

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDO DOS EFEITOS DO AVE 0991, ANÁLOGO NÃO
PEPTÍDICO DA ANGIOTENSINA-(1-7), SOBRE
PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E
METABÓLICOS EM HAMSTERS SUBMETIDOS À
DIETA HIPERCOLESTEROLÊMICA.**

Analina Raquel da Silva

Ouro Preto - MG
2008

S586e Silva, Analina Raquel da.

Estudo dos efeitos do AVE 0991, análogo não peptídico da angiotensina-(1-7), sobre parâmetros cardiovasculares e metabólicos em hamsters submetidos à dieta hipercolesterolêmica. [manuscrito] / Analina Raquel da Silva. - 2008.
xii, 71f.: il.; graf.; tabs.

Orientadora: Prof^a. Dra. Raquel do Pilar Machado.
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Andréia Carvalho Alzamora.

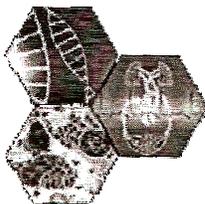
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

1. Angiotensina - Teses. 2. Sistema renina-angiotensina - Teses. 3. Colesterol - Hamsters - Teses. 4. Aterosclerose - Teses. 5I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 616.13-004.6

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Colegiado de Pós-Graduação em Ciências Biológicas



Ata da Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado Intitulada:

Estudo dos Efeitos do AVE 0991, um Análogo não Peptídico da Angiotensina-(1-7), Sobre Parâmetros Cardiovasculares e Metabólicos em Hamsters Submetidos à Dieta Hipercolesterolêmica”

Aos 18 dias do mês de julho de 2008, às 13:00h, no auditório do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado da aluna Analina Raquel da Silva. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por

APROVAR

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr.ª Raquel do Pilar Machado
Presidente (UFOP)

Prof. Dr. Sérgio Veloso Brant Pinheiro
Examinador (UFMG)

Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 18/07/2008

ANALINA RAQUEL DA SILVA

**ESTUDO DOS EFEITOS DO AVE 0991, ANÁLOGO NÃO PEPTÍDICO DA
ANGIOTENSINA-(1-7), SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E
METABÓLICOS EM HAMSTERS SUBMETIDOS À DIETA
HIPERCOLESTEROLÊMICA.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação do núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

Dedico este trabalho à minha família,
representação Divina em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida.

À minha família, pelo amor e apoio incondicionais. Vocês são o suporte, exemplo de vida, alegria e união, que me ensinou que mais importante na vida é amar!

À Prof^a. Raquel pela orientação. Você me ensinou tudo que uma pessoa precisa para ser o melhor profissional em qualquer carreira. Nem sempre, para orientar, é necessário estar ao lado o tempo todo. A melhor orientação é feita por exemplos nos quais podemos nos espelhar o resto da vida!

À Prof^a. Andréia pelo apoio e “novamente” pelos nossos Tem Alegria!

Agradeço a Prof^a. Cláudia e a todos do Laboratório de Patologia pelos ensinamentos e oportunidade.

Ao Prof. Marcelo e a Prof^a. Lucinha pelo apoio e colaboração.

Ao Prof. Robson Santos pelo voto de confiança nesse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Hipertensão pelo grande incentivo, colaborações e momentos de descontração. Aqui, em especial agradeço aos meus amigos de mestrado Bi, Luíza e Everton, pela adorável convivência e pelo auxílio sempre que precisei. Ao Vinícius (*in memorian*) que me ensinou como se trabalha em equipe.

À minha querida estagiária Janete. Obrigada por tornar nosso trabalho muito mais alegre e agradável. Hoje não mais uma estagiária e sim uma grande amiga!

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade. A todos os colegas de mestrado e a nossa querida Cida.

Ao Prof. Déo pelos auxílios sem os quais não teria condições de ir a eventos, tão importantes para um pesquisador.

À minha casinha, Rep. Maxixe e as irmãs maxixeiras, por entenderem o meu “estresse” e por proporcionarem os melhores momentos durante esses anos maravilhosos de convivência.

Ao Victor que é um anjo em minha vida.

Aos meus verdadeiros amigos, que transformaram tempos em momentos.

Ao sacrifício dos animais experimentais.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi estudar os efeitos do AVE 0991, análogo não-peptídico da Angiotensina-(1-7), sobre lesões ateroscleróticas em hamsters tratados com uma dieta hipercolesterolêmica semi-purificada. Hamsters machos com aproximadamente 1 mês de idade foram divididos nos seguintes grupos: grupos controles tratados (GCT, n=7) ou não (GC, n=7), e grupos hipercolesterolêmicos tratados (GHT, n= 9) ou não (GH, n=10) com AVE 0991. A dieta hipercolesterolêmica foi similar a controle, porém, com acréscimo de 0,5% de colesterol e substituição de 8% de óleo de soja por 17% de gordura de coco. O AVE 0991 foi administrado, oralmente, nos últimos 30 dias de 120 dias de dieta. O colesterol total (CT) foi medido mensalmente e o colesterol HDL foi medido no final do experimento. No final do tratamento os animais foram anestesiados com uretana (1,2g/Kg i.p.) e a artéria femoral foi canulada para medidas da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). O coração e arco aórtico foram corados com Sudam III para avaliações histológicas. O CT dos grupos hiper tratados ou não foram significativamente maiores em relação aos grupos controles (tratados ou não) durante o experimento (294,8±25,3 mg/dL, GH e 256,8±21,6 mg/dL, GHT, comparado a 95,67±7,1 mg/dL, GC e 99,01±8,5 mg/dL, GCT, em 120 dias). Não houve efeito nos níveis de CT pelo tratamento com AVE. O HDL sérico estava elevado tanto no GH quanto no GHT (160,6 ± 10,9 mg/dL, GH e 132,0 ± 16,8 mg/dL, GHT) em relação ao GC e GCT (45,5 ± 3,8 mg/dL, GC e 61,2 ± 6,7 mg/dL, GCT). O tratamento com AVE 0991 não influenciou os níveis séricos de HDL. Não houve diferenças significativas tanto na PAM (87,86±5,3 mmHg, GC; 91,38±2,0 mmHg, GCT; 93,4±1,1 mmHg, GH; 94,8±3,1 mHg, GHT) quanto na FC (469,6±11,0 bpm, GC; 442,1±23,5, GCT; 484,5±6,6 bpm, GH; 471,5±11,2 bpm, GHT). As análises histológicas mostraram lesões ateroscleróticas no coração, válvula aórtica e arco aórtico em 33% dos animais do grupo hipercolesterolêmico, enquanto nos grupos tratados com AVE e controle (GC), nenhuma área corada foi encontrada. Esses dados sugerem que uma dieta semipurificada contendo 0,5% de colesterol e 17% de gordura de coco foi eficiente em induzir o aparecimento de lesões ateroscleróticas em hamsters. Além disso, nossos resultados sugerem que o AVE 0991 produz uma atenuação das lesões vasculares induzidas pela dieta hipercolesterolêmica, independentemente de alterações na pressão arterial.

ABSTRACT

The objective of this study was to study the effect of AVE 0991, a non-peptidic analogue of Angiotensin-(1-7), on atherosclerotic lesions in hamsters treated with a partially purified hypercholesterolemic diet. Male hamsters about one month old were divided into the following groups: without treatment (CG, n=7), treated control group (TCG, n=7), and non-treated (HG, n=10) and treated (THG, n=9) hypercholesterolemic groups. The hypercholesterolemic diet was similar to the control one, but, with addition of 0.5 % cholesterol and replacement of 8 % soy oil by 17 % coconut oil. The AVE 0991 was administered, orally, in the last 30 days of the 120 days of diet. The total cholesterol (TC) was measured monthly and HDL cholesterol was measured at the end of the experiment. At the end of the treatments the animals were anesthetized with urethane (1.2 g/ Kg, i.p.) and the femoral artery was cannulated for mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) measurements. The heart and aortic tissues were stained with Sudan III for histological evaluation. The TC of HG and THG was significantly higher than the controls (CG+TCG) during the experiment (294.8±25.3 mg/dL, HG and 256.8±21.6 mg/dL, THG, compared to 95.67±7.1 mg/dL, CG and 99.01±8.5 mg/dL, TCG, in 120 days). There was no effect on TC levels with the AVE treatment. The serum HDL was enhanced in HG and THG (160.6 ± 10.9 mg/dL, HG and 132.0 ± 16.8 mg/dL, THG) in relation to the CG and TCG (45.5 ± 3.8 mg/dL, CG and 61.2 ± 6.7 mg/dL, TCG). The treatment with AVE 0991 did not influence the levels of serum HDL. There were no differences in both MAP (87.86±5.3 mmHg, CG; 91.38±2.0 mmHg, TCG; 93.4±1.1 mmHg, HG; 94.8±3.1 mmHg, THG) and HR (469.6±11.0 bpm, CG; 442.1±23.5, TCG; 484.5±6.6 bpm, HG; 471.5±11.2 bpm, THG). The histological analysis showed atherosclerotic lesions in the heart, aortic valve and aortic arch in 33% of the animals of the Hypercholesterolemic group while no stained areas were observed in AVE-treated and control-diet (CG) hamsters. These data suggest that the semipurified diet containing 0.5 % cholesterol and 17 % coconut oil was efficient to induce atherosclerotic vascular lesions. More importantly, our results suggest that AVE 0991 produces blood pressure-independent attenuation of hypercholesterolemic diet-induced vascular lesions.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1. Metabolismo das lipoproteínas.....	5
2.2. Aterosclerose.....	8
2.2.1. Classificação e histopatologia das lesões ateroscleróticas.....	10
2.3. Sistema Renina – Angiotensina.....	12
2.3.1. SRA e aterosclerose.....	15
2.4. AVE 0991.....	17
2.5. O hamster como modelo no estudo de hipercolesterolemia e aterosclerose.....	18
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo geral.....	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1. Animais.....	21
4.2. Dietas.....	21
4.3. Desenho experimental.....	21
4.4. Tratamento com AVE 0991.....	23
4.5. Amostras biológicas.....	24
4.5.1. Peso corporal e peso dos órgãos.....	24
4.5.2. Obtenção do soro.....	24
4.6. Parâmetros bioquímicos.....	24

4.6.1. Dosagens bioquímicas utilizando kits comerciais.....	24
4.6.2. Determinação da atividade da enzima paraoxonase.....	25
4.6.3. Sulfidrilas totais.....	25
4.6.4. Determinação da atividade da catalase.....	26
4.7. Avaliação dos parâmetros cardiovasculares.....	27
4.7.1. Anestesia.....	27
4.7.2. Confeção da cânula implantada na artéria.....	27
4.7.3. Canulação da artéria aorta abdominal.....	27
4.7.4. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca.....	28
4.8. Análise histopatológica.....	28
4.9. Análise estatística.....	28
5. RESULTADOS.....	30
5.1. Parâmetros biológicos.....	30
5.1.1. Ganho de peso corporal e peso dos órgãos.....	30
5.1.2. Peso dos órgãos.....	31
5.2. Parâmetros bioquímicos.....	34
5.2.1. Lipídios: níveis séricos de colesterol total, HDL, n-HDL, razão HDL/n-HDL e triglicérides.....	34
5.2.2. Função hepática: alanina aminotransferase (ALT).....	39
5.2.3. Estresse oxidativo: catalase, paraoxonase e sulfidrilas totais.....	39
5.3. Parâmetros cardiovasculares: pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).....	42
5.4. Análise histopatológica.....	43
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÕES.....	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
9. ANEXOS.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das dietas controle e hipercolesterolêmica em gramas para cada 1000g de dieta.....	23
Tabela 2: Diluições da solução padrão em trietanolamina-HCL (TEA).....	26
Tabela 3 Quantidades (μ l) dos reagentes utilizados para o preparo da curva padrão necessária para o cálculo das sulfidrilas totais.....	26
Tabela 4: Peso relativo do coração, fígado e baço (mg/g de peso corporal) em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991.....	32
Tabela 5: Peso relativo dos rins direito e esquerdo e do pulmão (mg/g de peso corporal) em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991.....	34
Tabela 6: Níveis séricos de colesterol total em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991, antes e após tratamento.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cascata simplificada do sistema renina angiotensina.....	13
Figura 2: Organograma dos grupos experimentais de acordo com o tipo de dieta e tratamento recebidos.....	22
Figura 3: Ganho de peso em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991.....	30
Figura 4: Fotos ilustrativas dos fígados de hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica.....	33
Figura 5: Níveis séricos de colesterol total em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica.....	35
Figura 6: Níveis séricos da fração HDL em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991.....	36
Figura 7: Níveis séricos do colesterol presente nas frações n-HDL em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991.....	37
Figura 8: Razão entre a frações de colesterol n-HDL/HDL em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados por 30 dias ou não com AVE 0991.....	38
Figura 9: Os níveis séricos de triglicérides em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991.....	38
Figura 10: Atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT) em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991.....	39
Figura 11: Atividade da enzima catalase em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991.....	40
Figura 12: Atividade da enzima paraoxonase (PON) em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991.....	41
Figura 13: Níveis de sulfidrilas totais em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991.....	41
Figura 14: Níveis basais de pressão arterial média em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991.....	42

Figura 15: Valores de frequência cardíaca em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991.....	43
Figura 16: Fotomicrografia do fígado de hamsters.....	45
Figura 17: Fotomicrografia de válvula aórtica de hamster.....	46
Figura 18: Fotomicrografia da artéria aorta (arco aórtico) de hamster.....	47
Figura 19: Fotomicrografia do coração de hamster.....	48

1. INTRODUÇÃO

Durante o último século as doenças cardiovasculares (DCV) se tornaram a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo (Steffens, 2003), representando metade de todas as mortes no mundo desenvolvido e 25% no mundo em desenvolvimento (Murray & Lopez, 1996). Estima-se que metade dessas mortes seja causada pela doença arterial coronariana (DAC) (Beaglehole, 1999). Espera-se que, em 2020, a DAC seja a principal causa de doença no mundo e a maior causa de morte nos países em desenvolvimento (Okrainec *et al.*, 2004). Estes dados também se aplicam ao Brasil, onde as DCV representaram 32% de todos os óbitos nas capitais brasileiras em 1990 (Steffens, 2003).

Dentre os fatores de risco das DCV o tabagismo, níveis elevados da lipoproteína de baixa densidade (LDL), baixos da lipoproteína de alta densidade (HDL), diabetes Mellitus, hipertensão arterial sistêmica, história familiar, obesidade, sedentarismo, obesidade central, síndrome plurimetabólica e ingestão de álcool estão fortemente relacionados com aterosclerose e suas manifestações clínicas (Polanczyk, 2005). O estudo AFIRMAR (Acute Myocardial Infarction Risk Factor Assessment in Brazil), desenvolvido em 104 hospitais de 51 cidades do Brasil, mostrou que a predisposição para doença aterosclerótica no Brasil é muito semelhante àquela observada em países da Europa e América do Norte (Piegas *et al.*, 2003). A aterosclerose é considerada a patologia básica para as diferentes manifestações da DCV, tais como DAC, doença vascular periférica e doença cerebrovascular.

O International Clinical Epidemiology Network, INCLEN (1992), pesquisou a prevalência dos fatores de risco da DAC em 7 países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. Este estudo mostrou que 19% dos participantes do Rio de Janeiro e São Paulo apresentavam colesterol sérico elevado, sendo este considerado o principal fator de risco da aterosclerose.

Estudos mostram que nos países em desenvolvimento estão ocorrendo mudanças sócio-econômicas que contribuem para aumentar os fatores de risco das doenças cardiovasculares. O aumento na expectativa de vida, transição nutricional e mudanças

no estilo de vida, estão entre os fatores que ajudaram a aumentar o número de casos de morbimortalidade por doenças cardiovasculares nesses países (Reddy *et al.*, 1998).

A aterosclerose é um processo inflamatório crônico do sistema cardiovascular que se inicia com o transporte e retenção de lipoproteínas dentro da parede arterial (Berliner *et al.*, 1995), devido a uma maior permeabilidade aos constituintes do plasma decorrente de injúria sustentada à parede arterial (Ross, 1986). As células da parede arterial secretam produtos oxidativos de múltiplas vias que podem atingir a LDL bloqueada no espaço subendotelial e iniciar uma oxidação lipídica (Witztum *et al.*, 1991). Esses produtos oxidativos podem ser metais como o cobre, lipoxigenase celular, tióis, ácido hipocloroso, aldeídos e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Steinbrecher *et al.*, 1990; Witztum *et al.*, 1991 e Parthasarathy, 1994).

O acúmulo de LDL oxidado (oxLDL) contribui significativamente para o recrutamento de monócitos circulantes (Quinn *et al.*, 1987 e Berliner *et al.*, 1990) que se convertem em macrófagos que, por sua vez, contribuem para aumentar a oxidação das LDLs (Rajavasisth *et al.*, 1990).

A LDL oxidada passa a não ser mais reconhecida por seus receptores de superfície, ocasionando uma captação celular de LDL por receptores “scavenger” e/ou receptores de LDL oxidada, que não são regulados pelo conteúdo de colesterol celular, acarretando um acúmulo de colesterol pelos macrófagos (Brown *et al.*, 1990; Freeman *et al.*, 1990 e Sparrow *et al.*, 1989). Como as células cheias de colesterol têm um citoplasma espumoso são chamadas de células espumosas ou “foam cells”. Essas células são a marca da lesão inicial da aterosclerose, a estria de gordura.

As células espumosas ativadas liberam uma variedade de moléculas quimiotáticas, citocinas e fatores de crescimento. Mais linfócitos são atraídos para a lesão levando a um pool de moléculas efetoras que expandem e perpetuam a resposta inflamatória (Chilton, 2004). Mediadores inflamatórios aumentam a ligação das LDLs às células endoteliais e a migração de células do músculo liso vascular (CMLV) para a lesão (Ross, 1993), fazendo com que o processo se torne cíclico.

As CMLV começam a secretar proteínas de matriz extracelular, colágeno e elastina em excesso formando uma placa fibrosa em torno do núcleo lipídico, estabilizando a estrutura (Ross, 1993). Essa combinação de acúmulo de lipídeos e

produção de colágeno resulta nas formas avançadas complexas de placas ateroscleróticas (Kádár *et al.*, 2001). Eventualmente, os macrófagos podem liberar metaloproteinasas que degradam a capa fibrosa tornando a placa vulnerável à ruptura (Chilton, 2004), que no coração leva ao infarto agudo do miocárdio e morte coronariana.

Diversos estudos têm mostrado a participação do sistema renina angiotensina (SRA) na progressão da aterosclerose focalizando principalmente o bloqueio desse sistema, seja através de inibidores da ECA ou por bloqueadores do receptor AT₁ (Strawn *et al.*, 2000; Miyazaki *et al.*, 1999; Uehara *et al.*, 2002 e Kowala *et al.*, 1998). A angiotensina II (Ang II), importante peptídeo do SRA, tem um papel crucial na regulação da resposta inflamatória vascular por ativar o recrutamento de células inflamatórias (Kim *et al.*, 1996, Strawn *et al.*, 1999 e Ferrario 2006). Além disso, esse peptídeo modula a contração, regula o crescimento celular, apoptose e diferenciação, influencia a migração celular e deposição de matriz (Touyz *et al.*, 2002), além de aumentar o estresse oxidativo (Vaughan, 2000). Este conjunto de atividades faz da Ang II um peptídeo aterogênico.

Pesquisas indicam que, além da Ang II, outros derivados peptídicos angiotensinérgicos também são mediadores finais do SRA, sendo a angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) um desses peptídeos e alvo de inúmeros estudos, especialmente por desempenhar ações mais seletivas que a Ang II e por poder ser formada por uma via independente da ECA (Ferrario *et al.*, 1990). A Ang-(1-7) apresenta-se como o mais pleiotrópico dos metabólitos derivados da Ang II, por exercer efeitos que podem ser idênticos, opostos ou distintos da Ang II (Ardaillou, 1997).

A Ang-(1-7), ao contrário da Ang II, age como agente antiproliferativo em células da musculatura lisa vascular (CMLV), reduz a formação de neointima (Strawn *et al.*, 1999 e Tallant *et al.*, 1999), tem ação antitrombótica, reduz a adesão plaquetária (Kucharewicz *et al.*, 2000), e bloqueia os efeitos pró-oxidantes da Ang II, reduzindo a produção do ânion superóxido (Polizio *et al.*, 2007). Considerando essas ações contraregulatórias da Ang-(1-7) em relação àquelas da Ang II, e sendo este último um peptídeo aterogênico, pode se especular uma ação antiaterogênica atribuída à Ang-(1-7). O grande número de evidências associadas às ações cardiovasculares da Ang-(1-7) em

oposição aos efeitos atribuídos à Ang II, faz deste peptídeo um potencial alvo para o desenvolvimento de fármacos associados às doenças cardiovasculares.

Um importante avanço nos estudos relacionados às ações da Ang-(1-7) e suas possíveis aplicações farmacológicas foi a descoberta recente do seu análogo AVE 0991 (Wiemer *et al.*, 2002). Este composto é um agonista do receptor Mas da Ang-(1-7) não-peptídico e ativo oralmente mimetizando os efeitos dessa angiotensina em muitos tecidos (Santos *et al.*, 2006), tornando-se dessa forma, um candidato promissor nas terapias de doenças cardiovasculares.

Neste trabalho, utilizamos o AVE 0991 para elucidar as ações da ANG-(1-7) sobre o perfil de lipídeos, estresse oxidativo, parâmetros cardiovasculares e sobre a formação de lesões ateroscleróticas em hamsters hipercolesterolêmicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Metabolismo das lipoproteínas

O colesterol é um lipídio que está presente no organismo animal, tanto nos tecidos como nas lipoproteínas plasmáticas, seja sob a forma livre ou combinada (com ácidos graxos) como éster de colesterol (Brody, 1993).

Sua importância fisiológica reside no amplo papel que desempenha no organismo animal, como precursor de sais biliares e de hormônios glicocorticóides e mineralocorticóides, na síntese de hormônios sexuais e na formação de vitamina D, e principalmente como elemento estrutural, nas membranas celulares (Brody, 1993). O colesterol está presente em diversos tipos de alimentos, podendo ser ingerido na dieta, mas pode também ser sintetizado no fígado a partir de precursores mais simples (Nelson e Cox, 2006).

