2</sub>*) do agonista frente ao tratamento dos camundongos com RC.

Diferentes fatores podem influenciar o efeito máximo (*E<sub>max</sub>*) do agonista, entre eles: fatores de pré-interação que afetam a disponibilidade de agonista no compartimento do receptor, fatores de interação que afetam a eficácia intrínseca do agonista, e fatores pós-interação que afetam a eficácia de transdução do sinal deflagrado pela ativação do receptor. Já alterações de potencia sugerem alterações de eficácia e/ou afinidade do agonista pelo receptor. As alterações de *E<sub>max</sub>* foram observadas em nossos experimentos, no entanto, não houve alteração de *pD<sub>2</sub>* (KENAKIN, 2009).

Como já mencionado o colesterol pode alterar a estrutura das membranas plasmáticas através de sua interação com outros lipídeos ali presentes. Essas interações podem influenciar na conformação dessa membrana plasmática através de alterações de suas propriedades físico-químicas, além de interações moleculares e a combinação das duas. Através do aumento do colesterol de membrana nos bolsões lipídicos ocorre redução da fluidez de membrana com consequente aumento de sua rigidez (MOURITSEN & ZUCKERMANN, 2004). Dessa forma os domínios enriquecidos com colesterol possuem a capacidade de compartimentar proteínas de membranas envolvidas em sinalizações específicas. Ao regular essa mobilidade lateral das membranas plasmáticas o colesterol afeta a capacidade de interação dos receptores com as proteínas responsáveis pela sinalização celular,

facilitando a interação entre a relação espaço e tempo aumentado à eficiência da sinalização e regulação do tráfico de receptores entre regiões (SIMONS & TOOMRE, 2000).

As alterações ocasionadas pelo colesterol nas membranas plasmáticas contribuem para mudanças na conformação de receptores acoplados a proteína G (RAPG), no qual o colesterol desempenha um papel de estabilização de conformação (SCHERTLER & HARGRAVE, 2000; ALBERT & BOESZE – BATTAGLIA, 2005). As modificações ocorridas nos RAPG podem influenciar na interação do agonista pelo receptor e conseqüentemente na sinalização celular. O teor de colesterol de membrana plasmática pode influenciar na afinidade do agonista pelo receptor devido à dificuldade de uma pré-interação com o receptor e ativação da via de sinalização (POLITOWSKA et al., 2001)

Essa dificuldade de interação se deve pela compartimentalização desses receptores nas caveolas o que dificulta o processo de interação e ativação da via de sinalização. No entanto alguns dados são bastante contraditórios, já que em alguns tipos de receptores o teor de colesterol na membrana plasmática nesses domínios pode facilitar a ativação da via de sinalização via modificação da conformação da proteína de membrana, ou até mesmo pela interação com proteínas no citoplasma que participam da via de sinalização (RENNER et al., 2007).

Como não foram observadas alterações de  $pD_2$  em nosso trabalho, provavelmente a hiper-reatividade observada para Ang II deve-se apenas a alterações decorrentes na via de transdução que somados levaram há um aumento do *E<sub>max</sub>* para Ang II em aorta torácica de camundongos. Provavelmente esses fatores derivados da via de transdução estão influenciando exclusivamente a eficácia da Ang II pelo aumento basal de  $O_2^-$ , sem nenhuma alteração em sua afinidade pelo receptor.

Em animais tratados com RC durante 1 mês ou 3 meses. Dentre os fatores constritores já descritos na literatura que poderia estar relacionado com a hiper-reatividade contrátil da Ang II em aorta torácica de camundongos C57BL/6 é o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) (WANG et al., 2001). Nossos dados mostram que houve um aumento do *E<sub>max</sub>* para Ang II em aorta torácica de camundongos tratados com RC. Trabalhos anteriores já descreviam a hiper-reatividade da Ang II em aorta de animais hipercolesterolêmicos tratados com uma dieta rica em colesterol (YANG et al., 1998). Os dados obtidos no presente trabalho mostram que a RC promoveu uma hiper-reatividade da Ang II em aorta torácica de camundongos. No entanto o perfil lipídico se manteve inalterado quando comparado com o controle. Nossos resultados apoiam a hipótese de alguns dados epidemiológicos de que ingestão de colesterol

está associada com o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, independentemente do nível aumentado do perfil lipídico (MC GEE et al., 1984; SHEKELLE et al., 1981; STAMLER & SHEKELLER, 1988).

