

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_{max}* 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_{max}* de Ang II em aorta torácica. Na presença de inibidores de NOX-1 e NOX-4 também foi observada a restauração do *E_{max}* 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_{max}* 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 oxisteróis, 3º formação de micropartículas. Os resultados obtidos e 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, 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_{max}* 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_{max}* of Ang II in the thoracic aorta. In the presence of inhibitors of NOX-1 and NOX-4 was also observed *E_{max}* 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_{max}* 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.

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⁻¹, LDL <130 mg. dL⁻¹, HDL >40mg.dL⁻¹ e triglicérides <150 mg.dL⁻¹) 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 AT₁ e/ou AT₂ (SAVOIA e VOLPE, 2011).

Os receptores AT₁ medeiam a maioria dos efeitos fisiológicos e patológicos atribuídos à Ang II, como vasoconstrição (STENMAN & EDVINSSON, 2004), produção de ânion superóxido (O₂⁻) ou peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 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-reperusão, diminuição da produção de NO e estímulo de processos inflamatórios e hipertrofia (GRANGER & KVIETYS, 2012).

Vários sistemas enzimáticos oxidantes podem produzir O₂⁻, como xantinas oxidases, ciclooxigenases, 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^{phox} 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^{phox}, NOXA1 e Rac1 (GARRIDO & GRIENGLING 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^{phox} 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).

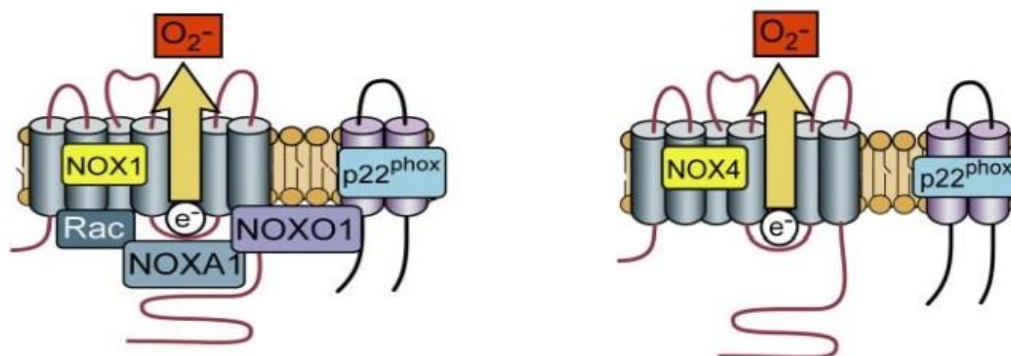


Figura 1 - Representação adaptada das subunidades de NOX-1 e NOX-4 (KRAUSE & BEDARD, 2007)

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 indivíduo 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.

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.

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 AT₁A 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 ad 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 CircPhysiol**, 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 AT₁-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.; KUVAR, 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 AT₁ 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 CircPhysiol**, 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.; GRIENGLING K. K. Role of NADH/NADPH Oxidase–Derived H₂O₂ in Angiotensin II–Induced Vascular Hypertrophy. **Hypertension**, 32:488-495, 1998.