A homeostase do colesterol é mantida pelo balanço da absorção do colesterol intestinal e síntese do colesterol endógeno (Ros, 2000). O controle no metabolismo do colesterol é de importância chave na manutenção da saúde do sistema cardiovascular. Portanto, um desequilíbrio nas taxas de colesterol plasmático pode ser prejudicial ao sistema cardiovascular, uma vez que depósitos anormais de colesterol nos tecidos estão associados a várias condições, incluindo aterosclerose e diabetes mellitus (Brody, 1993).

O colesterol, os ésteres de colesterol, assim como os triacilgliceróis e fosfolipídios, são essencialmente insolúveis em água (Nelson e Cox, 2006). Eles são transportados pelo plasma sanguíneo na forma de lipoproteínas plasmáticas, que são complexos moleculares de proteínas transportadoras específicas chamadas de apolipoproteínas (apo) com combinações variadas de fosfolipídios, colesterol, ésteres de colesterol e triacilgliceróis (Nelson e Cox, 2006). As lipoproteínas são complexos esféricos com lipídios hidrofóbicos no centro e as cadeias laterais hidrofílicas dos aminoácidos das proteínas na superfície (Nelson e Cox, 2006). Cada classe de lipoproteína tem uma função específica, determinada por seu lugar de síntese, composição lipídica e conteúdo de apolipoproteína (Nelson e Cox, 2006).

Os lipídios da dieta deixam as células intestinais conjugados em quilomícrons através de um processo que requer a apo B-48 (Kwiterovich, 2000). Os trigliceróis no núcleo dos quilomícrons são hidrolisados em ácidos graxos livres e glicerol pela lipase lipoprotéica com a apo C-II como um cofator, produzindo um quilomícron remanescente pequeno (Kwiterovich, 2000). Os remanescentes dos quilomícrons, privados da maior parte de seus triglicerídeos, mas ainda contendo colesterol, apo E e apo B-48, movem-se da corrente sanguínea para o fígado. No fígado, existem receptores que reconhecem a apo E e essa ligação promove absorção dos quilomícrons por endocitose (Nelson e Cox, 2006).

Um atraso na remoção dos quilomícrons remanescentes pode promover a aterogênese (Kwiterovich, 2000). Estudos mostram que pacientes com doença arterial coronariana possuem elevação dos níveis de triglicérides pós-prandial e um retardo no retorno dos triglicérides aos níveis basais, devido a uma lentidão na remoção das partículas dos quilomícrons remanescentes (Patsch *et al.*, 1992).

Quando a dieta contém mais ácidos graxos que a quantidade necessária como combustível, estes são convertidos em triacilgliceróis no fígado e unidos a apolipoproteínas específicas para formar lipoproteínas de muito baixa densidade, as VLDL (Very-Low-Density Lipoprotein) (Nelson e Cox, 2006). Essas transportam triacilglicerol do fígado para os tecidos periféricos.

As VLDL são sintetizadas e secretadas do fígado em um processo que requer a apo B-100 (Kwiterovich, 2000). No plasma, o triacilglicerol na VLDL é clivado em ácidos graxos livres e glicerol pela lipase lipoprotéica e seu cofator, a apo C-2 (Kwiterovich, 2000). A perda de triacilgliceróis converte algumas VLDL em VLDL remanescentes, que são também chamadas de lipoproteínas de densidade intermediária – as IDL (Intermediate Density Lipoprotein) (Nelson e Cox, 2006). Elas são uma classe heterogênea de partículas que normalmente não se acumulam no plasma (Lichtenstein *et al.*, 1996).

Algumas das partículas IDL são removidas por interações da apo E com o receptor de LDL na superfície do fígado, ou os triglicerídeos das IDL podem ser hidrolisados pela lipase hepática para produzir as lipoproteínas de baixa densidade (LDL, Low-Density Lipoprotein) (Kwiterovich, 2000). As LDL transportam o colesterol para os

tecidos periféricos (extra-hepáticos), que possuem receptores de superfície específicos para ela através da interação com a apo B-100 (Nelson e Cox, 2006).

Se a LDL é oxidada, ela pode ser captada por macrófagos através de receptores *scavenger*, CD 36 e SR-A, na superfície do macrófago (Kwiterovich, 2000), levando ao desenvolvimento das células espumosas que iniciam a formação de lesões ateroscleróticas. O Framingham Study (Gordon *et al.*, 1977) reportou o nível sérico de LDL como melhor preditor da doença arterial coronariana do que o nível de colesterol total (CT) tanto em homens quanto em mulheres.

Outro excelente indicador é a relação inversa entre a lipoproteína de alta densidade (HDL, High-Density Lipoprotein) e o risco de doença arterial coronariana. As HDLs são uma subclasse de lipoproteínas originárias do intestino e fígado (Lichtenstein *et al.*, 1996). Sua principal proteína é a apo A-I e apo A-II, embora as HDLs também contenham apo A-IV, apo A-V, apo E, paraoxanase (PON), entre outras (O'Connell & Genest, 2001).

O HDL recebe o colesterol dos remanescentes de quilomícrons e VLDL e os transporta para o fígado, onde o colesterol é liberado e parte dele é convertida em sais biliares (Nelson e Cox, 2006). Esse processo conhecido como transporte reverso do colesterol (TRC) protege o organismo contra aumentos das LDLs e conseqüentemente do seu acúmulo na parede vascular. Em adição ao TRC, a HDL também tem efeito inibitório contra a oxidação lipídica e diminui a resposta inflamatória (Negre-Salvayre *et al.*, 2006). Enzimas associadas à HDL estão envolvidas na função antioxidante da HDL, entre elas a PON (Mackness *et al.*, 1991), lecitina- colesterol aciltransferase (LCAT), fosfolipase-D, proteases, entre outras (Negre-Salvayre *et al.*, 2006).

Sendo assim, a dislipidemia, condição na qual há concentrações anormais de lipídios ou lipoproteínas no sangue, é um fator de risco importante para o desenvolvimento de complicações da aterosclerose. Modelos de hipercolesterolemia, dessa forma, se tornam importantes ferramentas em estudos sobre os efeitos de substâncias sintéticas no tratamento das doenças cardiovasculares.

2.2. Aterosclerose

A aterosclerose é um processo inflamatório crônico que, geralmente, inicia-se na infância e vai apresentar manifestações clínicas na idade adulta, sendo altamente prevalente em homens e mulheres. As complicações trombo-oclusivas dessa doença, incluindo acidente vascular cerebral e infarto, são as principais causas de morbidade e mortalidade em quase todo o mundo (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 2005). Essa complexa patogênese não pode ser atribuída a um simples fator. Ela parece ser multifatorial com fatores ambientais, alimentares, hemodinâmicos, genéticos dentre outros, fazendo parte da gênese e desenvolvimento desta patologia (Ross *et al.*, 1993 e Schmitz *et al.*, 1998).

A aterosclerose é uma doença que afeta primariamente a túnica íntima das artérias de grande e médio calibres caracterizada pelo depósito e acúmulo de lípidos, pela proliferação de fibras colágenas e pela frequente ocorrência de calcificação nas áreas afetadas, nas fases mais tardias (Pasqualucci *et al.*, 1999)..

O processo aterosclerótico se desenvolve como resultado de injúria sustentada à parede arterial, hipótese proposta por Ross *et al.* (1986). Diversos fatores podem levar a injúria vascular incluindo agentes infecciosos, pressão sanguínea elevada, mediadores inflamatórios e eventos de glicação, todos envolvendo estresse oxidativo (Basta *et al.*, 2002 e Gattone *et al.*, 2001). Segundo essa hipótese, deve ser salientado que não há necessidade que ocorra uma lesão de endotélio evidente, como uma desnudação de células endoteliais. Alterações funcionais do endotélio, tais como aumento de permeabilidade, liberação de substâncias vasoativas e fatores de crescimento, alteração nas propriedades antitrombogênicas da superfície endotelial e estímulo das propriedades pró-coagulantes do endotélio, já seriam capazes de desencadear as lesões ateroscleróticas (Ross *et al.*, 1986).

A principal causa de agressão vascular é o transporte e retenção de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) para o interior da parede arterial (Berliner *et al.*, 1995), devido a maior permeabilidade aos constituintes do plasma, como citado anteriormente. A injúria arterial, em adição à resposta local, aumenta uma profunda resposta sistêmica que envolve uma cascata de eventos celulares e moleculares que promovem o reparo da parede do vaso (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 2005). Uma falha nesse processo de

reparo em resposta a sinais inflamatórios promove a aterogênese e ainda cria um feedback positivo que propaga o dano vascular (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 2005).

As alterações mais precoces causadas pela aterosclerose na parede arterial já são, geralmente, encontradas em crianças e assumem a forma denominada de estria gordurosa. Essa se inicia com o transporte de lipoproteínas para dentro da parede do vaso com subsequente bloqueio dessas em uma malha fibrilar tridimensional do espaço subentotelial (Nivelstein-Post *et al.*, 1991). As células da parede arterial secretam produtos oxidativos de múltiplas vias que podem atingir a LDL bloqueada no espaço subendotelial e iniciar uma oxidação lipídica (Witztum *et al.*, 1991). Esses produtos oxidativos podem ser metais como o cobre, lipoxigenase celular, tióis, ácido hipocloroso, aldeídos e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Steinbrecher *et al.*, 1990; Witztum *et al.*, 1991 e Parthasarathy, 1994).

O acúmulo de LDL oxidado (oxLDL) contribui significativamente para o recrutamento de monócitos circulantes (Quinn *et al.*, 1987 e Berliner *et al.*, 1990). O tratamento de células endoteliais, *in vitro*, com LDL minimamente oxidada (MM-LDL) ativa um fator de transcrição NFκB-like (Parhami *et al.*, 1993), o qual induz uma série de genes característicos da resposta inflamatória crônica. Dentre os genes induzidos pelo NFκB que estão aumentados pela oxLDL incluem o da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) (Cushing *et al.*, 1990), do fator estimulante de colônia de monócitos (M-CSF) (Rajavasisth *et al.*, 1990) e proteína Gro (Shwartz *et al.*, 1994). Os monócitos recrutados para a lesão são ativados pelo M-CSF e se convertem em macrófagos que, por sua vez, contribuem para aumentar a oxidação das LDLs (Rajavasisth *et al.*, 1990).

Durante o processo oxidativo ocorre uma cadeia de reações que modificam a estrutura da apoproteína B (apoB), o epitopo de reconhecimento da LDL pelos receptores de LDL (Witztum *et al.*, 1991). Essas modificações da porção protéica das LDLs levam a uma diminuição no reconhecimento pelos receptores de LDL. Isso acarreta em uma captação celular de LDL por receptores “scavenger” e/ou receptores de LDL oxidada, que não são regulados pelo conteúdo de colesterol celular, levando a um acúmulo de colesterol pelos macrófagos (Brown *et al.*, 1990; Freeman *et al.*, 1990 e Sparrow *et al.*, 1989). Como as células cheias de colesterol têm um citoplasma

espumoso são chamadas de células espumosas ou “foam cells”. Tanto macrófagos como células musculares lisas na lesão vascular acumulam colesterol para formar células espumosas (Wolfbauer *et al.*, 1986). Essas células são a marca da lesão inicial da aterosclerose, a estria de gordura.

As células espumosas ativadas liberam uma variedade de moléculas quimiotáticas, citocinas e fatores de crescimento (Chilton, 2004). Dessa forma, mais linfócitos são atraídos para a lesão ativando um conjunto de moléculas efetoras que expandem e perpetuam a resposta inflamatória (Chilton, 2004). Monócitos /macrófagos são potentes fontes de fator de crescimento para células do músculo liso vascular (CMLV) e de fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) (Ross, 1993), explicando em parte, a migração de CMLV que ocorre dentro da lesão. A crescente produção de mediadores inflamatórios aumentam a ligação das LDLs às células endoteliais e a migração de CMLV para a lesão, fazendo com que o processo se torne cíclico (Chilton, 2004).

As CMLV começam a secretar proteínas de matriz extracelular, colágeno e elastina em excesso formando uma placa fibrosa em torno do núcleo lipídico, estabilizando a estrutura (Ross, 1993). Essa combinação de acúmulo de lipídeos e produção de colágeno resulta nas formas avançadas complexas de placas ateroscleróticas (Kádár *et al.*, 2001). Eventualmente, os macrófagos podem liberar metaloproteinases que degradam a capa fibrosa tornando a placa vulnerável à ruptura (Chilton, 2004), levando, no coração ao infarto agudo do miocárdio e morte coronariana.

2.2.1. Classificação e histopatologia das lesões ateroscleróticas

A American Heart Association padronizou e classificou os vários estágios das lesões ateroscleróticas. As lesões do tipo I ou “lesões iniciais” consistem dos primeiros depósitos lipídicos detectados química e microscopicamente na íntima e as reações celulares relacionadas a tais depósitos (Sary *et al.*, 1994). As mudanças histológicas iniciais na íntima humana são mínimas (Sary *et al.*, 1994). Podem-se observar pequenos grupos isolados de macrófagos contendo gotas lipídicas (macrófagos-células espumosas) que se formam (Sary, 1987). Tanto macrófagos como as células musculares lisas preenchidas de gordura assumem, nas preparações histológicas

convencionais coradas pela hematoxilina e eosina, o aspecto de células espumosas, vacuolizadas, uma vez que o conteúdo lipídico dessas células é extraído durante o processamento histológico (Pasqualucci *et al.*, 1999).

As lesões do tipo II são aquelas referidas geralmente como estrias gordurosas (Stary *et al.*, 1994). Essas lesões podem ser visíveis a olho nu e consistem primariamente de células espumosas estratificadas na camada adjacente e não somente em grupos isolados de poucas células como ocorre nas lesões do tipo I (Stary *et al.*, 1994). Além de macrófagos, células musculares lisas vasculares também podem conter gotas lipídicas e ainda gotas de lipídio dispersas podem ser encontradas neste tipo de lesões (Stary *et al.*, 1994).

Macroscopicamente, a estria gordurosa consiste de uma faixa disposta, geralmente, ao longo do maior eixo do vaso, amarelada devido a grande quantidade de lipídio presente no citoplasma das células espumosas (Lupu *et al.*, 1987). Nas células preenchidas com gotículas de lípidos que se apresentam como vacúolos vazios, nas preparações embebidas em parafina, esses vacúolos são circundados por um fino halo de citoplasma. A análise pela microscopia eletrônica pode permitir a identificação de algumas dessas células, entretanto a identificação da origem de um grande número delas permanece difícil ou mesmo impossível, usando-se as técnicas rotineiras de coloração tecidual (Pasqualucci *et al.*, 1999). O termo “lesões iniciais” é utilizado somente para as lesões dos tipos I e II (Stary *et al.*, 1994).

O tipo III, ou preateroma, representa o estágio intermediário entre as lesões do tipo II e as lesões avançadas ou ateromas (Stary *et al.*, 1994). Essas lesões possuem maior quantidade de gotas lipídicas extracelulares encontradas logo abaixo da camada de macrófagos e células espumosas, substituindo proteoglicanos e fibras da matrix extracelular (Stary *et al.*, 1994).

Na fase IV, a primeira das lesões avançadas, ocorre um acúmulo de lipídio extracelular, conhecido como núcleo lipídico, ocupando uma região bem definida da íntima (Stary *et al.*, 1995). Nas lesões do tipo IV um aumento de tecido fibroso não é característico, e complicações tais como trombose e lesões de superfície estão ausentes (Stary *et al.*, 1995). O núcleo lipídico causa uma severa desorganização da íntima (Stary *et al.*, 1995). Essas lesões são encontradas na mesma região onde existe um espessamento excêntrico da íntima e por isso são consideradas lesões excêntricas. As

CMLVs e matrix extracelular da íntima são dispersos e substituídos por acumulados de partículas de lipídio extracelular (Stary *et al.*, 1995). As organelas de algumas CMLVs podem ser calcificadas, e partículas de cálcio são encontradas dentro de núcleos lipídicos (Stary *et al.*, 1995). As lesões do tipo IV são também conhecidas como ateroma (Stary *et al.*, 1995).

Quando esse núcleo lipídico sofre um aumento de um proeminente novo tecido fibroso (principalmente colágeno), a lesão é então chamada de tipo V (Stary *et al.*, 1995). Quando o novo tecido é parte de uma lesão do tipo IV, este tipo de lesão pode ser referido como fibroateroma ou lesão do tipo Va. Algumas lesões do tipo V são largamente calcificadas (tipo Vb), e algumas consistem principalmente de tecido conjuntivo fibroso e pouca ou nenhuma acumulação lipídica (tipo Vc) (Stary *et al.*, 1995).

As placas fibrosas, macroscopicamente, apresentam coloração esbranquiçada e são, comumente, sobrelevadas. Em muitos casos, elas fazem protrusão para a luz da artéria e são suficientemente grandes para comprometer o fluxo do sangue e ainda muitas vezes coalescem, formando lesões maiores (Pasqualucci *et al.*, 1999).

As lesões do tipo VI são conhecidas como lesões complicadas e se formam a partir de uma característica adicional às lesões do tipo IV ou V (Stary *et al.*, 1995). Tais características adicionais podem ser uma ruptura ou lesão de superfície, hematoma ou hemorragia, além de depósitos trombóticos (Stary *et al.*, 1995).

2.3. Sistema Renina – Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) tem sido o centro de intensas atividades de pesquisa desde a descoberta da renina pelo fisiologista Finlandês Robert Tigerstedt, há mais de 100 anos. Embora classicamente o SRA seja considerado como um sistema endócrino responsável pela correção da hipotensão aguda através de mudanças na resistência periférica e homeostase de eletrólitos, atualmente, este sistema é reconhecido como sendo importante no controle a curto, médio e longo prazo da pressão arterial, progressão da nefropatia diabética e desenvolvimento de cardiomiopatia hipertensiva, e mais recentemente, tem sido envolvido como um fator modulador no controle do desenvolvimento (ou progressão) da aterosclerose (Brasier *et al.*, 2002).

O processamento das angiotensinas (figura 1) se inicia com a hidrólise do angiotensinogênio (um α_2 globulina circulante produzido no fígado) pela renina para formar o decapeptídeo angiotensina-I (Ang I) (Keidar *et al.*, 2007). A Ang I é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em angiotensina-II (Ang II) pela remoção de dois aminoácidos C-terminais (Das, 2005). Em coração humano, entretanto, a maior parte da conversão da Ang I em Ang II é feita em uma via alternativa, pela enzima quimase (Urata *et al.*, 1990).

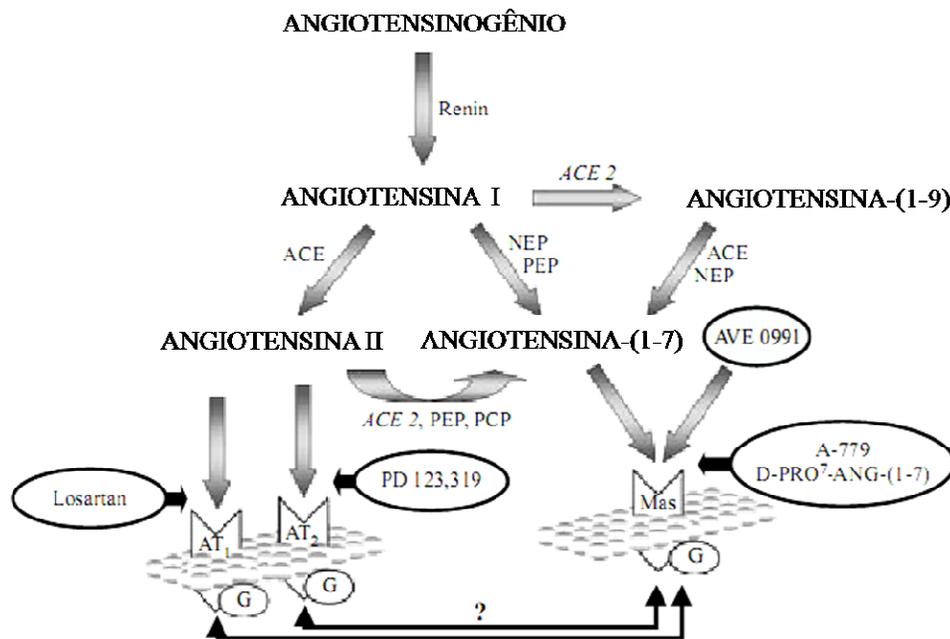


Figura 1. Cascata simplificada do sistema renina angiotensina focando a via de formação da Ang-(1-7). ACE, enzima conversora de angiotensina; AT₁, receptor de Ang II do tipo 1; AT₂, receptor de Ang II do tipo 2; A779, antagonista Mas; D-Pro⁷-Ang-(1-7), antagonista Mas; G, proteína G; Mas, receptor Mas de Ang-(1-7); NEP, endopeptidase neutra; PCP, prolilcarboxipetidase; PD 123,319, antagonista de AT₂; PEP, prolilendopeptidase. Modificado de Santos *et al.* (2006).

A Ang II, principal peptídeo do SRA, exerce suas diversas atividades biológicas através da ligação em um dos dois tipos de receptores conhecidos (Keidar *et al.*, 2007). O receptor do tipo 1 (AT₁) é altamente expressado em adultos e tem importante papel nas doenças cardiovasculares (Keidar *et al.*, 2007). O receptor AT₁ medeia a maior parte dos usualmente associados com a Ang II, tais como vasoconstrição, proliferação, inflamação, coagulação, deposição de matrix, estimulação da liberação de aldosterona e

da atividade do sistema nervoso simpático (de Gasparo *et al.*, 2000). Entretanto, a ligação da Ang II ao receptor do tipo 2 (AT₂) possui ações contrárias aos efeitos mediados pelo receptor AT₁, tanto a curto como a longo prazo (de Gasparo *et al.*, 2000), provendo um papel protetor.