O aumento do *E<sub>max</sub>* observado de Ang II em aorta torácica de camundongos jovens tratados com RC está relacionado com a capacidade do agonista gera uma resposta. Alguns fatores podem influenciar a eficácia do agonista, como o aumento no número de receptores e/ou ativação de determinada via de transdução. Em nosso trabalho o aumento observado do *E<sub>max</sub>* para Ang II em aorta torácica de camundongos tratados com RC, deve-se quase que exclusivamente por alterações na via de transdução, pelo aumento da produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> basal via NAD(P)H oxidase que na presença de inibidores de subunidades voltaram ao nível do *E<sub>max</sub>* obtidos para Ang II em aorta torácica de animais tratados com RP, mostrando assim que este aumento é devido à produção de ERO, favoreceu o aumento da amplificação de sinal (KENAKIN, 2009). A amplificação do sinal via produção basal de O<sub>2</sub><sup>-</sup> observada somada a produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> via ativação de receptores AT<sub>1</sub> foram responsáveis pelo aumento do *E<sub>max</sub>* da Ang II em aorta torácica de camundongos tratados com RC.

A NADPH oxidase constitui a principal fonte enzimática de geração de ERO em células do sistema vascular, justificando sua importância no processo de disfunção endotelial. Tanto NOX - 1 quanto NOX - 4 estão presentes nas células endoteliais e células do músculo liso vascular. (BEDARDE & KRAUSE, 2007), corroborando com nossos resultados que evidencia um aumento da hiper-reatividade à Ang II em aorta torácica decorrente de metabólitos derivados de NOX - 1 e NOX - 4, sendo predominantemente no músculo liso vascular, uma vez que em aorta torácica de camundongos tratados 1 mês e 3 meses na ausência de endotélio mantinham o mesmo grau de resposta para anéis com endotélio.

No entanto é necessário um pouco de cuidado quando falar da seletividade dos inibidores das subunidades de NOX - 1 e NOX - 4 já que os compostos disponíveis no mercado não são totalmente seletivos para apenas uma subunidade.

Os valores de IC<sub>50</sub> para o inibidor de NOX - 4 VAS2870 foram determinadas através de ensaios realizados em diferentes tecidos apenas para NOX-2, mas também foi demonstrado que o VAS2870 inibe a subunidade NOX-5. O composto VAS2870 não interfere com a translocação de p47phox mostrando o mesmo interage com outras subunidades catalíticas de NOX-1, mostrando que o VAS2870 possui uma ligação específica para NOX-1 em uma concentração acima de 10µM. Já o inibidor de NOX-1 (ML171) em ensaios anteriores se mostrou como um potente inibidor de NOX-1 mostrando uma IC<sub>50</sub> de 130-250nm, e de 3-

5 $\mu$ M para NOX-2, bem como para xantina oxidase. Também foi demonstrado que o composto ML171 possui a capacidade de inibir receptores adrenérgicos (SCHMIDT et al., 2014).

Dessa forma é necessário cautela quanto a análises dos dados apenas sugerindo possíveis inibições pelos compostos citados já que os mesmos não apresentam seletividade pelas mesmas. Esse fato entra de encontro com nossos dados já que o VAS2870 também inibe a subunidade de NOX-1 o que pode ter influenciado nas análises de reatividade vascular e nas análises basais na produção de O $_2^-$ , observados nas análises de fluorescência e de reatividade vascular na presença de ML171 ou VAS2870. Talvez a resposta obtida pelos experimentos os quais tinham o VAS2870 presente, pode estar inibindo a NOX-1 influenciando nos resultados que seria decorrente exclusivamente de NOX-1.

Já era bem descrito a participação da NADPH oxidase em outras doenças como hipertensão, obesidade, e até mesmo em animais com altos níveis lipídicos, no entanto nunca antes foi descrito a participação de metabólitos derivados da NADPH oxidase em animais submetidos a uma dieta rica em colesterol, com nenhuma alteração do colesterol total e suas sub-frações quando comparado com o controle. Um dos principais metabólitos da NAD(P)H é o O $_2^-$ , que em altas concentrações diminui a quantidade de NO disponível levando a um processo de disfunção endotelial (NGUYEN e TOUYZ, 2011).