Além da Ang II, outros Ang-peptídeos, tais como angiotensina IV [Ang IV ou Ang-(3-8)] e angiotensina 1-7 [Ang-(1-7)], também têm importantes atividades biológicas (Wessel *et al.*, 2007). A Ang-(1-7), especialmente, tem se tornado uma angiotensina de interesse por ser considerado o mais pleiotrópico dos metabólitos derivados da Ang II, por exercer efeitos que podem ser idênticos, opostos ou distintos ao da Ang II (Ardaillou, 1997).

A Ang-(1-7) pode ser formada diretamente da Ang I ou Ang II e indiretamente da Ang I tendo como passo intermediário a formação da angiotensina-(1-9) (Ang-(1-9)) (Santos *et al.*, 2000). A remoção da fenilalanina do C-terminal da Ang II resulta na formação da Ang-(1-7). Essa conversão é eficientemente catalisada pelo homólogo da ECA recentemente descoberto, a ECA2 (Vickers *et al.*, 2002). Além da ECA2, prolil-endopetidase e prolil-carboxipeptidase podem gerar Ang-(1-7) diretamente da Ang II (Santos *et al.*, 2006). Em outra via, a conversão direta da Ang I em Ang-(1-7) pode ser mediada por diversas enzimas tais como: prolil-endopeptidase e endopeptidase neutra (neprilisina) através da hidrólise da ponte Pro⁷-Phe⁸ (Rice *et al.*, 2004 e Stanziola *et al.*, 1999). Outra via, embora cineticamente menos eficiente (Rice *et al.*, 2004), envolve papéis alternativos para a ECA e ECA2. A Ang I é primeiro hidrolizada pela ECA2 para formar Ang-(1-9) (Donoghue *et al.*, 2000), um peptídeo sem atividade biológica conhecida, e então convertida pela ECA ou endopeptidase neutra em Ang-(1-7) (Rice *et al.*, 2004). A geração de Ang-(1-7) através de uma via secundária à formação de Ang II pode ser benéfica, uma vez que esses dois peptídeos têm ações antagônicas (Keidar *et al.*, 2007).

O heptapeptídeo Ang-(1-7), como a Ang II, estimula a liberação de vasopressina no hipotálamo de ratos (Schiaivone *et al.*, 1988) e facilita a transmissão noradrenérgica (Gironacci *et al.*, 1994). Ao contrário da Ang II, a Ang-(1-7) não é vasopressora e não estimula a dipsinogênese ou liberação de aldosterona (Ferrario *et al.*, 1997). A ligação da Ang-(1-7) às células endoteliais induz vasodilatação por estimular a produção de óxido nítrico (NO), prostaglandinas ou fatores de relaxamento derivados do endotélio

(Ferreira *et al.*, 2005 e Keidar *et al.*, 2007), dependendo da espécie e do leito vascular. Em adição, ela estimula a vasodilatação induzida por bradicinina (Lima *et al.*, 1997). Em ratos, a infusão em fmol dessa angiotensina reduz a resistência vascular periférica (Sampaio *et al.*, 2003). O heptapeptídeo também está relacionado com o controle do balanço hidroeletrólítico (Santos & Campagnole-Santos, 1994) modulando a excreção de água e sódio (Dellipizzi *et al.*, 1994).

Rocks *et al.* (1999) mostraram que a Ang-(1-7) é um antagonista das respostas vasculares da Ang II também em artérias humanas e um inibidor da ECA em plasma e tecidos cardíaco e vascular humanos.

Recentemente, Santos e cols. (2003) reportaram que a Ang-(1-7) é um ligante endógeno do receptor acoplado à proteína G Mas. O receptor Mas, caracterizado como um receptor oncogene, era conhecido por influenciar a regulação fetal da diferenciação celular e crescimento (Hanley *et al.*, 1990). Originalmente, o receptor Mas foi considerado por ser o primeiro receptor de Ang II isolado de tecidos (Jackson *et al.*, 1988), porém estudos posteriores desproveram esta participação.

Um dos principais avanços no entendimento do papel patofisiológico da Ang-(1-7) está relatado aos seus efeitos cardíacos. Uma resposta vasodilatadora em artérias coronárias de cães e porcos, aortas de ratos e arteríolas renais de coelhos foi atribuída à Ang-(1-7) (Le Tran *et al.*, 1997, Ren *et al.*, 1998 e Sampaio *et al.*, 2003). Porém, dependendo da dose e do leito vascular, ela pode também, produzir vasoconstrição (Osei *et al.*, 1993). Em adição, a Ang-(1-7) inibe, em humanos, a ECA plasmática, atrial e arterial, e antagoniza a contração arterial induzida pela Ang II (Rocks *et al.*, 1999)

O grande número de evidências associadas às ações cardiovasculares da Ang-(1-7) em oposição aos efeitos atribuídos à Ang II, faz deste peptídeo um potencial alvo para o desenvolvimento de fármacos associados às doenças cardiovasculares.

2.3.1. SRA e aterosclerose

Estudos em vários modelos animais têm mostrado que o bloqueio das ações da Ang II usando inibidores da ECA (Miyazaki *et al.*, 1999 e Grothusen *et al.*, 2005) ou bloqueadores de AT1 (Strawn *et al.*, 2000; Grothusen *et al.*, 2005; Miyazaki *et al.*, 1999 e Ferrario, 2002) podem ser efetivos em evitar a progressão da aterosclerose.

A aterosclerose é uma reação inflamatória crônica e diversos estudos demonstraram que o SRA está envolvido em todos os estágios desse processo. A Ang II tem um papel crucial na regulação da resposta inflamatória vascular por ativar o recrutamento de células inflamatórias (Kim *et al.*, 1996, Strawn *et al.*, 1999 e Ferrario 2006). Estudos mostram que essa angiotensina aumenta a expressão de VCAM-1, ICAM-1 e P-selectina dentro da parede vascular e subsequentemente na circulação (Graninger *et al.*, 2004). Além disso, a Ang II também aumenta a expressão de MCP-1, que facilita o movimento de monócitos e células T dentro do tecido vascular lesado (Ferrario, 2006). Infusão de Ang II eleva a síntese e níveis de TNF- α , IL-6, e cicloxigenase-2, os quais agem aumentando a resposta inflamatória (Ferrario, 2006). Em adição, células inflamatórias podem produzir Ang II, resultando em uma resposta de feedback positivo local, dessa forma perpetuando o ciclo inflamatório (Ferrario, 2006).

Diversos estudos mostraram que a Ang II causa um aumento na liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que participam da inflamação (Das, 2005). A produção de EROs induzida por Ang II, principalmente pela ativação da NADPH oxidase (Griendling *et al.*, 1994), resulta na inativação química do óxido nítrico (NO), impedindo sua habilidade vasodilatadora e de anti-agregação plaquetária (Das, 2005). O estresse oxidativo ativado pela Ang II pode contribuir para aumentar a peroxidação lipídica das LDLs (Keidar *et al.*, 1997), contribuindo para o acúmulo de lipídios na placa aterosclerótica. Outro efeito parácrino de EROs é a regulação da atividade das metaloproteinases pro-MMP-9 e pro-MMP-2 (Rajagopalan *et al.*, 1996), importantes na estabilidade e ruptura da placa (Brasier *et al.*, 2002).

Nos estágios finais da aterosclerose, a Ang II estimula o acúmulo de matrix extracelular diretamente e indiretamente por estimular a produção de TGF- β (Omura *et al.*, 1994). Além disso, ela também promove a produção de inibidor da ativação do plasminogênio-1, o que leva a uma redução no sistema fibrinolítico e provavelmente contribui para a deposição de fibrina e fibrinogênio (Vaughan *et al.*, 1995).

A Ang-(1-7), em contraste a Ang II, tem ação antiproliferativa em células da musculatura lisa vascular (CMLV) e reduz a formação de neoíntima (Strawn *et al.*, 1999 e Tallant *et al.*, 1999). Em infusão contínua, esse peptídeo tem ação antitrombótica

através da liberação de NO e prostaglandina (PGL2) e, *in vitro*, reduz a adesão plaquetária (Kucharewicz *et al.*, 2000). Além disso, a Ang-(1-7) bloqueia os efeitos pró-oxidantes da Ang II, reduzindo a produção do ânion superóxido (Polizio *et al.*, 2007).

Considerando essas ações vasculares contraregulatórias da Ang-(1-7) em relação às da Ang II e sendo esta última uma molécula aterogênica, pode se especular uma ação antiaterogênica atribuída à Ang-(1-7).

Diversos estudos têm mostrado a participação do SRA na progressão da aterosclerose focalizando principalmente o bloqueio desse sistema, seja através de inibidores da ECA ou por bloqueadores do receptor AT₁ (Strawn *et al.*, 2000; Miyazaki *et al.*, 1999; Uehara *et al.*, 2002 e Kowala *et al.*, 1998). Esses trabalhos confirmam a participação efetiva da Ang II em todas as fases do desenvolvimento da aterosclerose, mas em sua maioria, não se atentam para o papel dos demais peptídeos angiotensinérgicos ativos tais como a Ang-(1-7). Como citado anteriormente, a Ang-(1-7), agindo em seu receptor Mas, possui diversas ações contraregulatórias às da Ang II. Dessa forma, é plausível se especular uma ação contrária efetiva da Ang-(1-7) no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas.

2.4. AVE 0991

Um importante avanço nos estudos relacionados às ações da Ang-(1-7) e suas possíveis aplicações farmacológicas foi a descoberta recente do seu análogo AVE 0991 (Wiemer *et al.*, 2002). Este composto é um agonista do receptor Mas da Ang-(1-7) não-peptídico e ativo oralmente que mimetiza os efeitos dessa angiotensina em muitos tecidos (Santos *et al.*, 2006).

Wiemer e cols. (2002) observaram que o AVE 0991 compete pelos sítios de ligação da Ang-(1-7) e libera óxido nítrico/superóxido com perfil similar ao da Ang-(1-7). Um efeito antidiurético foi atribuído ao AVE 0991, possivelmente através da ligação no receptor Mas, em estudos recentes realizados por Pinheiro e cols. (2004). Em anéis aórticos isolados de murinos esse agonista apresenta um efeito vasodilatador dependente da concentração (Lemos *et al.*, 2005). Em adição, uma potenciação da vasodilatação induzida por acetilcolina tem sido atribuída ao AVE 0991 em ratos Wistar (Faria-Silva *et al.*, 2005). Estudos recentes também mostraram prevenção dos danos em

órgãos-alvo induzidos por tratamento com L-NAME em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Benter *et al.*, 2006). Mais recentemente, Ferreira *et al.* (2007) mostraram que o AVE 0991 tem efeito cardioprotetor sobre o remodelamento cardíaco induzido por isoproterenol.

Compostos não peptídicos são importantes na terapia farmacológica devido à resistência a enzimas proteolíticas e com isso, possibilidade de administração oral. Com a descoberta da ECA2 e das ações do eixo ECA2 – Ang-(1-7) – Mas, substâncias que sejam capazes de interferir nesse eixo podem aparecer como novas classes de drogas para o tratamento de doenças renais e cardiovasculares (Santos *et al.*, 2006). Dessa forma, o AVE 0991 se torna um candidato promissor nas terapias de doenças cardiovasculares.

2.5. O hamster como modelo no estudo de hipercolesterolemia e aterosclerose

A maioria das informações existentes que basearam nosso entendimento sobre o processo aterosclerótico tem sido adquirida através de estudos em animais. Neste contexto, vários modelos animais têm sido usados no estudo da hipercolesterolemia e aterosclerose. Ratos são resistentes ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, mesmo com dietas ricas em colesterol. Esse fato pode ser explicado pela ausência, nesse modelo, da proteína de transferência do éster de colesterol (CETP), e pela HDL ser a principal proteína transportadora de colesterol (Moghadasian *et al.*, 2002). Coelhos têm sido utilizados como modelo de aterosclerose pelo rápido desenvolvimento de lesões aórtica (Daley *et al.*, 1994). Porém eles são totalmente vegetarianos e possuem metabolismo do colesterol diferentes dos humanos (Nistor *et al.*, 1987).

O hamster (*Mesocricetus auratus*) tem sido amplamente empregado em estudos sobre aterosclerose devido a inúmeras características que fazem desse animal um excelente modelo para essa patologia (Pien *et al.*, 2002). Eles são onívoros, têm baixo custo para aquisição e manutenção, são susceptíveis ao desenvolvimento das lesões ateroscleróticas (Nistor *et al.*, 1987), além de possuírem composição celular e não-celular de cada estágio da lesão similares aos humanos (Pien *et al.*, 2002). Hamsters, como humanos, possuem limitada capacidade de síntese de colesterol pelo fígado

(Spady & Dietschy 1988 e Spady *et al.*; 1985), por isso os hepatócitos de ambos não são prontamente adaptados a alterações no fluxo de colesterol, e dessa forma, uma mudança na dieta altera a taxa de transporte pela LDL. Além disso, hamsters, particularmente a raça F₁B, alimentados com uma dieta rica em colesterol e lipídios apresentam elevação dos níveis de colesterol primariamente por aumentar as frações LDL e VLDL (Spady *et al.*, 1985). Hamsters são animais considerados HDL, ou seja, possuem níveis elevados dessa fração, mas a despeito disso, a maioria dos estudos considera esse animal um excelente modelo para estudos sobre a aterosclerose (Bravo *et al.*, 1993; Sicart *et al.*, 1984 e Goulinet & Chapman, 1993).

As lesões ateroscleróticas em hamsters têm sido produzidas com dieta comercial suplementada com diferentes níveis de colesterol e gorduras (Pien *et al.*; 2002 e Wilson *et al.*; 1999). O aparecimento de células em espuma e estrias de gordura na íntima do arco aórtico, típicas das lesões ateroscleróticas iniciais, foram encontradas depois de 4 semanas por Nistor (1987) e 8 semanas por Kowala (1998) ambos utilizando dietas comerciais. Entretanto, em estudos designados para avaliar o efeito de nutrientes específicos e substâncias sintéticas sobre a progressão e regressão da aterosclerose, é essencial uma dieta semi-purificada bem definida (Kahlon *et al.*;1997).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo será avaliar os efeitos do AVE 0991, análogo não peptídico da Angiotensina (1-7), sobre parâmetros cardiovasculares e metabólicos em hamsters submetidos à dieta hipercolesterolêmica.

3.2. Objetivos específicos

Padronizar o modelo para estudo da progressão da aterosclerose.

Avaliar os parâmetros bioquímicos do perfil lipídico de hamsters hipercolesterolêmicos e controles, tratados ou não com AVE 0991.

Avaliar os parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo de hamsters hipercolesterolêmicos e controles, tratados ou não com AVE 0991.

Avaliar a pressão arterial e frequência cardíaca em hamsters controle e submetidos aos procedimentos experimentais (tratados com AVE 0991) e dieta hipercolesterolêmica.

Avaliar, através de análise histológica, o desenvolvimento ou não de lesões ateroscleróticas em hamsters hipercolesterolêmicos e controles, tratados ou não com AVE 0991.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados hamsters machos albinos, com aproximadamente 1 mês de idade, pesando em média 50 g, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.2. Dietas

A dieta controle foi preparada conforme as recomendações da AOAC, 1980. A dieta hipercolesterolêmica diferiu da dieta controle na substituição da gordura de coco por óleo de soja e ausência de colesterol (Tabela 1). Uma maior quantidade de fibra e menor quantidade de amido de milho foram utilizadas na dieta hipercolesterolêmica para que essa se tornasse isocalórica em relação à dieta controle. Ambas as dietas foram preparadas no Laboratório de Nutrição Experimental, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto.

4.3. Desenho experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos (figura 2) de acordo com a dieta recebida e do tratamento ou não com AVE 0991 (0,5mg/Kg):

- Grupo Controle: animais que se alimentavam de dieta controle e não foram tratados com AVE 0991 (0,5mg/Kg).
- Grupo Controle tratado: animais que se alimentavam de dieta controle e foram tratados com AVE 0991 (0,5mg/Kg).
- Grupo Hiper não tratado: animais que se alimentavam de dieta hipercolesterolêmica e não foram tratados com AVE 0991 (0,5mg/Kg).
- Grupo Hiper tratado: animais que se alimentavam de dieta hipercolesterolêmica e foram tratados com AVE 0991 (0,5mg/Kg).

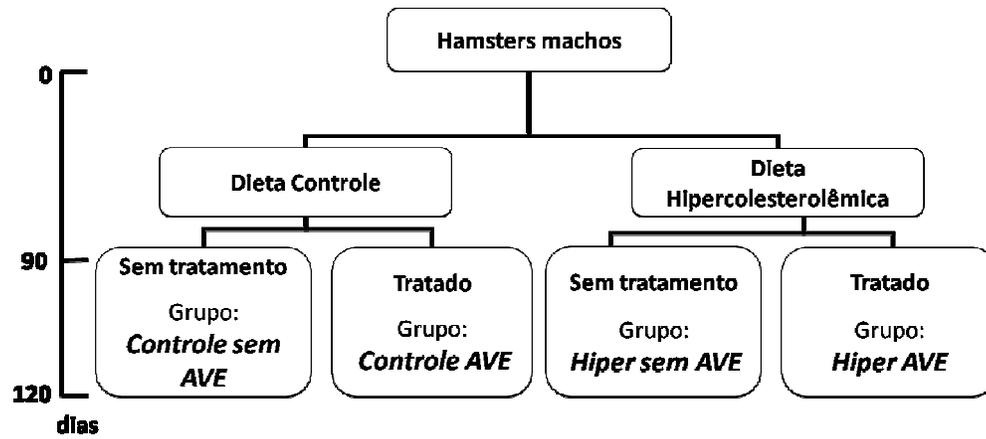


Figura 2. Organograma dos grupos experimentais de acordo com o tipo de dieta e tratamento recebidos.

As dietas foram ministradas a todos os grupos experimentais durante 120 dias. Esse tempo de dieta tem sido caracterizado por apresentar lesões iniciais ateroscleróticas em hamsters (Pien *et al.*, 2002). O peso dos animais foi acompanhado semanalmente. O tratamento com AVE 0991 foi realizado conforme descrito no item 4.4 dos materiais e métodos.

Tabela 1: Composição das dietas controle e hipercolesterolêmica em gramas para cada 1000g de dieta (AOAC Modificada)

Nutrientes	Dieta	
	Controle	Hipercolesterolêmica
Caseína	120	120
Mistura de Sais ^a	50	50
Mistura de Vitaminas ^b	10	10
Óleo*/gordura de coco**	80*	170**
Colesterol	-	5
Colina	4	4
Celulose	10	120
Amido de milho	726,00	521,00
Calorias	4118,4	4153,4

^a**Mistura de sais** (g/kg da mistura): NaCl – 139,3/ KI – 0,79 / MgSO₄ 7H₂O – 57,3 / CaCO₃ –381,4 / MgSO₄ H₂O – 4,01 / FeS O₄ 7H₂O – 27,0 / ZnSO₄ 7H₂O – 0,548 / CuSO₄ 5H₂O – 0,477 / CoCl₂5H₂O – 0,023 / KH₂PO₄ – 389,0. ^b**Mistura de vitaminas (g/Kg de mistura):** acetato de retinol – 2.000.000 IU / colecalciferol – 200.000 IU / ácido p-amino benzóico – 10,00 / I-inositol – 10,00 / niacina – 4,00 / pantotenato de cálcio – 4,00 / riboflavina – 0,80 / tiamina HCL – 0,50 / piridoxina HCL - 0,50 / ácido fólico – 0,20 / biotina – 0,040 / vitamina B₁₂ – 0,003 / sacarose – q.s.p. 1.000 / α -tocoferol – 10.000 IU. *Dieta controle: 80ml de óleo/kg; **Dieta hipercolesterolêmica: 170ml de gordura de coco/Kg.

4.4. Tratamento com AVE 0991

Para o tratamento dos animais com AVE 0991 foi preparada uma solução estoque (10 mg de AVE 0991 em 1 ml de KOH 10 mM). Dessa solução foram obtidas alíquotas de 50 μ L em tubos de polietileno Eppendorf® que permaneceram congeladas até o momento de uso. A cada alíquota foram acrescentados 2,5 ml de água destilada e homogeneizado no aparelho Vórtex.

Os animais receberam diariamente, durante o último mês de experimento, 1 ml dessa solução final de AVE 0991, por gavagem, correspondente a dose de 0,5 mg/kg.

4.5. Amostras Biológicas

4.5.1. Peso corporal e peso de órgãos

O ganho de peso foi determinado, semanalmente a partir do início do protocolo experimental. Ao final do protocolo, os animais foram instrumentados (conforme descrito nos itens 4.8.2; 4.8.3 e 4.8.4 dos materiais e métodos), para avaliações cardiovasculares de pressão arterial média e frequência cardíaca. Após a realização destes experimentos os animais foram sacrificados e o fígado, coração, baço, rins e pulmões foram extraídos, pesados e acondicionados em recipiente protegido da luz contendo solução de formol tamponado a 3,7%. As análises dos pesos dos órgãos foram realizadas pelo peso específico (razão peso do órgão pelo peso corporal).

4.5.2. Obtenção do soro

O soro dos animais foi colhido antes do início do experimento e mensalmente durante a realização do experimento. As amostras de sangue foram colhidas em tubos de polietileno. Os animais em jejum de 8 horas foram anestesiados com éter etílico, o sangue foi obtido através do plexo retroorbital com auxílio de uma pipeta de Pasteur contendo heparina sódica (25000 UI/5 mg) diluída 1:10 e centrifugado a 15000 rpm por 15 minutos para obtenção do soro. No final do experimento, o sangue foi colhido em tubos de polietileno via catéter inserido na artéria femural e centrifugado a 15000 rpm por 15 minutos para a obtenção do soro.

4.6. Parâmetros bioquímicos

4.6.1. Dosagens bioquímicas utilizando kits comerciais

As dosagens das concentrações séricas de colesterol total, HDL-colesterol, triglicérides e a determinação da atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT) foram realizadas conforme as orientações do fabricante dos kits comerciais (Labtest Diagnóstica). Todas as amostras foram lidas no Espectrofotômetro FEMTO 600 Plus.