Nossos resultados demonstram que o aumento da hiper-reatividade da Ang II se deve em parte pelo aumento da produção de O $_2^-$  em aorta torácica de animais tratados RC. Na presença do tiron em células com endotélio a hiper-reatividade de Ang II com 1 ou 3 meses de tratamento tiveram sua contração reduzida, quando foi removido o endotélio essa redução se manteve mostrando que essa hiper-reatividade contrátil é independente do endotélio. Em níveis basais as ERO são produzidas em baixas concentrações exercendo uma função importante como moléculas sinalizadoras na manutenção do tônus de Células do músculo liso vascular (CMLV) (GRIENGLING et al., 2000; RAJAGOPALAN et al., 1996). No entanto em condições de doenças vasculares como aterosclerose e hipertensão há um excesso na geração de ERO o que leva a uma disfunção endotelial levando ao um aumento da contração.

Em nossos resultados foi observado um aumento basal da produção de O $_2^-$ , mostrando que a ativação dos receptores AT $_1$  por Ang II pouco contribui para exacerbação da resposta contrátil à Ang II. Possivelmente a exacerbação da contração à Ang II observada em aorta torácica de camundongos deve-se quase que exclusivamente pela produção basal de O $_2^-$  em parte por NOX -1 e NOX -4 via as hipóteses levantadas no presente trabalho. Dessa forma a ligação da Ang II ao receptor AT $_1$  desencadearia a ativação da via de transdução a qual

somada com ERO basal aumentado, exacerbaria a resposta de contração da Ang II em aorta torácica de animais tratados com RC.

A principal contribuição do presente estudo é que mostramos pela primeira vez, no limite de nossos conhecimentos, que o alto consumo de colesterol iniciado em idade jovem pode levar ao aumento da produção de ERO, antes mesmo de alterações na concentração plasmática do colesterol total e suas sub-frações. Já no primeiro mês de tratamento com colesterol na concentração de 1% observamos um aumento da produção de  $O_2^-$  que levou ao aumento vascular à Ang II dos principais fatores que contribui para o desenvolvimento futuro de doenças cardiovasculares. Esses dados servem de alerta para o alto consumo de colesterol iniciado na infância, mesmo quando em exames de rotina esses indivíduos não apresentam alterações no lipidograma, já que maior parte da população ultrapassa os valores diários recomendados no consumo de colesterol.

Nesse contexto há necessidade do desenvolvimento de novos marcadores biológicos que sejam capazes de identificar alterações no sistema vascular antes mesmo de alterações no perfil lipídico, quando da ingestão de dietas ricas em colesterol. As hipóteses levantadas nesse trabalho como aumento na produção de oxisteróis e micropartículas podem servir como possíveis alvos de estudos para o desenvolvimento de novos marcadores, no diagnóstico precoce de alterações vasculares decorrentes do consumo excessivo de colesterol.

## ***6 - CONCLUSÕES***

- A ingestão de Colesterol (1%) não foi capaz de alterar o peso dos animais e o perfil lipídico plasmático.
- O tratamento com colesterol (1%) não alterou a concentração plasmática das enzimas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT), sugerindo que a dieta não mostrou hepatotoxicidade
- A ingestão de Colesterol (1%) aumentou a hiper-reatividade contrátil da Ang II em aorta torácica é independente de endotélio, que em partes é mediada pelo ânion superóxido.
- A hiper-reatividade contrátil da Ang II frente ao tratamento é decorrente quase que exclusivamente pelo aumento da produção basal de  $O_2^-$ .
- O aumento da produção basal de  $O_2^-$  deve-se pela possível ativação de NOX-1 e NOX-4 via hipóteses levantadas: alteração nos bolsões lipídicos da caveola, formação de oxisteróis e formação de micropartícula.
- O aumento da expressão proteica de NOX-1 em 3 meses de tratamento, possivelmente deve-se ao estágio crônico de tratamento responsável pelo aumento de  $O_2^-$  basal, o qual ativa fatores de transcrição responsáveis pelo aumento da expressão proteica de NOX-1.
- A participação de NOX-4 na produção de  $O_2^-$  basal, não é muito clara. Vários interferentes podem influenciar nos resultados por nós alcançados no presente trabalho. É possível que as alterações observadas nas análises de funcionalidade e basais sejam decorrentes apenas da NOX-1, uma vez que vários interferentes podem influenciar as análises relacionadas à NOX-4.