No Anexo I, encontram-se detalhes da execução e os princípios das técnicas de cada dosagem mencionada acima.

4.6.2. Determinação da atividade da enzima paraoxonase

A dosagem da atividade arilesterase da enzima paraoxonase (PON) foi realizada conforme Beltowski et al. (2002), tendo como base a velocidade de hidrólise do fenilacetato.

Para este procedimento, foi preparada uma solução contendo 1µl de fenilacetato em 1500µl de Tris HCl 9mM pH 8. Dessa solução foi retirado 1ml e misturados com 4ml de Tris HCl 9mM pH 8. A essa solução final foram acrescentados 10µl de soro e a absorbância do teste obtida a 270nm em exatamente 3 minutos. A leitura do branco foi realizada como descrito acima, porém sem a adição da amostra de soro e foi subtraído das absorbâncias obtidas. A atividade enzimática de PON foi expressa em µmoles de produto formado (fenol) por minuto pela diluição final em ml. Foi utilizado o coeficiente de absorvidade do fenilacetato 1310 ($\text{mol/L}^{-1}\text{cm}^{-1}$). As leituras foram realizadas no espectrofotômetro 700S com fonte de luz Ultra Violeta.

4.6.3. Sulfidrilas totais

A determinação dos radicais sulfidrilas foi obtida segundo Sedlak *et al.*, (1968) utilizando o ácido 5,5'-Ditio-bis (2-nitrobenzoico), DTNB (reagente de Ellman), conforme padronização do Laboratório de Nutrição Experimental – ENUT/ UFOP.

Os grupos tióis reagem com DTNB formando um composto colorido, que absorve luz a 412 nm. No ensaio para determinação do SH total foi preparada uma solução padrão contendo 949µl de Trietanolamina-HCl (TEA) e 49 µl de glutathione estoque (12 mg de cisteína + 5ml de TEA). Esta solução foi utilizada para a construção da primeira curva conforme tabela abaixo:

Tabela 2: Diluições da solução padrão em trietanolamina-HCL (TEA).

	0	50	100	250	500	1000
Padrão	0	25	50	125	250	500
TEA	500	475	450	375	250	0

Em seguida, foi obtida a segunda curva de acordo com a tabela 3:

Tabela 3: Quantidades (μ l) dos reagentes utilizados para o preparo da curva padrão necessária para o cálculo das sulfidrilas totais.

	0	50	100	250	500	1000
Padrão 1^a Curva	40	40	40	40	40	40
Tris pH=8,2	150	150	150	150	150	150
DNTB	50	50	50	50	50	50
Metanol	800	800	800	800	800	800

Para cada amostra foi pipetado 40 μ l de soro, 50 μ l de DNTB, 150 μ l de Tris - pH 8,2 e 800 μ l de metanol, centrifugado a 3000 GS durante 5 minutos a 25°C. Foram feitas duas soluções para serem utilizadas como o branco: branco 1 (B1) composto de 50 μ l de DNTB, 150 μ l de Tris - pH 8,2 e 800 μ l de metanol e branco 2 (B2) de 150 μ l de Tris - pH 8,2 e 800 μ l de metanol. A leitura da 2^a curva, das amostras e do B1 foram realizadas no espectrofotômetro FEMTO 600 plus. O B2 foi utilizado para zerar o aparelho. As concentrações são expressas em μ mol/L.

4.6.4. Determinação da atividade da catalase

A dosagem da atividade da enzima catalase foi modificada de Beutler (1975), sendo realizada conforme padronização do Laboratório de Nutrição Experimental – ENUT/ UFOP.

A atividade da catalase foi determinada medindo-se a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) cineticamente, durante 5 minutos, pela leitura espectrofotométrica a 240 nm. Para o ensaio, utilizaram-se 40 μ l de água destilada, 50 μ l de tampão fosfato, 10 μ l de soro e 900 μ l de solução H_2O_2 20mM preparada no momento da leitura. Para cada amostra havia um branco (990 μ l de tampão fosfato + 10 μ l de soro). Os cálculos consideram o valor de 39,4 $M^{-1} cm^{-1}$ como coeficiente de absorvidade do peróxido de hidrogênio. A atividade da catalase foi expressa como μ moles de substrato (H_2O_2) reduzido por minuto a 37°C.

4.7. Avaliação dos parâmetros cardiovasculares

4.7.1. Anestesia

Para a implantação da cânula na artéria femural, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uretana na dose 1,2 g/ kg.

4.7.2. Confeção da cânula implantada na artéria

Na confecção da cânula foram utilizados tubos de polietileno PE 10 de 2 cm, soldado por aquecimento a outro tubo de polietileno PE 50 de 15 cm. Antes de ser implantada, a cânula foi preenchida com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e a extremidade do PE 50 foi obstruída com um pino de metal.

4.7.3. Canulação da artéria aorta abdominal

Os animais foram colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica realizando-se uma pequena incisão na pele da pata traseira direita, separando a musculatura para localização do feixe vículo-nervoso femural. A cânula foi introduzida na aorta abdominal, via artéria femural, para registro dos parâmetros cardiovasculares e amarradas junto ao feixe com fio cirúrgico. Em seguida, foi injetada na cânula 0,5 ml de salina heparinizada (heparina sódica 25.000 UI / 5 ml) a fim de se evitar a formação de coágulo durante o registro da PA e posteriormente foi conectada ao

transdutor. Depois do registro da pressão arterial, o sangue foi colhido via cânula como descrito anteriormente (item 4.5.2).

4.7.4. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

A pressão arterial foi monitorada por um transdutor de pressão modelo Gould conectado a um amplificador (PM-1000, CWE). O sinal de pressão arterial pulsátil é derivado para um cardiômetro (PM-1000, CWE) para se obter a frequência cardíaca e para um registrador (Gould). A pressão arterial pulsátil e frequência cardíaca foram continuamente amostradas por um sistema de conversão analógico/digital de 12 bits (Powerlab 4. 0. 4) a uma frequência de 800 Hz e armazenados em disco rígido (PC). Posteriormente, o sinal foi processado por um software (Powerlab 4. 0. 4) para se obter a pressão arterial média (PAM), as características temporais e as alterações máximas dos parâmetros desejados.

4.8. Análise histopatológica

Para avaliar as alterações histopatológicas no tecido hepático foram coletados fragmentos do fígado e processados em processador histológico (OMA Metalúrgica) através de banhos sucessivos com duração de 60 minutos de álcool (70%, 80% e 90%), álcool absoluto, xilol e parafina, respectivamente. Este material foi fixado em blocos de parafina. Os blocos contendo os fragmentos de tecidos foram submetidos à microtomia com 4 µm de espessura. Foi realizada a coloração de rotina Hematoxilina-Eosina (HE) para uma observação geral das possíveis alterações histopatológicas. Todo o processo de coloração e montagem de lâminas era realizado em capela (GP Científica).

Os tecidos cardíaco e aórtico foram retirados do formol, lavados, congelados, e incluídos em Tissue - Tek® para cortes em criostato à -30°C. Foram realizados cortes semi-seriados com 20 µm de espessura e corados pelo Sudam III para visualização de possíveis acúmulos de lipídios.

4.9. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos com médias \pm EPM. A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se ANOVA Two-way seguido de *post hoc* de Bonferroni quando apropriado. Comparações entre antes e depois do tratamento no mesmo animal foram feitas pelo teste “t” de Student para observações pareadas. Para observações entre animais diferentes foi utilizado o teste “t” de Student não pareado. Estas análises foram realizadas no *software* Graphpad Prism Project (versão 4.00). Foram consideradas diferenças significativas para $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Parâmetros biológicos

5.1.1. Ganho de peso corporal e peso dos órgãos

A figura 3 apresenta o ganho de peso final após 120 dias do protocolo experimental em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991. Verificamos que tanto o tratamento quanto a dieta não influenciaram significativamente o ganho de peso corporal final entre os grupos (Controle: $46,73 \pm 1,32$ g, n=11; Controle AVE: $57,71 \pm 4,77$ g, n=7; Hiper: $55,7 \pm 3,37$ g, n=10; Hiper AVE: $56,11 \pm 4,26$ g, n=9). Além disso, não houve interação entre o tratamento com AVE 0991 e o tipo de dieta ($p > 0,05$).

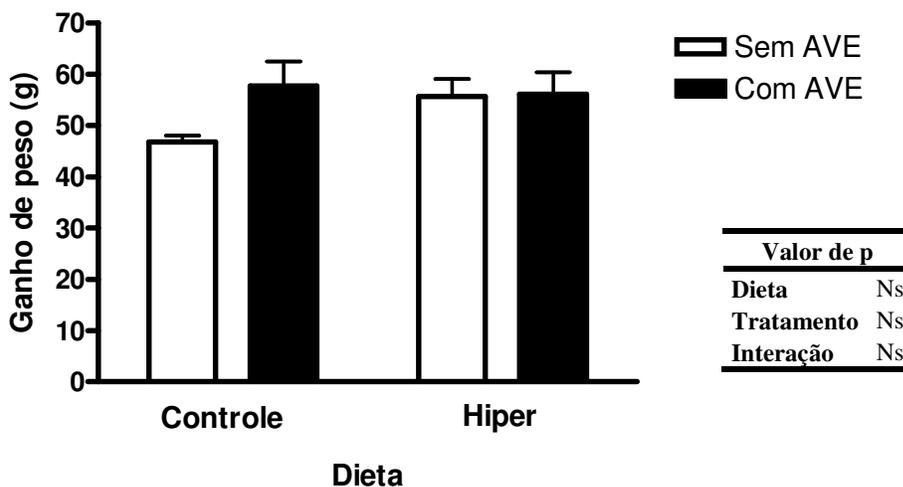


Figura 3: Ganho de peso (g) em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica (Hiper), tratados (Controle AVE, n=7; Hiper AVE, n=9) ou não com AVE 0991 (0,5mg/Kg) (Controle, n=11; Hiper, n=10). Os dados são expressos como média \pm erro padrão; diferença significativa, $p < 0,05$. NS= Não significativo, $p > 0,05$

5.1.2. Peso dos órgãos

Os dados da tabela 4 mostram a relação peso órgão/peso corporal do coração, fígado e baço, em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991. A dieta e o tratamento não interferiram significativamente no peso do coração, assim como também não houve interação entre o tratamento e a dieta ($p > 0,05$).

Ao observarmos o peso relativo do fígado, verificamos que os grupos que receberam dieta hiper apresentaram um aumento significativo no peso do fígado em relação aos animais do grupo controle ($p < 0,05$). Através da ilustração da figura 4 pode-se notar os tamanhos acentuadamente diferentes dos fígados entre os grupos controle (sem tratamento em A e tratados em C) e hiper (sem tratamento em B e tratados em D). O tratamento com AVE 0991 não influenciou significativamente o peso do fígado dos animais ($p > 0,05$) e também não houve interação entre o tratamento e a dieta ($p > 0,05$). A figura 4 ilustra também o aspecto macroscópico do fígado dos animais, sendo possível observar uma coloração esbranquiçada no fígado daqueles que receberam dieta hiper (B e D), devido ao aumento na concentração lipídica nesse órgão.

O peso relativo do baço não foi influenciado pela dieta ($p > 0,05$) ou tratamento com AVE 0991 ($p > 0,05$). Não houve interação entre o tratamento com AVE 0991 e a dieta ($p > 0,05$).

Os dados da tabela 5 mostram a relação peso órgão/peso corporal dos rins direito e esquerdo e do pulmão, em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991. Verifica-se que o peso relativo dos rins, tanto direito quanto esquerdo, foi influenciado significativamente pela dieta, sendo que os animais que recebiam dieta hiper apresentavam valores significativamente menores em relação aos animais que receberam dieta controle ($p < 0,05$). O tratamento com AVE 0991 não influenciou no peso relativo dos rins, assim como também não houve interação entre o tratamento e a dieta ($p > 0,05$).

Em relação ao peso relativo do pulmão, verificamos que este não foi influenciado pela dieta ($p > 0,05$) ou tratamento com AVE 0991 ($p > 0,05$). Não houve interação entre o tratamento com AVE 0991 e a dieta ($p > 0,05$).

Tabela 4: Peso relativo do coração, fígado e baço (mg/g de peso corporal) em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991.

Grupo experimental	Relação peso órgão/ peso corporal		
	Coração	Fígado	Baço
Controle	5,7 ± 0,13	34,7 ± 0,76	1,1 ± 0,09
Hiper	5,4 ± 0,13	57,7 ± 1,04 *	0,9 ± 0,06
Controle AVE	5,6 ± 0,17	30,8 ± 0,49	1,0 ± 0,05
Hiper AVE	5,5 ± 0,08	58,8 ± 0,55 *	0,9 ± 0,05
Valor de p			
Dieta	Ns	< 0,05	Ns
Tratamento	Ns	Ns	Ns
Interação	Ns	Ns	Ns

Os resultados são expressos como média ± erro padrão; * em relação aos grupos controles, $p < 0,05$. NS= Não significativo, $p > 0,05$. Legenda: Hiper = Dieta Hiper sem Tratamento com AVE, n=10; Controle = Dieta controle sem Tratamento com AVE, n=8; Hiper AVE = Dieta Hiper com Tratamento de AVE, n=9; Controle AVE = Dieta Controle com tratamento de AVE, n=7.

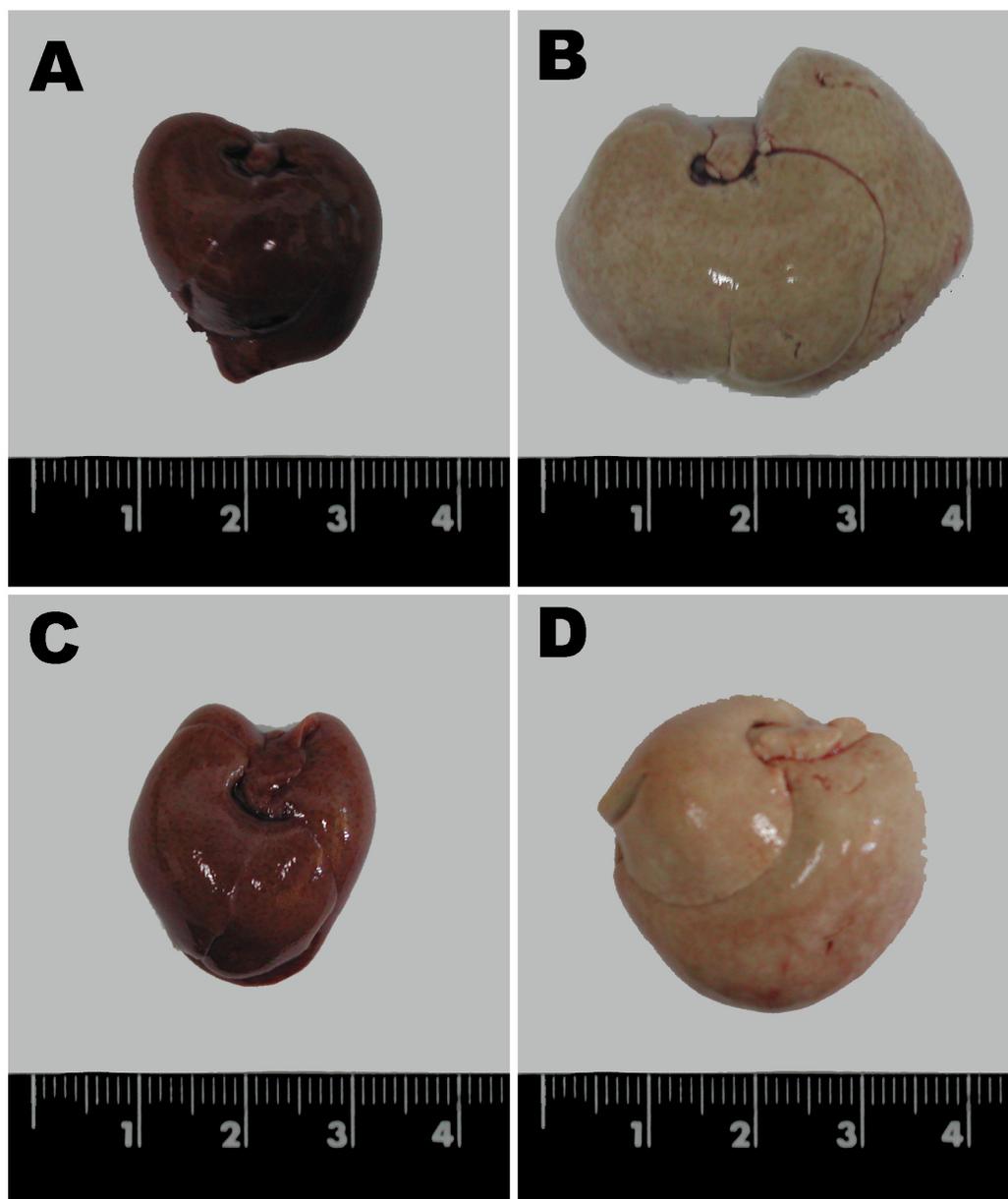


Figura 4: Fotos ilustrativas dos fígados de hamsters alimentados com dieta controle (sem tratamento, painel A; e tratados, painel C) ou hipercolesterolêmica (sem tratamento, painel B; e tratados, painel D). ABCD (X3,5). Escala: cm.

Tabela 5: Peso relativo dos rins direito e esquerdo e do pulmão (mg/g de peso corporal) em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991.

Grupo experimental	Relação peso órgão/ peso corporal		
	Rim D	Rim E	Pulmão
Controle	3,4 ± 0,14	3,7 ± 0,18	5,4 ± 0,16
Hiper	3,1 ± 0,07*	3,2 ± 0,07*	5,1 ± 0,14
Controle AVE	3,2 ± 0,12	3,6 ± 0,24	5,1 ± 0,39
Hiper AVE	3,0 ± 0,08*	3,2 ± 0,09*	4,9 ± 0,12
Valor de p			
Dieta	< 0,05	< 0,05	Ns
Tratamento	Ns	Ns	Ns
Interação	Ns	Ns	Ns

Os resultados são expressos como média ± erro padrão; * em relação aos grupos controles, $p < 0,05$. NS= Não significativo, $p > 0,05$. Legenda: Hiper = Dieta Hiper sem Tratamento com AVE, n=10; Controle = Dieta controle sem Tratamento com AVE, n=8; Hiper AVE = Dieta Hiper com Tratamento de AVE, n=9; Controle AVE = Dieta Controle com tratamento de AVE, n=7. Rim D = rim direito; Rim E = rim esquerdo.

5.2. Parâmetros bioquímicos

5.2.1. Lipídios: níveis séricos de colesterol total, HDL, n-HDL, razão HDL/n-LDL e triglicérides.

A figura 5 apresenta os níveis séricos de colesterol total em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica. Observa-se que não houve diferença significativa no nível basal, antes de iniciar a administração da dieta, entre os grupos controle e hipercolesterolêmico ($p > 0,05$). Após 30 dias do início da administração das dietas verifica-se uma elevação significativa no nível de colesterol para o grupo hiper

quando comparado ao controle (Controle 30 dias: $73,0 \pm 3,8$ mg/dL, $n=14$ e Hiper 30 dias: $284,0 \pm 8,0$ mg/dL, $n= 20$). Esse aumento nos níveis de CT se manteve durante todo o curso do experimento, porém não aumentou proporcionalmente ao tempo de dieta (Controle 60 dias: $80,8 \pm 2,8$ mg/dL, $n=14$ e Hiper 60 dias: $328,2 \pm 29,3$ mg/dL, $n= 20$; Controle 90 dias: $88,6 \pm 3,4$ mg/dL, $n=13$ e Hiper 90 dias: $303,5 \pm 22,4$ mg/dL, $n= 20$; Controle 120 dias: $82,0 \pm 4,2$ mg/dL, $n=13$ e Hiper 120 dias: $301,1 \pm 13,7$ mg/dL, $n= 20$).

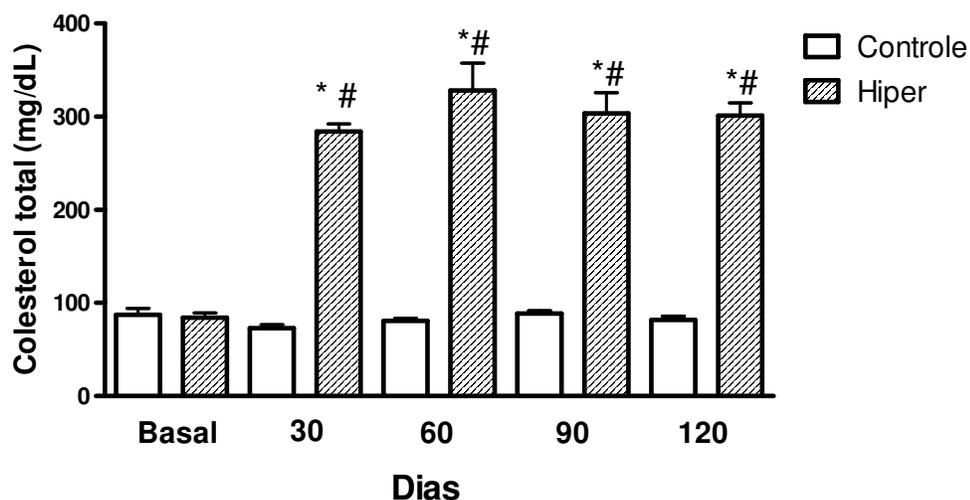


Figura 5: Níveis séricos de colesterol total em hamsters alimentados com dieta controle ($n= 13$) ou hipercolesterolêmica ($n=20$). Valores expressos em média \pm erro padrão da média. * $p<0,05$ em comparação a dieta controle. # $p<0,05$ em comparação ao CT no tempo basal (teste “t” de Student para observações pareadas e não pareadas).

O tratamento com AVE 0991 não influenciou significativamente os níveis de CT ($p > 0,05$) em ambos os grupos, como mostra os dados da tabela 6 e não houve interação entre tratamento e dieta ($p > 0,05$). Também não houve diferença significativa entre os níveis de CT antes e após o tratamento com AVE 0991, tanto no grupo controle quanto no grupo hiper ($p > 0,05$).

Em relação aos níveis séricos de colesterol presentes na lipoproteína HDL (figura 6) em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991, pode-se observar que a dieta teve efeito significativo, no qual os animais dos grupos que receberam dieta hiper (Hiper: $140,5 \pm 7,3$ mg/dL, $n= 20$ e Hiper AVE = $124,8 \pm 6,9$ mg/dL, $n=9$) apresentaram elevação significativa do colesterol HDL

em relação aos grupos que receberam dieta controle (Controle: $36,5 \pm 1,7$ mg/dL, n=13 e Controle AVE: $37,8 \pm 2,9$ mg/dL, n=7). Não houve efeito do tratamento e nem interação entre a dieta e o tratamento com AVE 0991 sobre os níveis de HDL colesterol ($p > 0,05$).

Tabela 6: Níveis séricos de colesterol total em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991 (0,5mg/Kg), antes e após tratamento.

Tempo	Grupo experimental	
	Controle AVE	Hiper AVE
Antes (90 dias -mg/dL)	$82,7 \pm 13,1$	$256,3 \pm 11,6$
Após (120 dias - mg/dL)	$99,0 \pm 8,5$	$256,8 \pm 21,6$

Valores expressos em média \pm erro padrão da média. (teste “t” de Student para observações pareadas).
Legenda: Hiper AVE = Dieta Hiper com Tratamento de AVE, n=9; Controle AVE = Dieta Controle com tratamento de AVE, n=7.

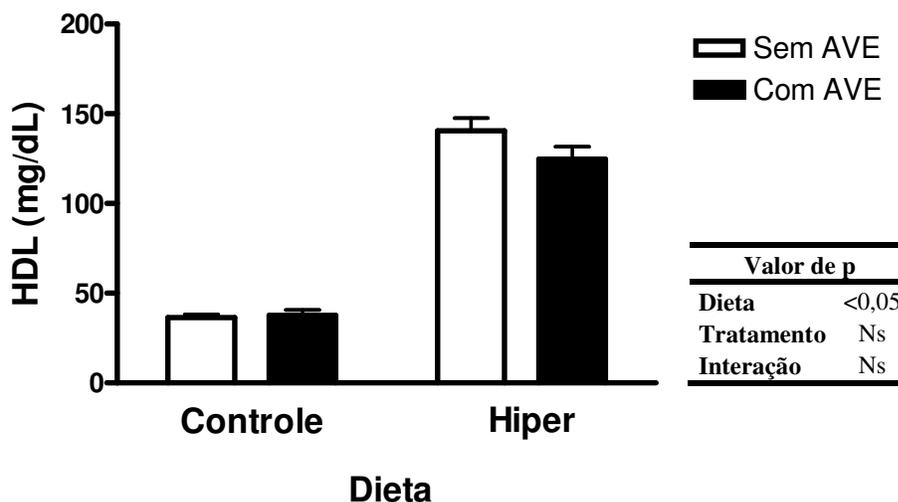


Figura 6: Níveis séricos da fração HDL em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados (Controle AVE, n=7; Hiper AVE, n=9) ou não com AVE 0991 (0,5mg/Kg) (Controle, n=13; Hiper, n=20). Os dados são expressos como média \pm erro padrão; $p < 0,05$. NS= Não significativo, $p > 0,05$.

A figura 7 mostra os níveis séricos de colesterol presentes nas demais frações lipoprotéicas, não HDL (n-HDL), em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991. Os animais que receberam dieta hiper (Hiper: $160,6 \pm 10,9$ mg/dL, n=20 e Hiper AVE: $132,0 \pm 16,8$ mg/dL, n=9) apresentaram valores de colesterol n-HDL superiores em relação aos animais que receberam dieta controle (Controle = $45,5 \pm 3,8$ mg/dL, n= 13 e Controle AVE = $61,2 \pm 6,7$ mg/dL, n=7). Assim como observado para os valores de HDL, não houve efeito do tratamento ($p > 0,05$) e interação entre a dieta e o tratamento com AVE 0991 sobre os níveis do colesterol n-HDL ($p > 0,05$).

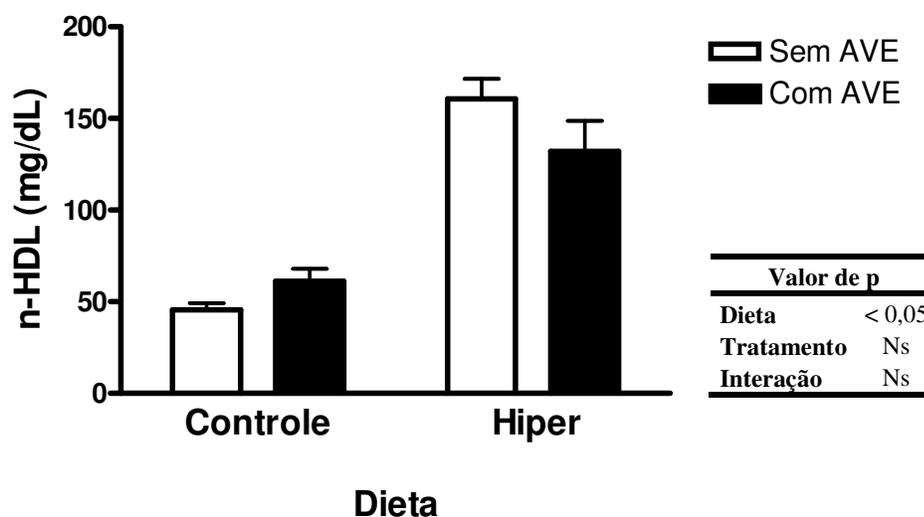


Figura 7: Níveis séricos do colesterol presente nas frações n-HDL em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados (Controle AVE, n=7; Hiper AVE, n=9) ou não com AVE 0991 (Controle, n=13; Hiper, n=20). Os dados são expressos como média \pm erro padrão; $p < 0,05$. NS= Não significativo, $p > 0,05$.

Observando-se a relação entre as frações n-HDL/HDL (figura 8), nota-se que a dieta diminuiu significativamente essa razão (Hiper: $1,20 \pm 0,1$ n=20; Hiper AVE: $1,05 \pm 0,11$ n=9; Controle: $1,29 \pm 0,13$ n=13; Controle AVE: $1,64 \pm 0,17$ n=7). Não houve efeito significativo do tratamento com AVE 0991 sobre os valores da razão entre as frações lipoprotéicas n-HDL/HDL ($p > 0,05$). A interação entre o tratamento e a dieta não foi significativa ($p > 0,05$).

A figura 9 apresenta os níveis séricos de triglicérides em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991. Verifica-se que a dieta hipercolesterolêmica elevou significativamente os valores séricos de

triglicérides (Hiper: $159,8 \pm 15,2$ mg/dL, n=16; Hiper AVE: $170,4 \pm 5,99$ mg/dL, n=9) quando comparada à dieta controle (Controle: $110,9 \pm 14,7$ mg/dL, n=11; Controle AVE: $131,2 \pm 7,10$ mg/dL, n=7). Não houve efeito do tratamento com AVE 0991 ou interação entre tratamento com AVE e o uso da dieta ($p > 0,05$).

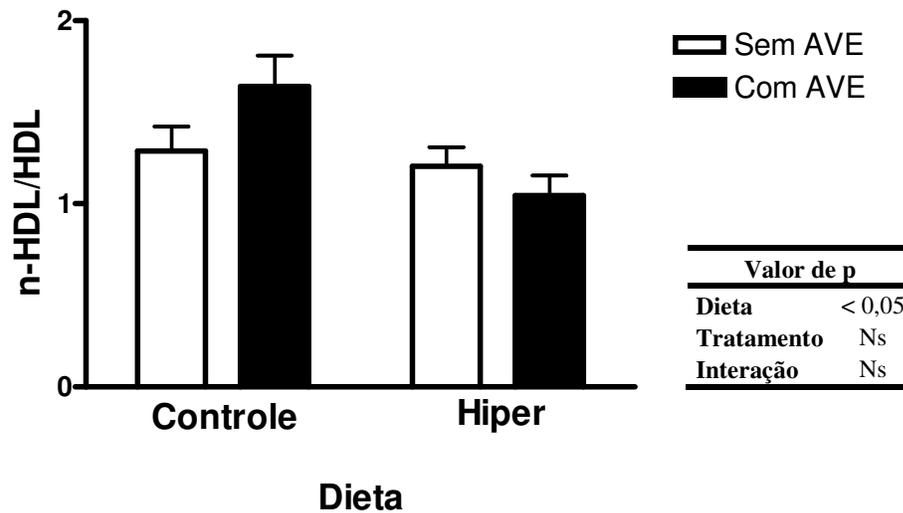


Figura 8: Razão entre a frações de colesterol n-HDL/HDL em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados por 30 dias (Controle AVE, n=7; Hiper AVE, n=9) ou não com AVE 0991(0,5mg/Kg) (Controle, n=13; Hiper, n=20). Os dados são expressos como média \pm erro padrão; diferença significativa, $p < 0,05$. NS= Não significativo, $p > 0,05$.

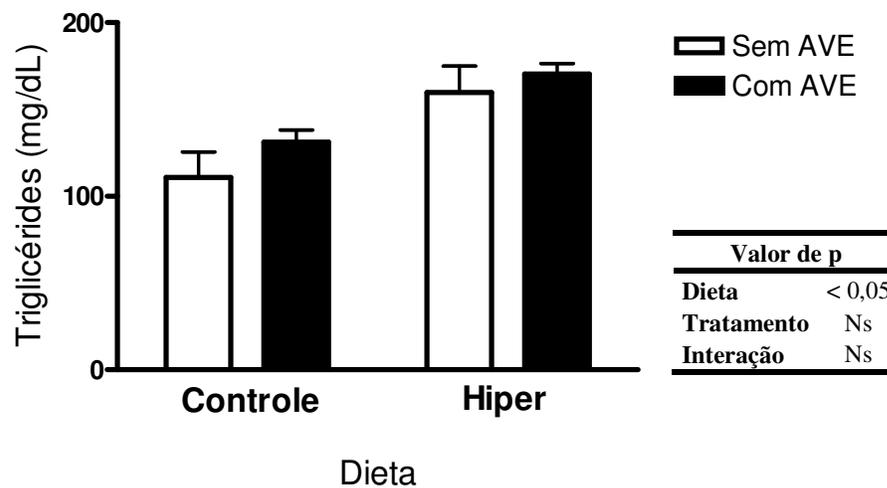


Figura 9: Os níveis séricos de triglicérides em hamsters alimentados por 120 dias com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados (Controle AVE, n=7; Hiper AVE, n=9) ou não com AVE 0991(0,5mg/Kg) (Controle, n=11; Hiper, n=16). Os dados são expressos como média \pm erro padrão; diferença significativa, $p < 0,05$. NS= Não significativo, $p > 0,05$.

5.2.2. Função hepática: alanina aminotransferase (ALT)

A atividade enzimática da ALT (figura 10) foi significativamente maior nos animais que receberam a dieta hipercolesterolêmica (Hiper: $117,3 \pm 8,87$ Um/ml, $n=10$ e Hiper AVE: $125,1 \pm 8,88$ Um/ml, $n=9$) quando comparados aos animais que receberam dieta controle (Controle: $42,97 \pm 11,25$ Um/ml, $n=6$ e Controle AVE: $65,14 \pm 12,83$ Um/ml, $n=7$). O tratamento com AVE 0991, bem como a interação entre o tratamento e a dieta não provocaram qualquer efeito sobre a atividade da ALT ($p > 0,05$).

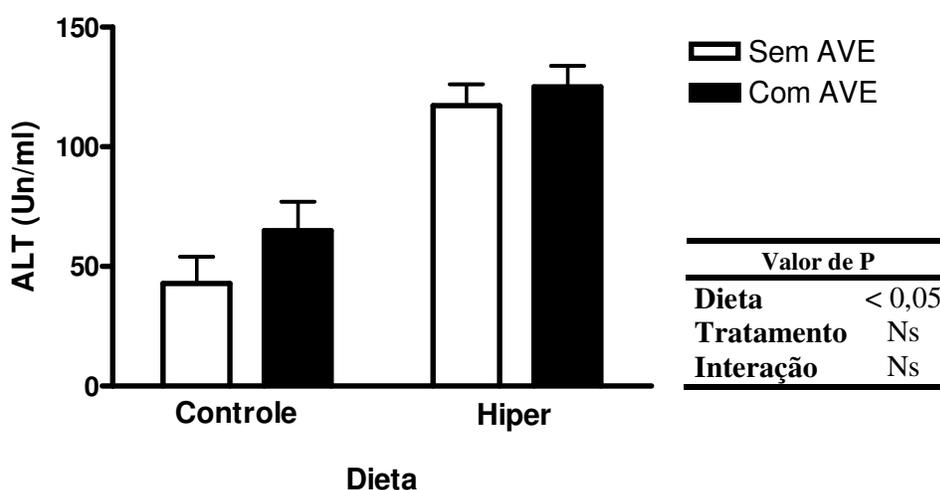


Figura 10: Atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT) em hamsters alimentados por 120 dias com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados (Controle AVE, $n=7$; Hiper AVE, $n=9$) ou não com AVE 0991 ($0,5\text{mg/Kg}$) (Controle, $n=6$; Hiper, $n=10$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão; $p < 0,05$. NS= Não significativo, $p > 0,05$.

5.2.3. Estresse oxidativo: catalase, paraoxonase (PON) e sulfidrilas totais

A figura 11 apresenta a atividade da enzima catalase em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991. A atividade dessa enzima apresentou-se significativamente elevada nos animais que receberam a dieta hipercolesterolêmica (Hiper: $0,2249 \pm 0,0321$ $\mu\text{moles/min}$, $n=16$; Hiper AVE: $0,1777 \pm 0,0259$ $\mu\text{moles/min}$, $n=9$) quando comparados aos animais que receberam a dieta controle (Controle: $0,1142 \pm 0,0083$ $\mu\text{moles/min}$, $n=10$; Controle AVE: $0,0761 \pm 0,016$ $\mu\text{moles/min}$, $n=6$). Verifica-se ainda, que o tratamento com AVE

0991 não influenciou a atividade da catalase ($p > 0,05$). Não houve interação significativa entre a dieta e o tratamento com AVE 0991 ($p > 0,05$).

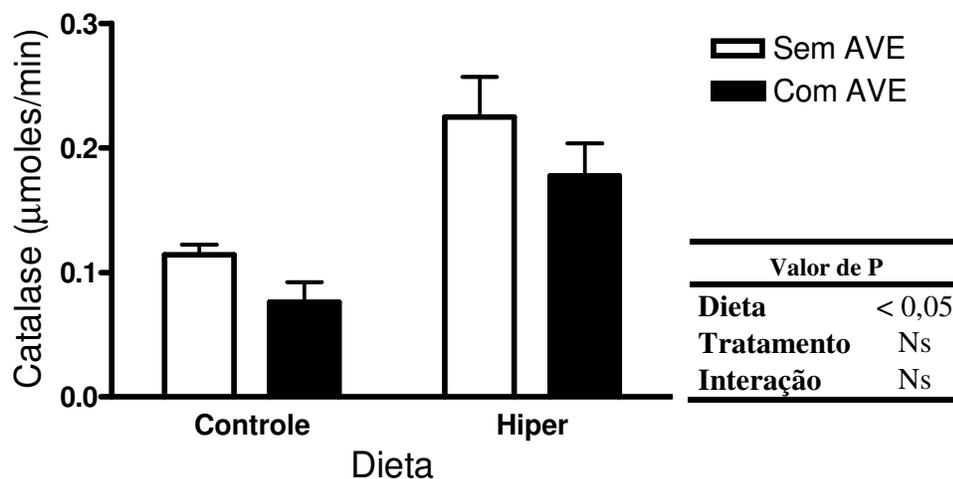


Figura 11: Atividade da enzima catalase em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados (Controle AVE, $n=6$; Hiper AVE, $n=9$) ou não com AVE 0991 (0,5mg/Kg) (Controle, $n=10$; Hiper, $n=16$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão; $p < 0,05$. NS= Não significativo, $p > 0,05$.

Em relação à atividade arilesterase da paraoxonase (PON) (figura 12) verifica-se que os animais que foram tratados com AVE 0991 (Hiper AVE: $0,2959 \pm 0,0364$ $\mu\text{moles/min}$, $n=7$ e Controle AVE: $0,2661 \pm 0,0199$ $\mu\text{moles/min}$, $n=7$) apresentaram diminuição significativa em relação aos animais que não receberam tratamento (Hiper: $0,4099 \pm 0,0253$ $\mu\text{moles/min}$, $n=19$ e Controle: $0,3771 \pm 0,0152$ $\mu\text{moles/min}$, $n=12$). O tipo de dieta não alterou a atividade da PON e não houve interação entre o tratamento com AVE 0991 e a dieta ($p > 0,05$).

A figura 13 apresenta os valores das sulfidrilas totais em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE 0991. Verifica-se que tanto a dieta, o tratamento quanto a interação de ambos influenciaram significativamente na quantidade de radicais sulfidrilas presentes no soro. Os níveis de sulfidrilas foram maiores nos animais que receberam dieta controle (Controle: $375,6 \pm 26,0$ Um/ml , $n=13$; Controle AVE: $645,1 \pm 37,10$ Um/ml , $n=7$) em relação aos que receberam dieta hiper (Hiper: $305,4 \pm 25,5$ Um/ml , $n=18$; Hiper AVE: $287,2 \pm 61,0$ Um/ml , $n=7$). O tratamento com AVE 0991 aumentou significativamente os valores de sulfidrilas séricas nos grupos experimentais e houve interação entre tratamento e dieta.

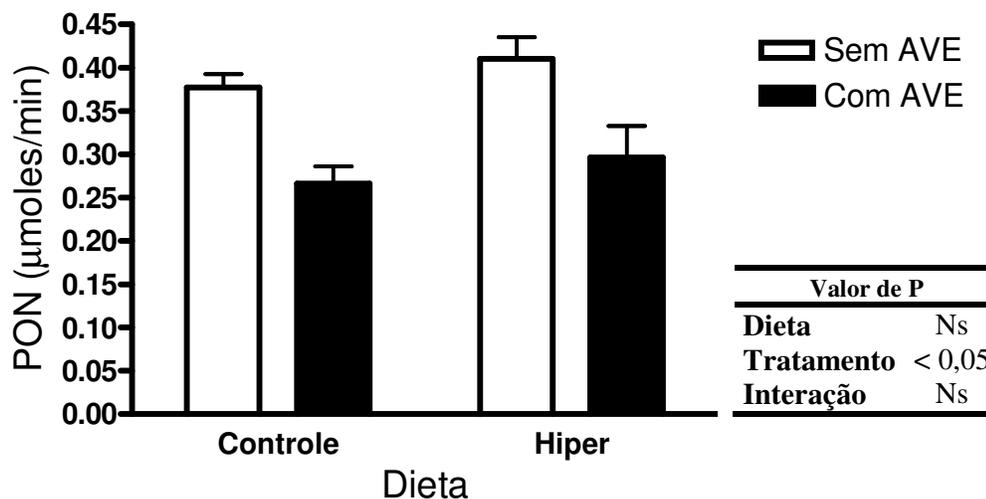


Figura 12 Atividade da enzima paraoxonase (PON) em hamsters alimentados por 120 dias com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados (Controle AVE, n=7; Hiper AVE, n=7) ou não com AVE 0991 (0,5mg/Kg) (Controle, n=12; Hiper, n=19). Os dados são expressos como média \pm erro padrão; $p < 0,05$. NS= Não significativo, $p > 0,05$.

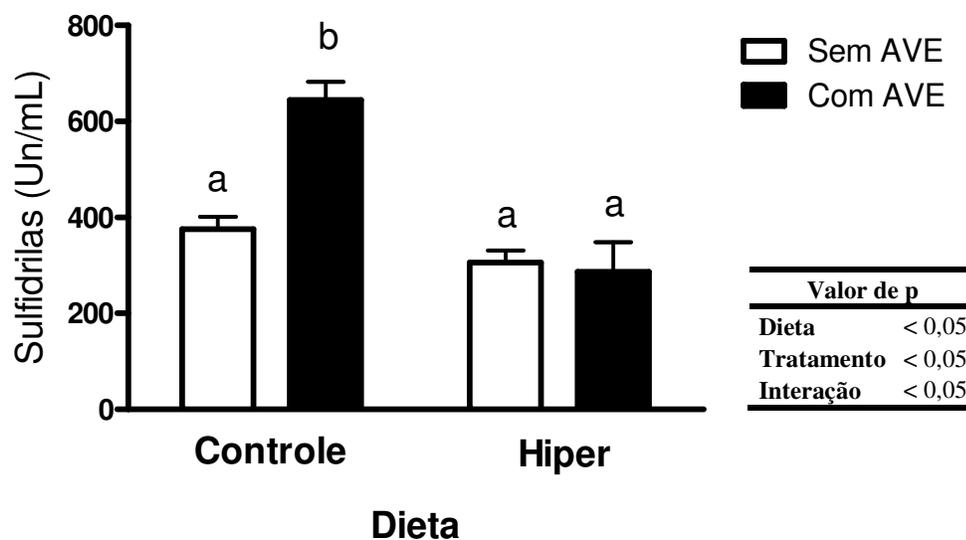


Figura 13: Níveis de sulfidrilas totais em hamsters alimentados por 120 dias com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados (Controle AVE, n=7; Hiper AVE, n=7) ou não com AVE 0991(0,5mg/Kg) (Controle, n=13; Hiper, n=18). Os dados são expressos como média \pm erro padrão; letras superescritas diferentes indicam diferença significativa; $p < 0,05$. NS= Não significativo, $p > 0,05$.