## ***7 -REFERÊNCIAS***

## REFERÊNCIAS

AGO T.; KITAZONO, T.; OOBOSHI, H.; IYAMA, T.; HAN, Y. H.; TAKADA, J.; WAKISAKA, M.; IBAYASHI, S.; UTSUMI, H.; IIDA, M. Nox4 as the Major Catalytic Component of an Endothelial NAD(P)H Oxidase, *Circulation* :109:227-233, 2004.

ALBERT, A. D.; BOESZE-BATTAGLIA, K. The role of cholesterol in rod outer segment membranes. *Prog Lipid Res*, 44: 99-124, 2005.

ALTENHOFER, S.; RADERMACHER, K. A.; KLEIKERS, P. W. M.; WINGLER, K.; HARALD, H. H. W. Evolution of NADPH oxidase inhibitors: Selectivity and Mechanisms for target engagement. *Antioxidants & Redox signaling*, 2014 DOI: 10.1089/2013.5814.

ANDERSON, R. G. W.; FURUCHI, T. Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 21099-21104, 1998.

BARONA, J.; FERNANDEZ M. L. Dietary cholesterol affects plasma lipid levels, the intravascular processing of lipoproteins and reserve cholesterol transport without increasing the risk for heart disease. *Nutrients*. 4: 1015-1025, 2012.

BEDARDE, K.; KRAUSE K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidase: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*.87:1, 245-313, 2007.

BERTHIER, A.; LEMAIRE-EWING, S.; PRUNET, C.; MONIER, S.; ATHIAS, A.; BESSEDE, G.; PAIS DE BARROS, J. P.; LAUBRIET, A.; GAMBERT, P.; LIZARD, G.; NEEL, D. Involvement of a calcium-dependent dephosphorylation of BAD associated with the localization of Trpc-1 within lipid rafts in 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis. *Cell Death Differ*. 11, 897–905, 2004.

BOSNER, M. S.; LANGE, L. G.; STENSON, W. F.; OSTLUND, R. E. Jr. . Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res*. 40:302-8, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.

BRANDES, R. P.; TAKAC, I.; SCHRODER, K. No superoxide – No stress?: Nox4, the good NADPH Oxidase!. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 31: 1255 – 1257, 2011.

BROWN, D.; ROSE, J. K. Sorting of GPI-Anchored proteins to glycolipid enriched membrane. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 14: 111-136, 1992.

BURGER, D.; MONTEZANO, A. C.; NISHIGAKI, N.; HE, Y.; CARTER, A.; M. TOUYZ, R. M. Endothelial Microparticle Formation by Angiotensin II Is Mediated via Ang II Receptor Type I/NADPH Oxidase/ Rho Kinase Pathways Targeted to Lipid Rafts. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 31:1898-1907, 2011.

BUSCEMI, S.; MANIACI, V.; BARILE, A. M.; ROSAFIO, G.; MATTINA, A.; CANINO, B.; VERGA, S.; RINI, G. B. Endothelial function and other biomarkers of cardiovascular risk in frequent consumers of street food. **Clinical Nutrition** 31: 934-939, 2012.

CARMELIET, P.; MOONS, L.; COLLEN, D. Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis, **Cardiovascular Research** 39: 8–33, 1998.

CHILDLOW, J. H. J.; SESSA, W. C. Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of signaling and inflammation. **Cardiovasc Res**, 86: 219-225, 2010.

CINEK, T.; HOREJSI, V. The nature of large noncovalent complexes containing glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases. **J immunol**, 149: 2262 -2270, 1992.

CONNOR S. L.; GUSTAFSON, J. R.; ARTUAD-WILD, S. M.; FLAVELL, D. P.; CLASSICK-KOHN, C. J.; HATCHER, L. F. The cholesterol/saturated-fat index: an indication of the hypercholesterolaemic and atherogenic potential of food. **Lancet**, 1: 1229-1232, 1986.