5.3. Parâmetros cardiovasculares: pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC)

As figuras 14 e 15 apresentam os níveis basais de PAM (mmHg) e FC (bpm) em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados ou não com AVE (0,5mg/Kg), respectivamente. Os níveis da PAM (Hiper: $93,4 \pm 1,1$ mmHg, n=10; Hiper AVE: $94,8 \pm 3,1$ mmHg, n=9; Controle: $87,9 \pm 5,3$ mmHg, n=6; Controle AVE: $91,4 \pm 2,0$ mmHg, n=7) e da FC (Hiper: $484,5 \pm 6,6$ bpm, n=10; Hiper AVE: $471,5 \pm 11,2$ bpm, n=9; Controle: $469,6 \pm 11,0$ bpm, n=6; Controle AVE: $442,1 \pm 23,5$ bpm, n=7) não foram alterados significativamente pela dieta, tratamento ou a interação de ambos ($p > 0,05$).

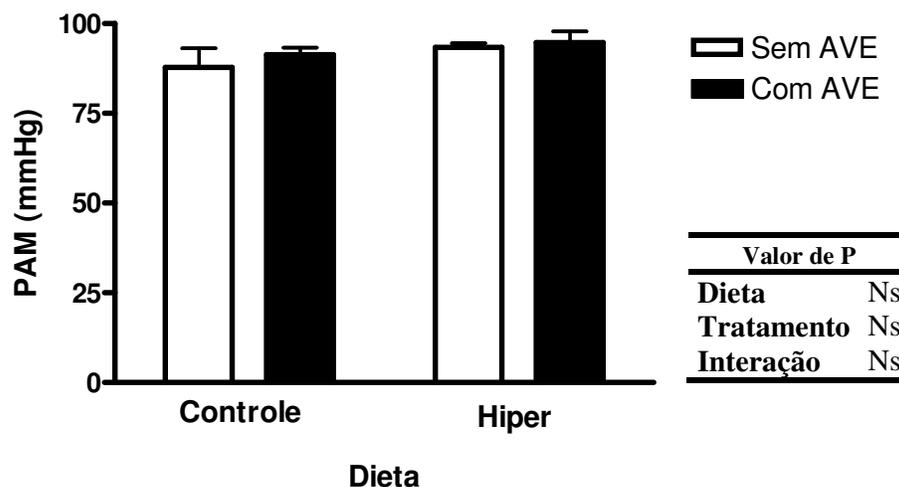


Figura 14: Níveis basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) em hamsters alimentados por 120 dias com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados (Controle AVE, n=7; Hiper AVE, n=9) ou não com AVE 0991 (0,5mg/Kg) (Controle, n=7; Hiper, n=10). Os dados são expressos como média \pm erro padrão; diferença significativa, $p < 0,05$. NS= Não significativo, $p > 0,05$.

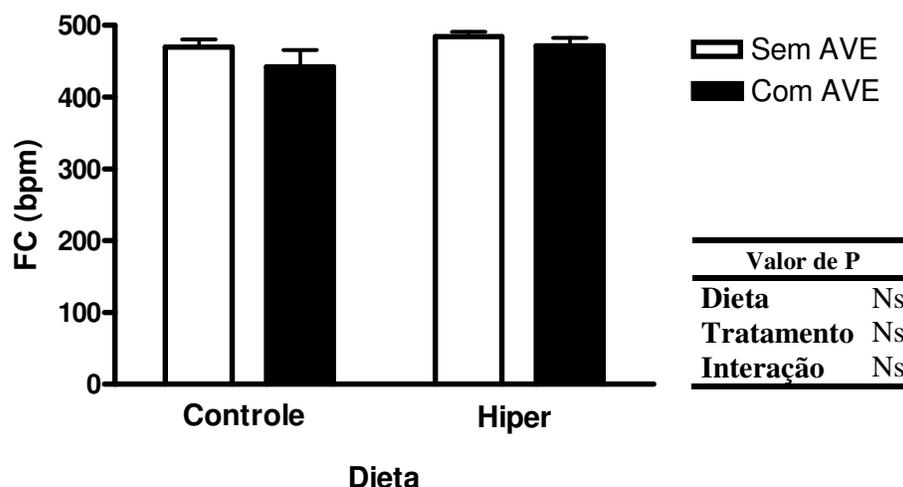


Figura 15: Valores de frequência cardíaca (FC, bpm) em hamsters alimentados por 120 dias com dieta controle ou hipercolesterolêmica, tratados (Controle AVE, n=7; Hiper AVE, n=9) ou não com AVE 0991 (0,5mg/Kg) (Controle, n=7; Hiper, n=10). Os dados são expressos como média \pm erro padrão; diferença significativa, $p < 0,05$. NS= Não significativo, $p > 0,05$

5.4. Análise histopatológica

A análise histopatológica das lâminas de fígado coradas pelo método da Hematoxilina e Eosina (HE) mostrou a presença esteatose microvesicular nos animais do grupo que recebeu dieta hipercolesterolêmica (figura 16, B). As lâminas pertencentes aos animais do grupo controle apresentaram-se compatíveis com a normalidade (figura 16, A).

Na análise da região da válvula aórtica foi observado a presença de placa aterosclerótica em um animal do grupo hipercolesterolêmico (figura 17 B, C e D). Tal alteração foi observada macroscopicamente e fotografada com o auxílio de uma lupa. Nota-se um aspecto amarelado compatível com células carregadas de lipídios e com o auxílio da lupa pôde-se claramente observar a presença de aglomerados lipídicos nessa lesão (figura 17, D). As válvulas aórticas dos animais controles tratados ou não com AVE 0991 não apresentaram quaisquer tipo de lesão (figura 17, A).

Nas lâminas de fragmentos do arco aórtico dos animais do grupo hipercolesterolêmico tratados com AVE 0091 não foram encontradas marcações positivas pelo Sudam III e nenhum tipo de anormalidade (figura 18, B). Entre as lâminas do arco aórtico dos animais do grupo hipercolesterolêmico foi encontrado

presença de células sudanofílicas na túnica íntima da parede arterial (figura 18, C e D). A parede arterial dos animais controles apresentava aspecto compatível com a normalidade, como ilustrado na figura 18A.

Dentre os animais do grupo hipercolesterolêmico também foi encontrado um caso de formação de lesão na parede cardíaca (figura 19, B). Essa lesão estendia-se por todo diâmetro da parede ventricular direita, ocupando também parte do lúmen do ventrículo. Macroscopicamente esta lesão apresentava coloração amarelada e com aspecto gelatinoso ao toque com uma pinça. A análise histológica do material mostrou grande quantidade de marcação positiva pelo Sudam III, principalmente no núcleo da placa, além da presença de células inflamatórias (figura 19, C e D). As paredes ventriculares dos animais do grupo controle apresentavam aspecto compatível com a normalidade (figura 19, A).

Os casos aqui relatados representaram 33,34% dos animais hipercolesterolêmicos analisados (n=9). Não foi encontrado nenhum tipo de lesão ou marcação sudanofílica nos animais dos grupos controle tratado (n=7) ou não com AVE 0991 (n=7) e hipercolesterolêmicos tratados (n=9).

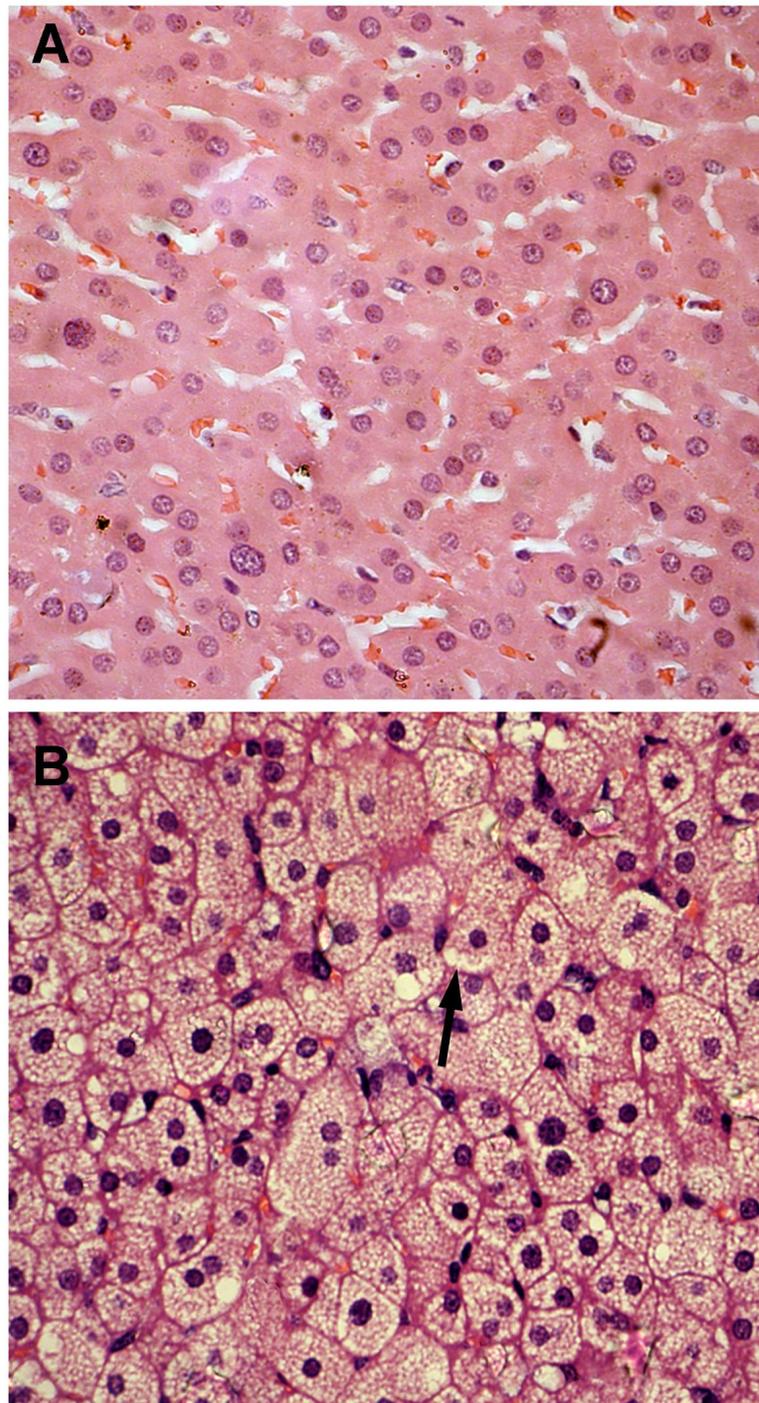


Figura 16: Fotomicrografia do fígado de hamster. (A) Grupo controle. (B) Grupo hipercolesterolêmico evidenciando esteatose microvesicular (seta). Hematoxilina Eosina, AB (500X).

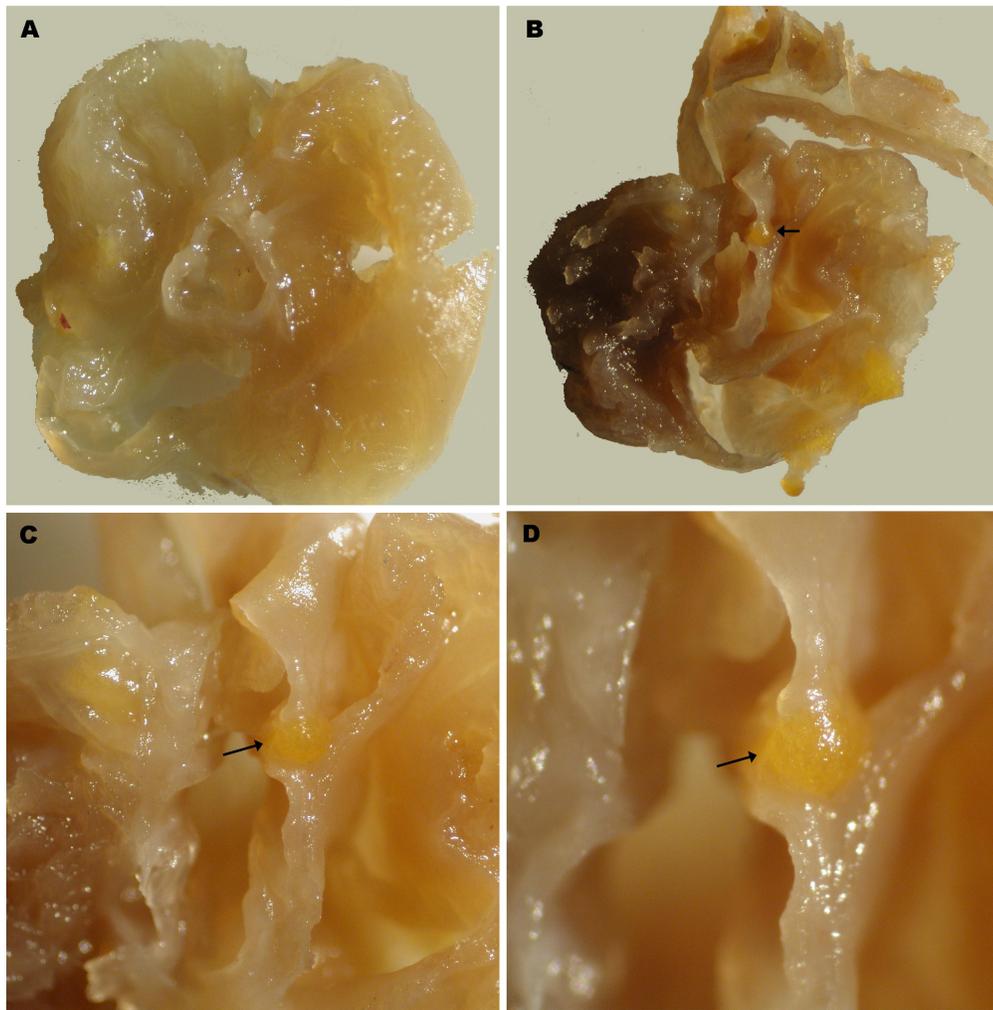


Figura 17: Válvula aórtica de hamster. (A) Grupos controle (A). (B) Grupo hipercolesterolêmico evidenciando placa aterosclerótica presente na parede da válvula aórtica (setas). (C e D) Detalhe de B. (AB, 25X), C (40X), D(50X).

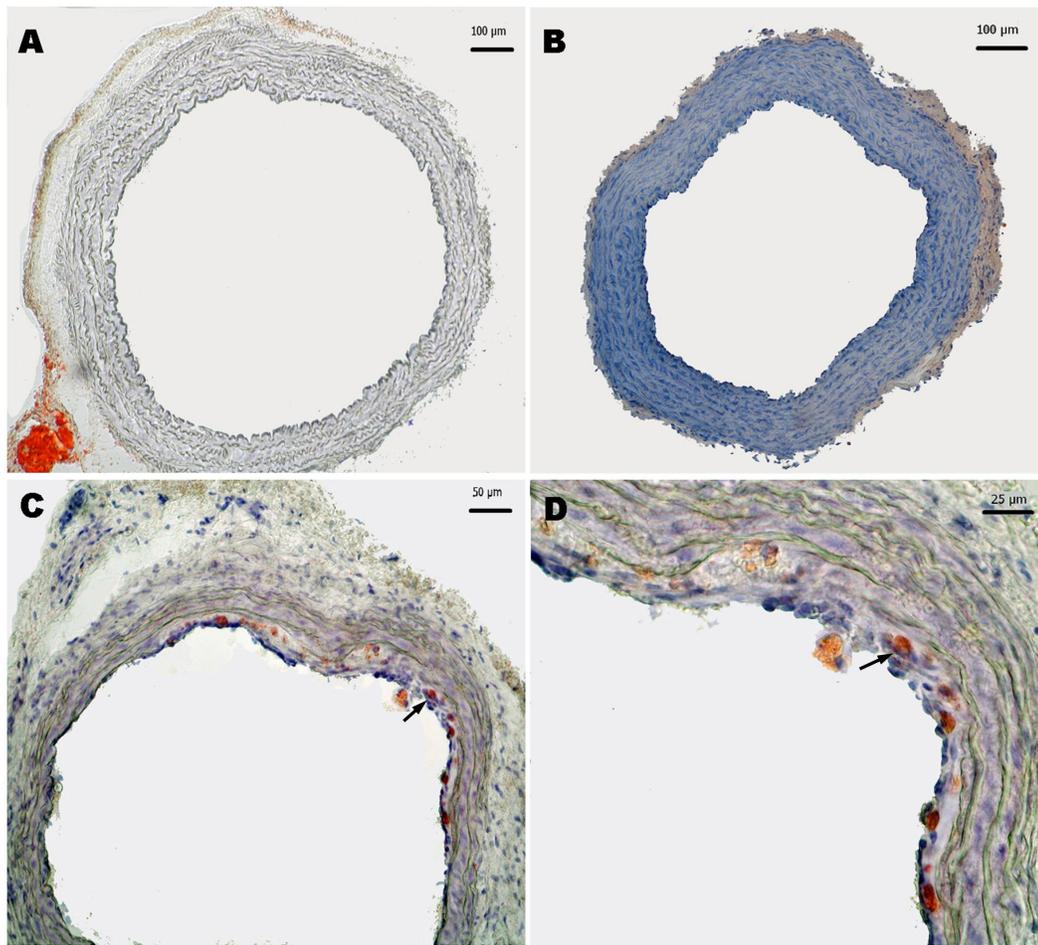


Figura 18: Fotomicrografia da artéria aorta (arco aórtico) de hamster. (A) Grupo controle. (B) grupo hipercolesterolêmico tratado com AVE 0991 evidenciando aspecto histológico compatível com normalidade. (C) Grupo hipercolesterolêmico sem tratamento evidenciando células Sudam III positivas (seta). (D) Detalhe de C. Sudam III.

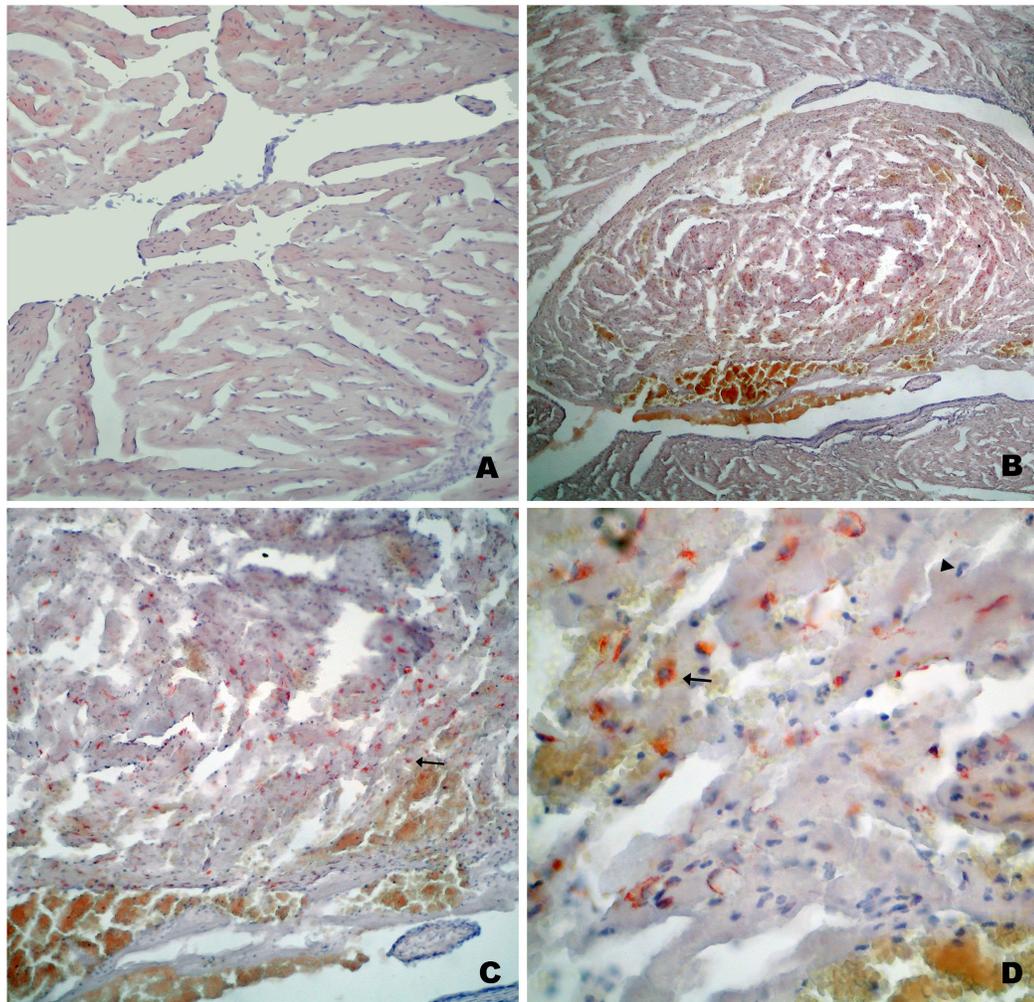


Figura 19: Fotomicrografia do coração de hamster. (A) Grupo controle com aspecto histológico compatível com normalidade. (B) grupo hipercolesterolêmico evidenciando placa aterosclerótica voltada para a luz do ventrículo direito. (C e D) detalhe de B evidenciando células com marcação positiva para o Sudam III (seta) e presença de células inflamatórias (cabeça de seta em D). Sudam III. AB (100X), C (200X), D(500X).

6. DISCUSSÃO

A hipercolesterolemia é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. Nosso trabalho, inicialmente, objetivou desenvolver uma dieta semipurificada que induzisse um quadro de aterosclerose em hamsters, uma vez que este modelo é susceptível ao desenvolvimento das lesões ateroscleróticas (Nistor *et al.*, 1987).

Nossos dados mostraram que os níveis de colesterol de hamsters alimentados com dieta hipercolesterolêmica com 0,5% de colesterol e 17% de gordura de coco foi eficiente em aumentar os níveis de colesterol em 3,7 vezes em relação aos níveis basais. No trabalho de Silva (2005), que diferencia do presente estudo somente em relação à fonte de gordura utilizada, houve um aumento nos níveis de colesterol de 2,6 vezes, portanto, menor do que os valores encontrados em nosso estudo. Essa diferença pode se dever ao conteúdo de ácidos graxos saturados elevados na gordura de coco, enquanto que o óleo de soja utilizado por Silva (2005) possui a maior parte de seus lipídios constituída por ácidos graxos insaturados. O aumento nos níveis de colesterol encontrados por nós se assemelha aos do estudo pioneiro de Nistor *et al.* (1987). Esse estudo foi o primeiro a definir o hamster como modelo de aterosclerose e mostrou o aparecimento de lesões iniciais a partir de 4 semanas de dieta suplementada com 15% de manteiga e 3% de colesterol. Entretanto, Kahlon *et al.* (1997) mostraram que tanto 0,5% como 3% de colesterol em dietas com 15% de gordura podem ser igualmente aterogênicas, porém 3% de colesterol provoca saturação hepática, sugerindo, portanto, como melhor dieta hipercolesterolêmica para hamsters aquela contendo 0,5% de colesterol.

O hamster é considerado um animal HDL por possuir níveis elevados dessa lipoproteína. Nossos resultados mostraram uma elevação significativa dos níveis do colesterol presente nas HDLs nos animais hipercolesterolêmicos. Apesar disso, os níveis do colesterol não-HDL se mantiveram elevados em relação a HDL nesses animais como mostra a correlação sempre maior que 1 na razão entre n-HDL/HDL, embora essa razão tenha sido menor no grupo hiper. Esses resultados corroboram com outros autores que, a despeito do aumento na HDL, consideram esse animal um excelente modelo para estudos sobre a aterosclerose (Bravo *et al.*, 1993; Sicart *et al.*,

1984 e Goulinet & Chapman, 1993). Nesse sentido, é importante ressaltar que a aterosclerose é uma doença multifatorial e que a sua indução em laboratório pode necessitar de mais de um fator de risco. Nossos dados, se comparados aos de Silva (2005), confirmam a necessidade de associar um outro fator além do colesterol exógeno nos estudos sobre aterosclerose, sendo este fator os níveis de gorduras saturadas presentes na gordura de coco.

A análise histopatológica do coração, válvula e arco aórticos, mostrou o aparecimento de lesões vasculares em 33,34% dos animais hipercolesterolêmicos. Essas lesões variaram em termos de localização e grau de avanço dentre os casos encontrados.

Uma vez que padronizamos a dieta em um modelo susceptível ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, nosso trabalho objetivou estudar as ações do análogo não-peptídico da angiotensina-(1-7), AVE 0991, sobre o perfil de lipídeos, estresse oxidativo, parâmetros cardiovasculares e sobre a formação de lesões ateroscleróticas em hamsters. O tratamento com AVE 0991 foi realizado a partir de 90 dias de dieta, consistindo num total de 30 dias de tratamento. Todos os animais aparentavam estarem saudáveis sendo que não houve diferença significativa em relação ao ganho de peso nos grupos experimentais.

Nossos resultados mostraram que não houve efeito do AVE 0991 sobre os níveis do colesterol total, bem como nos valores de colesterol presentes nas lipoproteínas HDL e nas demais frações. Entretanto, nenhuma lesão ou região sudanofílica foi encontrada nos animais hipercolesterolêmicos tratados com AVE 0991. Está bem estabelecida na literatura a associação entre o SRA e a progressão da aterosclerose (Miyazaki *et al.*, 1999; Strawn *et al.* 2000 e Ferrario, 2002). Apesar desta estreita correlação, estudos com inibidores da ECA ou antagonistas do receptor AT₁ não mostram reduções nos níveis plasmáticos de colesterol, bem como das frações lipoprotéicas (Strawn *et al.*, 2000; Miyazaki *et al.*, 1999; Uehara *et al.*, 2002 e Kowala *et al.*, 1998), corroborando com nossos resultados. Dessa forma, as ações anti-ateroscleróticas associadas ao bloqueio do SRA parecem estar relacionadas não à diminuição dos níveis de colesterol plasmáticos, mas uma redução do processo inflamatório e estresse oxidativo presentes na progressão da placa.

Em relação aos níveis séricos dos triglicérides, houve um aumento provocado pela dieta hipercolesterolêmica, corroborando com Ausman (2005), que observou maiores

valores de triglicérides nos hamsters que recebiam gordura de coco na dieta em relação aos grupos que recebiam óleo de canola ou óleo de farelo refinado. Existe uma estreita correlação entre a quantidade de colesterol carregado pela VLDL e os níveis de triglicérides, e esses níveis são associados com as doenças cardiovasculares (Criqui *et al.*, 1998). Os triglicérides presentes nos quilomícrons vindos do intestino são hidrolizados em ácidos graxos livres e glicerol, produzindo os quilomícrons remanescentes. Esses são removidos por um receptor de quilomícron remanescente no fígado. Um atraso na remoção dos quilomícrons remanescentes podem promover a aterogênese. Tem sido encontrado altos níveis de triglicérides pós-prandial e um atraso no retorno aos níveis normais em pacientes com doença arterial coronariana (Kwiterovich, 2000).

Os resultados de peso relativo do fígado mostraram um aumento significativo dos animais do grupo hiper de 2 vezes em relação ao grupo controle, sendo estes dados confirmados por Silva (2005). Está amplamente definido que o fígado é responsável pela homeostase de lipídios e que nem toda gordura pode ser metabolizada e armazenada no tecido adiposo causando, dessa forma, acúmulo de gordura no fígado, o que gera a hipertrofia desse órgão. O tratamento com AVE 0991 não interferiu no tamanho relativo do fígado dos animais.

Verificamos também a função hepática através da dosagem da alanina aminotransferase (ALT), enzima presente nos hepatócitos que é liberada em maior quantidade para a corrente sanguínea sempre que o parênquima hepático estiver afetado (Henry, 1996). Nossos dados mostraram um aumento significativo da ALT nos animais que receberam dieta hiper em relação aos que receberam dieta controle, o que sugere uma alteração na função hepática. Esses resultados estão de acordo com Beynem *et al.* (1986), que estudando o efeito do colesterol na dieta, verificaram que os animais que receberam dieta rica em colesterol tiveram as atividades da ALT e da aspartato aminotransferase (AST) aumentadas em relação ao grupo controle. O tratamento com AVE 0991 por 30 dias não interferiu na atividade da enzima ALT, mostrando que esse composto provavelmente não exibe toxicidade hepática.

Embora o peso do fígado e a atividade da enzima ALT dos grupos hiper estarem aumentados em relação aos grupos controles, a análise histológica desse órgão mostrou uma esteatose microvesicular, sugerindo uma alteração hepática discreta. Kahlon *et al.*

(1996) mostrou que existe uma correlação positiva entre a quantidade de infiltração de gordura no fígado e os níveis de gordura da dieta. Esses autores sugerem que quantidades de colesterol na dieta acima de 0,5% podem saturar o metabolismo hepático, sendo este, portanto, o valor limítrofe nos estudos sobre aterosclerose em hamsters.

O tratamento com AVE 0991 não influenciou significativamente no peso relativo dos demais órgãos analisados (baço, rins e pulmões). Por outro lado, a dieta hipercolesterolêmica diminuiu o tamanho relativo dos rins tanto o esquerdo como o direito. Pode se sugerir que o aumento dos níveis de colesterol sanguíneos tenha induzido um acúmulo de lipídios nas artérias renais e/ou nos rins, o que prejudicaria a função renal reduzindo, conseqüentemente, o tamanho deste órgão. Porém, neste trabalho, não analisamos histologicamente os rins e artérias renais dos animais. Mazzolai *et al.* (2005) observaram um massivo acúmulo de lipídios nos glomérulos, área justaglomerular e túbulos renais de camundongos ApoE^{-/-} alimentados com dieta hipercolesterolêmica, corroborando com nossa hipótese.

O desenvolvimento da aterosclerose se inicia com uma injúria sustentada à parede arterial, que pode ser causada por diversos fatores, mas todos envolvendo estresse oxidativo (Basta *et al.*, 2002 e Gattone *et al.*, 2001). As células dos mamíferos possuem um sistema de defesas antioxidantes que incluem enzimas como a superóxido dismutase, a catalase, a glutathione peroxidase, e moléculas como ascorbato, piruvato, flavonóides, carotenóides e glutathione (Yokoyama, 2004). Neste trabalho foi analisado o efeito da dieta hipercolesterolêmica e do tratamento com AVE 0991 sobre o estresse oxidativo através das dosagens das enzimas catalase e paraoxonase e dos níveis dos radicais sulfidrilas totais.

Em nosso trabalho a atividade da catalase (Cat), uma das principais enzimas responsáveis pelo metabolismo do H₂O₂, foi significativamente aumentada pela dieta hipercolesterolêmica. Este resultado pode estar refletindo uma adaptação do animal ao estresse oxidativo, uma vez que, maiores concentrações da catalase melhoram a sobrevivência sob tais condições. Os estudos envolvendo a atividade da catalase ainda são controversos. Tem sido reportado que em pacientes com doença coronariana a atividade da catalase está diminuída (Leopold *et al.*, 2005) e outros também encontraram diminuição na atividade da catalase de animais experimentais (Mahfouz,

2000). Por outro lado, esse mesmo autor, encontrou resultados controversos entre a atividade da catalase hepática de coelhos e de ratos. Nossa hipótese pode ser suportada por Meilhac *et al.* (2000) que encontraram um aumento na atividade da catalase induzida por dieta hipercolesterolêmica. Além disso, Inal *et al.* (2001), observaram uma correlação positiva entre a atividade da catalase e idade. Para confirmar nossas suspeitas de que a catalase estaria aumentada como um mecanismo de defesa seria importante verificar as atividades de duas outras importantes enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona peroxidase (GPx). A superóxido dismutase tem como produto o H_2O_2 e a glutatona peroxidase também catalisa o H_2O_2 . Se a atividade da GPx estiver diminuída os níveis de H_2O_2 poderão se elevar, o que explica, em parte, os aumentos da atividade da catalase em resposta a um feedback. Mahfouz (2000) observou uma diminuição da atividade da GPx e um aumento da catalase, corroborando com essa hipótese. O tratamento com AVE 0991 não interferiu na atividade da catalase.

O principal representante das esterases “A” é a enzima paraoxonase, hidrolase de ligações triésteres de ácido fosfórico com afinidade específica a organofosforados. A maior parte da sua atividade está presente no soro associada à HDL, podendo também ser encontrada em eritrócitos e tecido cerebral (Faggioni, 2003). A paraoxonase pertence a uma família multigênica de enzimas com três genes designados por PON1, PON2 e PON3. Esta enzima possui atividades antioxidantes, mas suas isoformas reagem de maneiras diferentes ao estresse oxidativo (Aviram *et al.*, 2005). Estudos prévios têm demonstrado que a expressão da PON1 é downregulada pelo estresse oxidativo, enquanto que a PON2 é upregulada e a PON3 permanece inalterada em resposta a agentes indutores de estresse oxidativo (Carey *et al.*, 2005). Em nosso trabalho a dieta hipercolesterolêmica não afetou os níveis séricos da paraoxonase. Em contraste, outros autores têm relacionado diminuição da atividade da PON1 com altos níveis de colesterol séricos (Mackness *et al.*, 1991). Subsequentemente Navab *et al.* (1997) mostraram que pacientes com altos níveis de HDL mas baixa PON1 eram mais susceptíveis à DAC do que pacientes com baixo HDL mas alta PON. Estudos adicionais mostraram que ratos alimentados com dietas suplementadas com diferentes fontes de gordura alteram diferentemente a atividade da PON, sugerindo que o tipo de lipídio na dieta influencia na atividade da PON (Kudchodkar *et al.*, 2000). Sendo a PON uma enzima multifuncional e multigênica, mais estudos são necessários para elucidar as

questões acerca das funções, regulação e possíveis intervenções no tratamento das doenças cardiovasculares.

Em nosso estudo o tratamento com AVE 0991 reduziu a atividade da PON. Os estudos sobre a intervenção com fármacos e agentes antioxidantes sobre a atividade da PON são ainda conflitantes. Em ratos a fluvastatina (20 mg/kg/dia) reduziu a atividade plasmática e hepática da PON1, enquanto que uma dose menor (2 mg/kg/dia) foi efetiva somente na atividade hepática. Deakin *et al.* (2003) encontraram um aumento na atividade sérica de PON1 em pacientes tratados com sinvastatina. Uma vez que a ang-(1-7) bloqueia os efeitos pró-oxidantes da Ang II (Polizio *et al.*, 2007), esperávamos um efeito antioxidativo também atribuído a seu análogo AVE 0991. Dois recentes estudos na população finlandesa reportaram que altos consumos de vegetais, ricos em vitaminas C e E, estavam negativamente correlacionados com a atividade sérica da PON1 (Rantala *et al.*, 2002 e Kleemola *et al.*, 2002). Estes estudos sugerem que aumentos dos antioxidantes exógenos diminuem a atividade da PON, provavelmente como uma resposta adaptativa à diminuição no estresse. Em nosso trabalho, a dosagem da atividade da PON foi realizada utilizando somente um de seus substratos, o fenilacetato. Dessa forma, conseguimos avaliar somente a atividade arilesterase da PON. Além disso, a maioria dos trabalhos verifica somente a atividade da PON1 (Mackness *et al.*, 1991; Navab *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 2005) e nossa metodologia não nos permite distinguir entre as isoformas. Na PON2 e PON3 falta a atividade paraoxonase ou arilesterase (Costa *et al.*, 2005), e como dito anteriormente, reagem de maneiras diferentes ao estresse oxidativo.

Existe uma variação de 40X na atividade sérica da PON1 dentro dos indivíduos; e provavelmente diversos outros polimorfismos serão ainda caracterizados (Costa *et al.*, 2005). Futuros estudos são necessários para elucidar os mecanismos moleculares e bioquímicos que modulam a expressão e atividade da PON, podendo assim, identificar novas ações e, mais importante, novos fatores protetores.

Além da paraoxonase e da catalase, dosamos também os radicais sulfidrilas presentes no soro dos hamsters. Esses radicais representam todos os grupos tióis encontrados na glutatona, em proteínas e em compostos de baixo peso molecular no plasma (Wisdom *et al.*, 1991). A dosagem de sulfidrilas pode ser mais um indicativo do nível de estresse oxidativo ao qual o organismo é submetido, uma vez que eles podem

ser oxidados quando o estresse oxidativo está elevado, diminuindo o nível de tióis no plasma. Nossos resultados mostraram que a dieta hipercolesterolêmica reduziu os níveis de sulfidrilas totais, confirmando o aumento no estresse oxidativo observado pela dosagem da atividade da catalase. Além disso, nossos dados mostraram que o tratamento com AVE 0991 aumentou os radicais sulfidrilas no grupo controle tratado, indicando que esses radicais sofriam menor grau de oxidação nesses animais. Sen e Packer (2000) ressaltaram que os tióis têm como característica funcional a capacidade de atuar como agentes redutores, podendo se ligar às espécies reativas de oxigênio neutralizando o potencial oxidativo dessas moléculas.

Para avaliar se a dieta hipercolesterolêmica e/ou o tratamento com AVE 0991 estavam interferindo em parâmetros cardiovasculares, verificamos também os níveis de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) nos animais experimentais. A dieta hipercolesterolêmica e o tratamento com AVE 0991 não influenciaram tanto na PAM como na FC aferidas no fim do experimento. Outros autores também não encontraram alterações nesses parâmetros devido a aumentos dos lipídios na dieta (Kowala *et al.*, 1998; Uehara *et al.*, 2002 e Mawatari *et al.*, 2004). A hipertensão é uma doença multifatorial e PAM possui diversos mecanismos de controle, tanto neurais como humorais. É certo de que um único fator de risco induzido em nosso trabalho não foi suficiente para provocar um descontrole nos sistemas. Faria-Silva *et al.* (2005) não encontraram alterações na PAM ou FC em ratos submetidos a infusões (i.v) de AVE 0991 em diferentes doses, confirmando nossos resultados.

Em síntese, nossos dados sugerem que a dieta hipercolesterolêmica contendo 0,5% de colesterol e 17% de gordura de coco administrada por 120 dias foi eficiente em induzir lesões ateroscleróticas em hamsters. Mais importante, o tratamento desses animais com AVE 0991 provavelmente atenua essas lesões, independente de alterações na PAM, FC e nos níveis plasmáticos de lipídios.

7. CONCLUSÕES

Em síntese, os resultados do presente estudo mostram:

- A dieta AOAC modificada, utilizada neste estudo, foi eficaz em induzir um perfil dietético hipercolesterolêmico.
- A dieta semipurificada no presente estudo aumentou o estresse oxidativo dos animais, observado através do aumento da atividade da catalase e diminuição dos grupos sulfidrilas no soro, ambos refletindo uma adaptação do animal ao estresse oxidativo,
- A análise histopatológica do coração, válvula e arco aórticos, mostrou o aparecimento de lesões vasculares em 33,34% dos animais hipercolesterolêmicos, mostrando que a dieta utilizada foi eficiente em induzir o aparecimento de lesões ateroscleróticas em hamsters.
- O tratamento com AVE 0991 não alterou os níveis séricos de colesterol total, bem como de suas frações.
- O tratamento com AVE 0991 por 30 dias reduziu os níveis da PON, provavelmente por um mecanismo de resposta a um antioxidante exógeno (AVE). Além disso, nossos dados mostraram que o tratamento com AVE 0991 aumentou os radicais sulfidrilas no grupo controle tratado, indicando que esses radicais sofriam menor grau de oxidação nesses animais.
- Tanto a dieta hipercolesterolêmica como o tratamento com AVE 0991 não influenciaram na PAM e FC
- Nos animais tratados com AVE 0991 não foi encontrado nenhum tipo de lesão ou marcação sudanofílica através da análise histopatológica.

Em síntese, nossos dados sugerem que a dieta hipercolesterolêmica utilizada nesse estudo foi eficiente em induzir lesões ateroscleróticas em hamsters. Além disso, nossos resultados indicam que o tratamento desses animais com AVE 0991 possivelmente atenua essas lesões, sem causar alterações na PAM, FC e nos níveis plasmáticos de lipídios.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ardaillou, R. (1997) Active fragments of angiotensin II: enzymatic pathways of synthesis and biological effects. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 6(1):28-34.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1980) *Official Methods of Analysis*, Tenth Edition. Pushied by The Association of Official Agricultural Chemists Whashington. pp. 437.

Ausman, L.M.; Rong, N.; Nicolosi, R.J. (2005) Hypocholesterolemic effect of physically refined rice bran oil: studies of cholesterol metabolism and early atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 16:521-529.

Aviram, M.; Rosenblat, M. (2005) Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. *Current Opinion in Lipidology.* 16:393–399.

Basta, G.; Lazzerini, G.; Massaro, M.; Simoncini, T.; Tanganelli, P.; Fu, C.; Kislinger, T.; Stern, D.M.; Schmidt, A.M.; De Caterina, R. (2002) Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation.* 105:816-822.

Beaglehole, R. (1999) International trends in coronary heart disease mortality and incidence rates. *J Cardiovasc Risk.* 6:63-8.

Beltowski, J., Wojcicka, G., Jamroz, A. (2002) Differential effect of 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on plasma paroxanase 1 activity in the rat. *Pol. J. Pharmacol.* 54(6): 661-71.

Benter, I.F.; Yousif, M.H.; Anim, J.T.; Cojocel, C.; Diz, D.I. (2006) Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously

hypertensive rats treated with L-NAME. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290:H684-H691.

Berliner, J.A.; Navab, M.; Fogelman, A.M.; Frank, J.S.; Demer, L.L.; Edwards, P.A.; Watson, A.D.; Lusis, A.J. (1995) Atherosclerosis: Basics mechanisms. *Circulation.* 91(9):2488-2496.

Berliner, J.A.; Territo, M.C.; Sevanian, A.; Ramin, S.; Kim, J.A.; Bamshad, B.; Esterson, M.; Fogelman, A.M. (1990) Minimally modified LDL stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest.* 85:1260-1266.

Beutler, E. (1975) *Red Cell Metabolism.* 2a edition, Greene & Statton, New York, pp: 160.

Beynem, A.C.; West, C.E.; Zutphen, L.F.M.; Van and Katan, M.B. (1986) Relation between the responses of serum cholesterol to dietary cholesterol and to the type of dietary fat in random-bred rabbits. *Circ Res.* 58:331-340.

Brasier, A.R.; Recimos III, A.; Eledrisi, M.S. (2002) Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22:1257-1266.

Bravo, E.; Cantafora, A.; Calcabrini, A.; Ortu, G. (1994) Why prefer the golden Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) to the Wistar rat in experimental studies on lipoprotein metabolism? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* 107 (2):347-355.

Brody, T. (1993) *Nutritional Biochemistry.* Academic Press, INC. San Diego, California. pp 261-276.

Brown, M.S.; Goldstein, J.L. (1990) Scavenging for receptors. *Nature.* 343:508-509.

Carey, J.Ng.; Shiha, D.M.; Hama, S.Y.; Villa, N.; Navab, M.; Reddy, S.T. (2005) The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*. 38:153– 163.

Chilton, R.J. (2004) Pathophysiology of coronary heart disease: a brief review. *JAOA*. supl 7, vol 104(9):S5-S8

Costa, L.G.; Vitalone, A.; Cole, T.B.; Furlong, C.E. (2005) Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology*. 69:541–550.

Criqui, M.H.; Golomb, B.A. (1998) Epidemiologic aspects of lipid abnormalities. *The American Journal of Medicine*. 105(1) suppl.1:48S-57S.

Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J., Territo, M.C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C.J., Fogelman, A.M. (1990) Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Cell Biology*, 87: 5134-5138.

Daley, S.J.; Klemp, K.F.; Guyton, J.H.; Hogers, K.A. (1994) Cholesterol-fed and casein-fed rabbit models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb*. 14:105-114.

Das, U.N. (2005) Is angiotensin-II an endogenous pro-inflammatory molecule? *Med Sci Monit*. 11:RA155-162.

de Gasparo, M.; Catt, K.J.; Inagami, T.; Wright, J.W.; Unger, T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 52:415-72.

Deakin, S.; Leviev, I.; Guernier, S.; James, R.W. (2000) Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23:2083–9.

DelliPizzi, A.M.; Hilchey, S.D.; Bell-Quilley, C.P. (1994) Natriuretic action of angiotensin-(1-7). *Br J Pharmacol.* 111:1-3.