DATASUS, Rede interagencial de informações para a saúde (RIPSA). Óbitos para doenças do aparelho circulatório, Brasil, 2010. Acesso em 20 de maio de 2013:

D GIANNI, N. N, H ZHANG, C DER MARDIROSSIAN, J KISTER, L MARTINEZ, J FERGUSON, WR ROUSH, SJ BROWN, GM BOKOCH, P HODDER, AND H ROSEN. Optimization and Characterization of an Inhibitor for NADPH Oxidase 1 (NOX-1). **Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program** [Internet], 2013.

DAUGHERTY, A.; RATERI, D. L.; LU, H.; INAGAMI, T.; CASSIS, L. A. Hypercholesterolemia Stimulates Angiotensin Peptide Synthesis and Contributes to Atherosclerosis Through the AT<sub>1</sub>A Receptor. **Circulation**, 110:3849-3857, 2004.

ELLMARK, S. H. M.; DUSTING, G. J.; FUI, M. N. T.; GUZZO-PERNELL, G.; DRUMMOND, G. R. The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. **Cardiovascular Research**, 65: 495–504, 2005.

FERNANDEZ, M. L. Effects of eggs on plasma lipoproteins in healthy populations. **Food Funct.** 1: 156–160, 2010.

FERNANDES V. P. I.; DE FARIA E. C.; BELLOMO-BRANDÃO, M. A.; NOGUEIRA, R. Mal nutrition Causing Neonatal Dyslipidemia. **J.Nutr. Clin. Pract**, 26: 440-444, 2011.

GARRIDO, A. M.; GRIENGLING, K. K. NADPH oxidases and Ang II receptor signaling. **Mol Cell Endocrinol**, 302: 148-158, 2009.

GIULIANO I. C. B.; CARAMELLI, B. Dislipidemias na infância e na adolescência. **Pediatria**; 29: 275-285, 2008.

GODFREY S. GETZ, G. S.; REARDON, C. A. Animal Models of Atherosclerosis **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 32: 1104 – 1115, 2012.

GRANGER, D. N.; KVIETYS, P. R. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation, **Free Radic Biol Med**, 52: 556-592, 2012.

GRIENGLING, K. K.; MINIERI C. A.; OLLERENSHAW J. D.; ALEXANDER R. W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular muscle smooth vascular cells. **Circulation Research**, 74: 1141 – 1148, 1994.

GRIENGLING, K. K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ Res**, 5: 594-501, 2000.

HILENSKI, L. L.; CLEMPUS, R. E.; QUINN, M. T.; LAMBETH, J. D.; GRIENGLING, K. K. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 24: 677-683, 2004.

HOGARTH, C. A.; ROY, A.; EBERT, D. L. Genomic evidence for the absence of a functional cholesteryl ester transfer protein gene in mice and rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, 135: 71–81, 2003.

JAWIEN, J.; NASTALEK, KORBUS, P. R.; MOUSE Models of experimental atherosclerosis. **Journal of Physiology and Pharmacology**. 55: 503 – 517, 2004.

KRAUSE, K. H.; BEDARD, K. The NOX Family of ROS-Generating NADPH oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev*, 87: 245-313, 2007.

KENAKIN, TP. Agonists: the measurement of affinity and efficacy in functional assays. In: KENAKIN, TP (Ed). **A pharmacology primer: theory, applications, and methods**. Burlington, MA, USA: Elsevier Academic Press, 81-100, 2009.

LASSEGUE, B.; MARTIN, A. S.; GRIENGLING, K. K. Biochemistry, physiology and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res*. 110: 1364-1390, 2012.

LASSEGUE, B.; CLEMPUS, R. E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression., and regulation. *Am J Physiol*, 285: R277-R297, 2003.

LEMAIRE-EWING S, PRUNET C, MONTANGE T, et al. Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biol Toxicol* 2005; 21:97–114.

LICHENSTEIN A. H.; APPEL, L. J.; BRANDS M.; CARNETHON, M. Diet and Lifestyle recommendations Revision 2006, A scientific statement from the American Heart Association Scientific Committee *Circulation*, 114: 82–96, 2006.

LI, J. M.; GALL, N. P.; GRIEVE, D. J.; CHEN, M.; SHAH A. M. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension*, 40: 477-484, 2002.

LI, Y.; GE, M.; CIANI, L, et al. Enrichment of endoplasmic reticulum with cholesterol inhibits sarcoplasmic-endoplasmic reticulum calcium ATPase-2b activity in parallel with increased order of membrane lipids: implications for depletion of endoplasmic reticulum calcium stores and apoptosis in cholesterol-loaded macrophages. *J Biol Chem*, 279: 37030 – 37039, 2004.

LONDON, E. Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. *Current Opinion in Structural Biology*, 12: 480-486, 2002.

MANDUTEANU, I; SIMIONESCU, M. Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders?. *J. Cell. Mol. Med*, 16: 1978-1990, 2012.

MARTÍNEZ, M.C.; TESSE A.; ZOB AIR, I.; F.; ANDRIATSITOHAINA R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 288: H1004–H1009, 2005.

MARTINEZ-REVELLES, S.; AVENDAÑO, M. S.; GARCIA-REDONDO, A. B.; YOLANDA ALVAREZ, Y.; AGUADO, A.; PÉREZ-GIRÓ J. V.; GARCIA-REDONDO, L.; ESTEBAN, V.; JUAN M. REDONDO, J. M.; MARIA J. ALONSO, M. J.; BRIONES, A. M.; MERCEDES SALAICES, M. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. **Antioxidants & Redox Signaling** 18: 51 - 65, 2013.

MASSEY, J. B. Membrane and protein interactions of oxysterols, **Current Opinion in Lipidology**, 17:296– 301, 2006.

MC GEE, D. L.; REED, D. M.; YANO, K.; KAGAN, A.; TILLOTSON, J. Ten-year incidence of coronary heart disease in the Honolulu Heart Program. **Am J Epidemiol** 119: 667–676, 1984.

MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. **World Health Organization**, Geneva, 2011.

MINIHANE, A. M; HARLAND, J. I. Impact of Oil used by the Frying Industry on Population Fat Intake. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 47:287–297 2007.

MOURITSEN, O. G.; ZUCKEMANN, M. J. What's so special about cholesterol?. **Lipids**, 39: 1101-1113, 2004.

NGUYEN D. C. A.; TOUYZ R. M. Cell signaling of angiotensin II on vascular tone: novel mechanism. **Curr. Hypertens. Rep.** 13: 122-128, 2011.

NICKENIG, G. Central role of the AT<sub>1</sub>-receptor in atherosclerosis. **Journal of Human Hypertension** 16: S26–S33, 2002.

NICKENIG, G.; SACHINIDIS, A.; MICHAELSEN, F.; BÖHM, M.; SEEWALD, S.; VETTER, H. Upregulation of vascular angiotensin II receptor gene expression by low-density lipoprotein in vascular smooth muscle cells. **Circulation**. 95:473–478, 1997.

PEDRUZZI, E.; GUICHARD, C.; OLLIVIER, V.; DRISS, F.; FAY, M.; PRUNET, C.; JEAN-CLAUDE MARIE, J. C.; POUZET, C.; SAMADI, M.; ELBIM, C.; O'DOWD, Y.; BENS, M.; VANDEWALLE, A.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A.; LIZARD, G.; OGIER-DENIS, E. NAD(P)H Oxidase Nox-4 Mediates 7-Ketocholesterol-Induced Endoplasmic Aortic Smooth Muscle Cells Reticulum Stress and Apoptosis in Human. **Mol. Cell. Biol**, 10703 – 10717, 2004.

POLITOWSKA, E.; KAZMIERKIEWICZ, R.; WIEGAND, V.; FAHRENHOLZ, F.; CIARKOWSKI, J. Molecular modeling study of the role of cholesterol in the stimulation of the oxytocin receptor. **Acta Biochim Pol**, 48: 83-93, 2001.

POTTEAUX, S.; AIT-OUFELLA, H.; MALLAT, Z. Mouse models of atherosclerosis, **Drug Discovery Today: Disease Models**, 4: 165–170, 2007.

RAJAGOPALAN, S.; KURZ, S.; MUNZE, T.; TARPEY, M.; FREEMAN, B. A.; GRIENDLING, K. K. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. **The Journal Clinical Investigation** 97: 1916-1923, 1996.

RAY, R.; MURDOCH, C. E.; WANG, M.; SANTOS, C. X.; ZHANG, M.; ALOM-RUIZ, S. ANILKUMAR, N.; OUATTARA, A.; CAVE, A. C.; WALKER, S. J.; GRIEVE, D. J.; CHARLES, R. L.; EATON, P.; BREWER, A. C.; SHAH, A. M. Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo. **Arterioscler thromb vasc biol**, 31: 1255-1257, 2011.

RAZANI, B.; WOODMAN, S. E.; LISANTI, M. P. Caveolae: From cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev*, 54: 431-467, 2002.

RENNER, U.; GLEBOV, K.; LANG, T.; PAPUSHEVA, E.; BALAKRISHANAN, S.; KELLER, B. RICHTER, D. W.; JAHN, R.; PONIMASKIN, E. Localization of the mouse 5-hydroxytryptamine 1A receptor in lipid microdomains depends on its palmitoylation and is involved in receptor mediated signaling. **Molecular Pharmacology**, 72: 502-513, 2007.

RIDKER, P. M.; DANIELSON, E.; FONSECA, F. A. H.; GENEST, J.; GOTTO, A. M. JR.; KASTELEIN, J. J.; KOING, W.; LIBBY, P.; LORENZATTI, A. J.; MACFADYEN, J. G.; NORDESTGAARD, B. G.; SHEPHERD, J.; WILLERSON, J. T.; GLYNN, R. J. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. **N. Engl. J. Med.**, v. 29, n. 21; p. 2195-2207, 2008.

RIMNER, A.; AL MAKDESSI, S.; SWEIDAN, H. Relevance and mechanism of oxysterol stereospecificity in coronary artery disease. **Free Radic Biol Med**, 38:535– 544, 2005.

SANTOS, R. D.; GANGLIARDI, A. C. M.; XAVIER, H. T.; MAGNONI, C. D.; CASSANI, R.; LOTTENBERG, A. M. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**, 100:1-40, 2013.

SAVARD, C.; TARTAGLIONE, E. V.; KUVER, R.; HAIGH, W. G.; FARRELL, G. C.; SUBRAMANIAN, S.; CHAIT, A.; YEH, M. M.; QUINN, L. S.; IOANNOU, G. N. Synergistic Interaction of Dietary Cholesterol and Dietary Fat in Inducing Experimental Steatohepatitis. **Hepatology**, 57:81-92, 2013.

SAVOIA, C & VOLPE, M. Angiotensin receptor modulation and cardiovascular remodeling. **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, 12: 381-384, 2011.

SCHERTLER, G. F. HARGRAVE, P. A. Preparation and analysis of two-dimensional crystals of rhodopsin. **Methods Enzymol**, 315: 91-107, 2000.

SCHREYER S. A.; WILSON D. L.; LEBOEUF R. C. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis, **Atherosclerosis**.136:17-24, 1998.

SCHRODER, K. Isoform specific functions of Nox protein-derived reactive oxygen species in the vasculature. **Current Opinion in Pharmacology**, 10:122–126, 2010.

SCHRODER, K.; ZHANG, M.; BENKHOFF, S.; MIETH, A., PLIQUETT, R.; KOSOWSKI, J.; KRUSE, C.; LUEDIKE, P.; MICHAELIS, U. R.; WEISSMANN, N.; DIMMELER, S.; SHAH, A. M.; BRANDES, R. P. Nox 4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. **Cir. Res.** 110: 1217-1225, 2012.

SESHIAN, P. N.; WEBER, D. S.; ROCIC, P.; VALPPU, L.; TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K. K. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. **Circ Res.** 91: 406-413, 2002.

SHEKELLE, R. B.; SHRYOCK A. M.; Paul O, et al. Diet, serum cholesterol and death from CHD – The Western Electric Study. **N Engl J Med**, 304: 65–70, 1981.

SIMONS, K.; TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 1: 31-39, 2000.

SMITH, S. C.; JACKSON, R.; PEARSON, T. A; et al. Principles for national and regional guidelines on cardiovascular disease prevention: a scientific statement from the World Heart and Stroke Forum. **Circulation**, 109: 3112-21, 2004.

STAMLER J. S.; SHEKELLER. B. Dietary cholesterol and human coronary heart disease. **Arch Pathol Lab Med**, 112: 1032–1040, 1988.



STENMAN, E.; EDVINSSON, L. Cerebral Ischemia Enhances Vascular Angiotensin AT<sub>1</sub> Receptor-Mediated Contraction in Rats. **Stroke**, 35: 970-974, 2004.

STEPP, D. V.; OU, J.; ACKERMAN, A. W.; WELAK, S.; KLICK D.; PRITCHARD JR, K. A. Native LDL and minimally oxidized LDL differentially regulate superoxide anion in vascular endothelium in situ. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 283: H750–H759, 2002.

STOKES, K. Y.; CLANTON, E. C.; RUSSELL, J. M.; ROSS, C. R.; GRANGER, D. N. NAD(P)H Oxidase–Derived Superoxide Mediates Hypercholesterolemia-Induced Leukocyte–Endothelial Cell Adhesion, **Circulation Research** 88:499-505, 2001.

TABAS, I. Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol. **Cell Death Differ** 2004; 11: S12 –S16, 2004.

TAKATA, H.; YAMADA, H.; KAWAHITO, H.; KISHIDA, S.; IRIE, D.; KATO, T.; WAKANA, N.; MIYAGAWA, S.; FUKUI, K.; MATSUBARA, H. Vascular angiotensin II type 2 receptor attenuates atherosclerosis via a kinin/NO-dependent mechanism, **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, 2013, DOI: 10.1177/1470320313491794.

TAUBMAN, M. B. Angiotensin II: A Vasoactive Hormone With Ever-Increasing Biological Roles. **Circulation Research** 92: 9-11, 2003.

WANG, H. D.; XU, S.; JOHNS, D. G.; DU, Y.; QUINN, M. T.; CAYATTE, A. J.; COHEN, R. A. Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice. **Circulation Research**, 88: 947-953, 2001.

WASSMANN, S.; CZECH, T.; ICKELS, M.; FLEMING, I.; BOHM, M.; NICKENIG, G. Inhibition of Diet-Induced Atherosclerosis and Endothelial Dysfunction in Apolipoprotein E/Angiotensin II Type 1A Receptor Double-Knockout Mice. **Circulation**, 110: 3062-3067, 2004.

WATTS, S.; RUSSELL, A. Vascular reactivity of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse. **The Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics**, 294: 598 – 604, 2000.

WIND, S.; BEUERLEIN, K.; ARMITAGE, M. E.; TAYE, A.; KUMAR, A. H. S.; JANOWITZ, D.; NEFF, C.; SHAH, A. M.; WINGLER, K.; SCHMIDT, H. H. H. W. Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Aortas of Aged Spontaneously Hypertensive Rats by NOX1/2 Is Reversed by NADPH Oxidase Inhibition, **Hypertension**., 56: 490 – 497, 2010.

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

YANG, B. C. M.; PHILLIPS, I.; MOHUCZY, D.; MENG, H.; SHEN, L.; MEHTA, P.; MEHTA, J. L. Increased Angiotensin II Type 1 Receptor Expression in Hypercholesterolemic Atherosclerosis in Rabbits. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**, 18:1433-1439, 1998.

YATERA, Y.; SHIBATA, K.; FURUNO, Y.; SABANAI, K.; MORISADA, N NAKATA, S.; MORISHITA, T.; TOYOHIRA, Y.; WANG, K. Y.; TANIMOTO, A.; SASAGURI, Y.; TASAKI, H.; NAKASHIMA, Y.; SHIMOKAWA, H.; YANAGIHARA, N.; OTSUJI, Y.; TSUTSUI, M. Severe dyslipidemia, atherosclerosis, and sudden cardiac death in mice lacking all NO synthases fed a high-fat diet. **Cardiovascular Research**, 87: 675–682, 2010.

ZAFARI, A. M.; USHIO-FUKAI M.; MARJORIE, A.; QIQIN YIN, AALOK SHAH, DAVID, G.; HARRISON, W. TAYLOR R.; GRIENDLING K. K. Role of NADH/NADPH Oxidase–Derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Angiotensin II–Induced Vascular Hypertrophy. **Hypertension**, 32:488-495, 1998.