Donoghue, M.; Hsieh, F.; Baronas, E.; Godbout, K.; Gosselin, M.; Stagliano, N.; *et al.* (2000) A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 87:E1-9.

Faggioni, T. (2003) O efeito do hábito de fumar sobre a atividade da enzima paraoxonase em uma população humana. Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. Dissertação de Mestrado.

Faria-Silva, R.; Duarte, F.V.; Santos, R.A.S. (2005) Short-term angiotensin-(1-7) receptor Mas stimulation improves endothelial function in normotensives rats. *Hypertension.* 46[part 2]:948-952.

Ferrario, C.M. (2002) Use of angiotensin II blockers in animal models of atherosclerosis. *American Journal of Hypertension.* 15:9S-13S.

Ferrario, C.M. (2006) Role of the rennin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 98:121-128.

Ferrario, C.M.; Barnes, K.L.; Block, C.H.; Brosnihan, B. *et al.* (1990) Pathways of angiotensin formation and function in the brain. *Hypertension.* 15(suppl D):I-13-I-19.

Ferrario, C.M.; Chappel, M.C.; Tallant, E.N.; Brosnihan, K.B.; Diz, D.I. (1997) Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 30[part 2]:535-541.

Ferreira, A.J.; Oliveira, T.L.; Castro, M.C.M.; Almeida, A.P.; Castro, C.H.; Caliari, M.V.; Gava, E.; Kitten, G.T.; Santos, R.A.S. (2007) Isoproterenol-induced impairment of heart function and remodeling are attenuated by the nonpeptide angiotensin-(1-7) analogue AVE 0991. *Life Sciences.* 81:916-923.

Ferreira, A.J.; Santos, R.A.S. (2005) Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res.* 38:499-507.

Freeman, M.; Ashkenas, J.; Rees, D.J.; Kingsley, D.M.; Copeland, N.G.; Jenkins, N.A.; Krieger, M. (1990) An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:8810-8814.

Gattone, M.; Lacoviello, L.; Colombo, M.; Castelnuovo, A.D.; Soffiantino, F.; Gramoni, A.; Picco, D.; Benedetta, M.; Giannuzzi, P. (2001) Chlamydia pneumoniae and cytomegalovirus seropositivity, inflammatory markers, and the risk of myocardial infarction at a young age. *Am Heart J.* 142:633-640.

Girendling, K.K.; Minien, C.A.; Ollerenshaw, J.D.; Alexander, R.W. (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 74:1141-48.

Gironacci, M.M.; Adler-Graschinsky, E.; Peña, C.; Enero, M.A. (1994) Effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on release of [³H]-norepinephrine from rat atria. *Hypertension.* 24:457-60.

Goldschmidt-Clermont, P.J.; Creager, M.A.; Losordo, D.W.; Lam, G.K.W.; Wassef, M.; Dzau, V.J. (2005) Atherosclerosis 2005: recent discoveries and novel hypotheses. *Circulation.* 112:3348-3353.

Gordon, T.; Castelli, W.P.; Hjortland, M.C. *et al.* (1977) High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: the Framingham Study. *Am J Med.* 62:707-714.

Goulinet, S.; Chapman, M.J. (1993) Plasma lipoproteins in the Golden Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*): heterogeneity of apoB- and apoA-I-containing particles. *Journal of Lipid Research.* 34:943-959.

Graninger, M.; Reiter, R.; Drucker, C.; Minar, E.; Jilma, B. (2004) Angiotensin receptor blockade decreases markers of vascular inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 44:335-339.

Grothusen, C.; Bley, S.; Selle, T.; Luchtefeld, M.; Grote, K.; Tietge, U.J.F.; Drexler, H.; Schieffer, B. (2005) Combined effects of HMG-CoA-reductase inhibition and renin-angiotensin system blockade on experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 182:57-69.

Hanley, M.R.; Cheung, W.T.; Hawkins, P.; Poyner, D.; Benton, H.P.; Blair, L.; Jackson, T.R.; Goedert, M. (1990) The mas oncogene as a neural peptide receptor: expression, regulation and mechanism of action. *Ciba Found Symp.* 150:23-38.

Henry, J.B. (1996) *Clinical diagnosis and management by laboratory methods.* 19^a ed. Saunders Company.

Inal, M.E., Kanbak, G., Sunal, E. (2001) Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin. Chim. Acta.* 305:75–80.

International Clinical Epidemiology Network (INCLEN). (1992) Risk factors for cardiovascular disease in developing world. A multicentre collaborative study in International Clinical Epidemiology Network (INCLEN). *INCLEN Multicentre Collaborative Group. J. Clin. Epidemiol.* 45(8): 841-7.

Jackson, T.R.; Blair, L.A.; Marshall, J.; Goedert, M.; Hanley, M.R. (1988) The mas oncogene encodes an angotensin receptor. *Nature.* 335:437-440.

Kádár, A.; Glasz, T. (2001) Development of atherosclerosis and plaque biology. *Cardiovascular Surgery.* 9(2):109-121.

Kahlon, T.S.; Chow, F.I.; Irving, D.W.; Sayre, R.N. (1997) Cholesterol response and fatty streak formation in hamsters fed two levels of saturated fat and various levels of cholesterol. *Nutrition Research*. 17:1693-1707.

Keidar, S.; Kaplan, M.; Gamliel-Lazarovich, A. (2007) ACE2 of the heart: from angiotensin I to angiotensin (1-7). *Cardiovascular Research*. 73:463-469.

Keidar, S; Attias, J.; Smith, J.; Breslow, J.L.; Hayek, T. (1997) The angiotensin II receptor antagonist, losartan, inhibits LDL lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 236:622-625.

Kim, J.A.; Berliner, J.A.; Nadler, J.L. (1996) Angiotensin II increases monocyte binding to endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 226:862-868.

Kleemola, P.; Freese, R.; Jaulainen, M.; Pahlman, R.; Alfthan, G.; Mutanen, M. (2002) Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. *Atherosclerosis*. 160:425–32.

Kowala, M.C.; Valentine, M.; Recce, R.; Beyer, S.; Goller, N.; Durham, S.; Aberg, G. (1998) Enhanced reduction of atherosclerosis in hamsters treated with pravastatin and captopril: ACE in atheromas provides cellular targets for captopril. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 32(1):29-38.

Kucharewicz, I.; Buczko, W. (2000) The antithrombotic action of angiotensin-(1-7) in experimental venous thrombosis model in renal hypertensive rats. *Fibrinolysis and Proteolysis*. 14(suppl 1):56.

Kudchodkar, B.J.; Lacko, A.G.; Dory, L.; Fungwe, T.V. (2000) Dietary fat modulates serum paraoxonase 1 activity in rats. *J Nutr*. 130:2427–33.

Kwiterovich, Jr.P.O. (2000) The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *Am J Cardiol.* 86 (suppl):5L-10L.

Lemos, V.S.; Silva, D.M.R.; Walther, T.; Alenina, N.; Bader, M.; Santos, R.A.S. (2005) The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide ang-(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of Mas-Knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol.* 46:274-279.

Le Tran, Y.; Forster, C. (1997) Angiotensin-(1-7) and the rat aorta: modulation by the endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 30:676-82.

Leopold, J.A.; Loscalzo, J. (2005) Oxidative Enzymopathies and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:1332-1340.

Lichtenstein, A.H. (1996) Atherosclerosis. In: *Present Knowled in Nutrition.* 7th edition. ILIS Press. Washington DC. 42:430-437.

Lima, C.V.; Paula, R.D.; Resende, F.L.; Khosla, M.C.; Santos, R.A.S. (1997) Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin-(1-7) in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension.* 30:542-548.

Lupu, F.; Danaricu, I.; Simionescu, N. (1987) Development of intracellular lipid deposits in the lipid-laden cells of atherosclerotic lesions: a cytochemical and ultrastructural study. *Atherosclerosis.* 67:127-42.

Mackness, M.I.; Arrol, A.; Durrington, P.N. (1991) Paraonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *Federation of European Biochemical Societies.* 286(1.2):152-144.

Mackness, M.I.; Harty, D.; Bhatnagar, D.; Winocour, P. H.; Arrol, S.; Ishola, M.; Durrington, P.N. (1991) Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 86:193–199.

Mahfouz, M.M.; Kummerow, F.A. (2000) Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *J. Nutr. Biochem*. 11:293–302.

Mawatari, K.; Kakui, S.; Harada, N.; Ohnishi, T.; Niwa, Y.; *et al.* (2004) Endothelin-1 (1-31) levels are increased in atherosclerotic lesions of the thoracic aorta of hypercholesterolemic hamsters. *Atherosclerosis*. 175:203-212.

Mazzolai, L.; Korber, M.; Bouzourene, K.; Aubert, J-F.; Nussberger, J.; Stamcnkovic, I.; Iiayoz, D. (2005) Severe hyperlipidemia causes impaired renin-angiotensin system function in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis*.

Meilhac O, Zhou M, Santanam N, Parthasarathy S. (2000) Lipid peroxides induce expression of catalase in cultured vascular cells. *J Lipid Res*. 41:1205-1213.

Miyazaki, M.; Sakonjo, H.; Takai, S. (1999) Anti-atherosclerotic effects of angiotensin converting enzyme inhibitor and angiotensin II antagonist in *Cynomolgus* monkeys fed a high-cholesterol diet. *British Journal of Pharmacology*. 128:523-529.

Moghadasian, M.H. (2002) Experimental atherosclerosis. A historical overview. *Life Sciences*. 70:855-865.

Murray, C.J.L. & Lopez, A.D. (1996) *The global burden of disease*. Cambridge, MA. Havard School of Public Health.

Navab, M.; Hama-Levy, S.; Van Lenten, B. J.; Fonarow, G. C.; Carelinez, C. J.; Castellani, L. W.; Brennan, M.-L.; La Du, B. N.; Lusic, A. J.; Fogelman, A. M. (1997)

Mildly oxidised LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J. Clin. Invest.* 99:2005– 2019.

Negre-Salvayre, A.; Dousset, N.; Ferretti, G.; Bacchetti, T.; Cutarola, G.; Salvayre, R. (2006) Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free Radical Biology & Medicine.* 41:1031-1040.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. (2006) *Lehninger Princípios de Bioquímica.* 4^a ed. Sarvier. São Paulo, SP. pp 807-819.

Nistor, A.; Bulla, A.; Filip, D.A.; Radu, A. (1987) The hyperlipidemic hamster as a model of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 68:159-173.

Nivelstein-Post, P.F.E.M.; Fogelman, A.M.; Mottino, G.; Frank, J.S. (1991) Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein. A deep-etch and immunolocalization study of rapidly frozen tissue. *Arterioscler Tromb.* 11:1795-1805.

O’Connell, B.J.; Genest, J.Jr. (2001) High-density lipoproteins and endothelial function. *Circulation.* 104:1978.

Okraïneç, K.; Banerjee, D.K.; Eisenberg, M.J. (2004) Coronary artery disease in developing world. *Am Heart J.* 148:7-15.

Omura, T.; Kim, S.; Takeuchi, K.; Iwao, H.; Takeda, T. (1994) Transforming growth factor beta 1 and extracellular matrix gene expression in isoprenaline induced cardiac hypertrophy: effect of inhibition of rennin-angiotensin system. *Cardiovasc Res.* 28:835-1842.

Osei, S.Y.; Ahima, R.S.; Minkes, R.K.; Weaver, J.P.; Khosla, M.C.; Kadowitz, P.J. (1993) Differential responses to Ang-(1–7) in the feline mesenteric and hindquarter vascular beds. *Eur J Pharmacol.* 234:35–42.

Parhami, E.; Fang, Z.T.; Fogelman, A.M.; Andalibi, A.; Territo, M.C.; Berliner, J.A. (1993) Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. *J Clin Invest.* 92:471-478.

Parthasarathy, S. (1994) Modified lipoproteins in pathogenesis of atherosclerosis. Austin: R.G. Landes Co. 91-119.

Pasqualucci, C.A.; Unt, L.; Lage, S.G. (1999) Aterosclerosis Parte I: Fenômenos celulares na aterosclerose. *Revista Brasileira de Cardiologia.* A1N1

Patsch, J.R.; Miesenbock, G.; Hopferwieser, T.; Muhlberger, V.; Kuapp, E.; Dunn, J.K.; Gotto, A.M.Jr. Patsch, W. (1992) Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. *Arterioscler Thromb.* 12:1336-1345.

Piegas, L.S.; Avezum, A.; Pereira, J.C. et al. (2003) AFIRMAR Study Investigators. Risk factors for myocardial infarction in Brazil. *Am Heart J.* 146:331-8.

Pien, C.S.; Davis, W.P.; Marone, A.J.; Foxall, T.L. (2002) Characterization of diet induced aortic atherosclerosis in Syrian F₁B hamsters. *Journal of Experimental Animal Science.* 42:65-83.

Pinheiro, S.V.B.; Simões e Silva, A.C.; Sampaio, W.O.; de Paula, R.D.; Mendes, E.P; *et al.* (2004) Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension.* 44:490-496.

Polanczyk, C.A. (2005) Fatores de risco cardiovascular no Brasil: os próximos 50 anos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 84(3):199-201.

Polizio, A.H.; Gironacci, M.M.; Tomaro, M.L. Peña, C. (2007) Angiotensin-(1-7) blocks the angiotensin II – stimulated superoxide production. *Pharmacological Research*. 56:86-90.

Quinn, M.T.; Parthasarathy, S.; Fong, L.G.; Steinberg, D. (1987) Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84:2995-2998.

Rajagopalan, S.; Meng, X.P.; Ramasamy, S.; Harrison, D.G.; Galis, Z.S. (1996) Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro: implications of atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest*. 98:2572-2579.

Rajavasisth, T.B.; Andalibi, A.; Territo, M.C.; Berliner, J.A.; Navab, M.; Fogelman, A.M.; Lusis, A.J. (1990) Modified LDL induce endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony stimulation factors. *Nature*. 344:254-257.

Rantala, M.; Silaste, M.L.; Tuominen, A.; Kaikkonen, J.; Salonen, J.T.; Alfthan, G.; et al. (2002) Dietary modifications and gene polymorphisms alter serum paraoxonase activity in healthy women. *J Nutr*. 132:3012–7.

Reddy, K. S., Yusuf, S. (1998) Emerging epidemic of cardiovascular disease in developing countries. *Circulation*, 97: 596-601.

Ren, Y.; Garvin, J.L.; Carretero, O.A. (1998) Vasodilator action of angiotensin 1–7 (Ang 1–7) in the isolated afferent arteriole of the rabbit kidney. *J Am Soc Nephrol*. 9:345A.

Rice, G.I.; Thomas, D.A.; Grant, P.J.; Turner, A.J.; Hooper, N.M. (2004) Evaluation of angiotensin converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J*. 383:45-51.

Rocks, A.J.M.; van Geel, P.P.; Pinto, Y.M.; Buikema, H.; Henning, R.H.; Zeeuw, D.; van Gilst, W.H. (1999) Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human rennin-angiotensin system. *Hypertension*. 34:296-30.

Ros, E. (2000) Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 151:357-379.

Ross R. (1986) The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N Engl J Med*. 314:400-500.

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

Sampaio, W.O.; Nascimento, A.A.; Santos, R.A.S. (2003) Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 284:H1985-94.

Santos, R.A.S., Campagnole-Santos, M.J. (1994) Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res*. 27:1033-47.

Santos, R.A.S.; Campagnole-Santos, M.J.; Andrade, S.P. (2000) Angiotensin-(1-7): un update. *Regul Pept*. 91:45-62.

Santos, R.A.S.; Ferreira, A.J. (2006) Pharmacological effects of AVE 0991, a nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor agonist. *Cardiovascular Drug Reviews*. 24(3-4):239-246.

Santos, R.A.S.; Simões e Silva, A.C.; Maric, C.; Silva, D.M.; Machado, R.P.; de Buhr, I; et al. (2003) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:8258-63.

Schiavone, M.T.; Santos, R.A.S.; Brosnihan, K.B.; Khosla, M.C.; Ferrario, C.M. (1988) Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:4095-8.

Schmitz, G.; Aslanidis, C.; Lackner, K.J. (1998) Recent advances in molecular genetics of cardiovascular disorders. Implications for atherosclerosis and diseases of cellular lipid metabolism. *Pathology Oncology Research*. 4(2):152-160.

Schwartz, D.; Chaverri-Almada, L.; Berliner, J.A.; Kirchgessner, T.; Quirmorio, D.C.; Fang, Z.T.; Tekamp-Olson, P.; *et al.* (1994) The role of a glycoprotein in monocyte adhesion to the endothelium. *J. Clin. Invest.* 94:1068-1073.

Sedlak, J. e Lindsay, R.H. (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulphydryl groups in tissue with Elman's reagent. *Analytical Biochemistry*. 25:192-205.

Sen, C.K.; Packer, L. (2000) Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 72(suppl):653S-69S.

Sicart, R.; Sable-Amplis, R.; Guiro, A. (1984) Comparative studies of the circulating lipoproteins in hamster (*Mesocricetus auratus*) with a normal or spontaneous high level of cholesterol in the plasma. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 78(3):511-514.

Silva, J.C.A. (2005) Efeito do excesso de ferro e dieta hipercolesterolêmica sobre o perfil de lipídios séricos e estresse oxidativo em hamsters. Universidade Federal de Ouro Preto. Dissertação de Mestrado.

Spady, D.K.; Dietschy, J.M. (1988) Interaction of dietary cholesterol and triglycerides in the regulation of hepatic low-density lipoprotein transport in the hamster. *J. Clin. Invest.* 81:300-309.

Spady, D.K.; Turley, S.D.; Dietschy, J.M. (1985) Rates of low-density lipoprotein uptake and cholesterol synthesis are regulated independently in the liver. *J. Lipid Res.* 26:465-472.

Sparrow, C.P.; Parthasaraty, S.; Steinberg, D. (1989) A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 264:2599-2604.

Stanziola, L.; Greene, L.J.; Santos, R.A.S. (1999) Effects of chronic angiotensin converting enzyme inhibition on angiotensin I and bradykinin metabolism in rats. *Am J Hypertension.* 12:1021-1029.

Sary, H.C. (1987) Macrophages, macrophage foam cells, and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children. *Atherosclerosis.* 64:91-108.

Sary, H.C.; Chandler, A.B.; Dinsmore, R.E.; Fuster, V.; Glagov, S.; Insull, J.W.; Rosenfeld, M.E.; Schwartz, C.J.; Wagner, W.; Wissler, R.W. (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis, American Heart Association. *Atherosclerosis, thrombosis, and Vascular Biology.* 15(9):1512-1531.

Sary, H.C.; Chandler, A.B.; Glagov, S.; Guyton, J.R.; Insull, W.Jr.; *et al.* (1994) A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 89:2462-2478.

Steffens, A.A. (2003) Epidemiologia das doenças cardiovasculares. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul.* Ano XII n3:5-15.

Steinbrecher, U.P.; zhang, H.F.; Loughed, M. (1990) Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic. Biol.* 9:155-168.

Strawn, W.B.; Chappell, M.C.; Dean, R.H.; Kivlign, S.; Ferrario, C.M. (2000) Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation*. 101:1586-1593.

Strawn, W.B.; Ferrario, C.M.; Tallant, E.A. (1999) Angiotensin-(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury. *Hypertension*. 33(1S):207-211.

Strawn, W.B.; Gallagher, P.E.; Tallant, E.A.; Ganten, D.; Ferrario, C.M. (1999) Angiotensin II AT₁-receptor blockade inhibits monocyte activation and adherence in transgenic (mRen2)²⁷ rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 33(3):341-351.

Tallant, E.A.; Debra, I.D.; Ferrario, C.M. (1999) Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle. *Hypertension*. 34[part 2]:950-957.

Touyz, R.M.; Berry, C. (2002) Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Res*. 35(9):1001-1015.

Uehara, Y.; Urata, H.; Ideishi, M.; Arakawa, K.; Saku, K. (2002) Chymase inhibition suppresses high-cholesterol diet-induced lipid accumulation in the hamster aorta. *Cardiovascular Research*. 55:870-876.

Urata, H.; Kinoshita, A.; Misono, K.S.; Bumpus, F.M.; Husain, A. (1990) Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem*. 265:22348-57.

Vaughan, D.E.; Lazos, S.A.; Tong, K. (1995) Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells: a potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis. *J Clin Invest*. 95:995-1001.

Vickers, C.; Hales, P.; Kaushik, V.; Dick, L.; Gavin, J.; Tang, J.; et al. (2002) Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 277:14838–43.

Wessel, N.; Malberg, H.; Heringer-Walther, S.; Shultheiss, H.-P.; Walther, T. (2007) The angiotensin-(1-7) receptor agonist AVE 0991 dominates the circadian rhythm and baroreflex in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 49:67-73.

Wiemer, G.; Dobrucki, L.W.; Louka, F.R.; Malinski, T.; Heitsch, H. (2002) AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angotensin-(1-7) on the endothelium. *Hypertension.* 40:847-852.

Wilson, T.A.; Nicolosi, R.J.; Lawton, C.W.; Babiak, J. (1999) Gender differences in response to a hypercholesterolemic diet in hamsters: effects on plasma lipoprotein cholesterol concentrations and early aortic atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 146:83-91.

Wisdom, S.J.; Wilson, R.; Mckillop, J.H. & Walker, J.J. (1991) Antioxidant systems in normal pregnancy and pregnancy-induced hypertension. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 165:170-174.

Witztum, J.L.; Steinberg, D. (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 88:1785-1792.

Wolfbauer, G.; Glick, J.M.; Minor, L.K.; Rothblat, G.H. (1986) Development of smooth muscle foam cell: uptake of macrophage lipid inclusions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83:7760-7764.

Yokoyama, M. (2004) Oxidant stress and atherosclerosis. *Current Opinion in Pharmacology.* 4:110–115.

9. ANEXOS

ANEXO I:

Protocolos fornecidos pelo fabricante Labitest Diagnóstica para determinação das concentrações séricas de colesterol total, HDL-colesterol, triglicérides e para determinação da atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT).