

O ESTUDO DA ATIVIDADE BAROREFLEXA E DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS *KNOCKOUT* PARA RECEPTORES DE LDL

Cristina Campos

Orientação: Dra. Maria Cláudia Irigoyen

Dra. Katya Vianna Rigatto

Dissertação submetida ao Curso de
Pós-Graduação em Ciência
Biológicas: Fisiologia da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestre em

Porto Alegre

2005

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência,
e para se chegar onde quer que seja,
aprendí que não é preciso dominar a força, mas a razão.
É preciso, antes de mais nada, querer. ”

Amyr Klink

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, gostaria de fazer um agradecimento especial a Deus, que sempre esteve ao meu lado, e sempre me presenteou com seu amor, atenção, compaixão e paciência, durante todos os dias de minha vida.

À minha orientadora *Profa Dra. Maria Claudia Irigoyen*, pela orientação, amizade e eterno compromisso com o desenvolvimento das Ciências Biológicas e daqueles que nela acreditam.

À minha co-orientadora *Profa Dra Katya Rigatto* pelo exemplo como pesquisadora, pela sua serenidade e atenção que proporcionaram a oportunidade deste aprendizado, e pela fundamental contribuição, sem a qual esta dissertação não teria sido possível.

À minha melhor amiga, *Mariane Bertagnolli*, pelo seu carinho, incentivo e apoio psicológico nos momentos mais difíceis.

À *Profa Dra. Adriane Belló-Klein* pelo estímulo e apoio em todos os momentos, e principalmente por seus conselhos durante nossas viagens até Canoas.

À todos os colegas do laboratório de Fisiologia cardiovascular da UFRGS, pelo incentivo silencioso e por sua paciência comigo.

Um obrigado especial às minhas fontes de amor e respeito: minha mãe Teresa, e meu pai Abraão.

INDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	02
1.1 Camundongo com ausência do receptor para lipoproteínas de baixa densidade (LDLr).....	03
1.2 Hipercolesterolemia.....	04
1.3 Estresse Oxidativo e sua relação com a hipercolesterolemia....	07
1.4 Óxido Nítrico.....	11
1.5 Hipertensão.....	13
1.6 Barorreceptores.....	15
2. HIPÓTESE.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 ANIMAIS.....	20
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	20
4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	20
4.3.1 Procedimento Cirúrgico.....	21
4.3.2 Registro de Pressão Arterial.....	21
4.4 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE REFLEXA	22

4.5 MORTE DOS ANIMAIS E PREPARO DAS AMOSTRAS DE SANGUE.....	23
4.5.1 Preparo das amostras de Tecido.....	24
4.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	24
4.6.1 Dosagem de Colesterol Total.....	24
4.6.2 Dosagem de Proteínas e da concentração de hemoglobina..	25
4.6.3 Medida de lipoperoxidação (LPO).....	26
4.6.3.1 Quimiluminescência Iniciada por t-BOOH (QL).....	26
4.6.4 Avaliação do Dano Oxidativo às proteínas.....	27
4.6.5 Enzimas Antioxidantes.....	28
4.6.5.1 Superóxido Dismutase (SOD).....	28
4.6.5.2 Catalase (CAT).....	29
4.6.5.3 Glutathione Peroxidase (GPx).....	30
4.6.7 Medida de Nitratos Totais (NOx).....	31
4.7 Análise Estatísticas.....	31
5. RESULTADOS.....	33
5.1 EFEITO DA AUSÊNCIA DE RECEPTORES DE LDL NOS NÍVEIS DE COLESTEROL TOTAL	33
5.2 EFEITO DA AUSÊNCIA DE RECEPTORES DE LDL NA PRESSÃO ARTERIAL.....	33
5.3 EFEITO DA AUSÊNCIA DE RECEPTORES DE LDL RESPOSTA DA PRESSÃO ARTERIAL.....	34
5.3.1 Resposta hipotensora ao nitroprussiato de sódio.....	34
5.3.2 Resposta pressora à fenilefrina.....	35
5.4 EFEITO DA AUSÊNCIA DE RECEPTORES DE LDL SOBRE A	

SENSIBILIDADE DO REFLEXO PRESSORRECEPTOR	
ANALISADA PELO ÍNDICE DE SENSIBILIDADE.....	36
5.4.1 Taquicardia reflexa.....	36
5.4.2 Bradicardia reflexa.....	37
5.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	38
5.5.1 Quimiluminescência nos eritrócitos.....	38
5.5.2 Quimiluminescência no tecido cardíaco.....	39
5.5.3 Dano Oxidativo às Proteínas no sangue.....	40
5.5.4 Dano Oxidativo às Proteínas no tecido cardíaco.....	41
5.5.6 Dosagem de Nitratos Totais no Plasma.....	42
5.5.7 Dosagem de Nitratos Totais no Tecido Cardíaco.....	43
5.5.8 Atividade das enzimas antioxidantes nos eritrócitos.....	44
5.5.8.1 Superóxido Dismutase nos Eritrócitos.....	45
5.5.8.2 Superóxido dismutase no Tecido Cardíaco.....	46
5.5.8.3 Catalase nos Eritrócitos.....	47
5.5.8.4 Catalase no Tecido Cardíaco.....	48
5.5.8.5 Glutationa Peroxidase nos Eritrócitos.....	49
5.5.9 Relação entre a atividade da SOD no plasma e os níveis plasmáticos de NOx.....	50
5.5.10 Relação entre a atividade da CAT no plasma e os níveis plasmáticos de NOx.....	51
5.5.11 Relação entre a atividade da GPx no plasma e os níveis plasmáticos de NOx.....	52
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65

8. CONCLUSÃO.....	67
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

RESUMO

Neste estudo observamos os efeitos da ausência de receptores para LDL sobre os níveis plasmáticos de colesterol, pressão arterial, controle reflexo da frequência cardíaca, nitratos totais e estresse oxidativo em eritrócitos e tecido cardíaco. Para tanto utilizamos camundongos controle (n=13, para avaliações hemodinâmicas e de estresse oxidativo, e n=11, para dosagem de colesterol), e *Knockout* para receptores de LDL controle (n= 6, para avaliações hemodinâmicas e de estresse oxidativo, e n=5, para dosagem de colesterol). Como análise estatística utilizamos o teste T de Student para amostras não pareadas, considerando-se significativo quando $p < 0,05$.

A ausência desses receptores aumentou os níveis plasmáticos de colesterol total em mg/dL (179 ± 35) no grupo *knockout* (KO), em relação ao controle (109 ± 13). Esse resultado foi acompanhado pelo aumento da pressão arterial média (PAM) em mmHg no grupo KO (140 ± 3), quando comparado ao controle (118 ± 6). A frequência cardíaca basal não foi significativamente diferente entre os grupos, mas o reflexo comandado pelos pressoreceptores estava significativamente atenuado nos animais KO.

Tanto em eritrócitos como no tecido cardíaco, a atividade das enzimas antioxidantes apresentou-se significativamente reduzida; e o dano oxidativo, expresso pela dosagem de carbonilas e quimiluminescência, esteve significativamente aumentado no grupo KO. Esses resultados foram acompanhados pela redução dos níveis de nitratos totais, indicando uma redução da biodisponibilidade de óxido nítrico circulante nesses animais.

Esses resultados indicam que a ausência de receptores para LDL não só causam aumento dos níveis de colesterol sanguíneo, mas também do estresse oxidativo. Esses aumentos poderiam estar contribuindo tanto para aumentar a degradação do óxido nítrico quanto para reduzir sua síntese, resultando em aumento da PA e prejuízo da sensibilidade barorreflexa, observados nesse estudo.

ABSTRACT

In this study, it was observed the effect of low density lipoprotein receptor deficiency in the cholesterol blood levels, blood pressure, reflex control of the heart, total nitrates and oxidative damage in erythrocytes and heart.

The lack of LDL receptors significantly increased the cholesterol blood levels (mg/dL) in the knockout (KO) group (179 ± 35) compared to control (109 ± 13). It was also observed an increase in mean arterial pressure (MAP/mmHg) in KO mice (140 ± 3), when compared to control (118 ± 6). There was not difference in basal heart rate between groups, but in KO animals the baroreflex control of the heart rate was significantly attenuated.

In the erythrocytes and heart, the antioxidant enzyme activities were significantly decreased in the KO mice. On the other hand, the oxidative damage, measured by chemiluminescence and carbonyls, was increased in these mice while total plasma nitrate levels were lower.

Finally, these results indicate that the lack of LDL receptor probably is the reason not only to the increased cholesterol blood levels, but also for the increase in oxidative stress. The decrease in nitric oxide bioavailability, seen in the KO mice, could be responsible for the increased MAP and the impaired baroreflex sensitivity.

LISTA DE ABREVIATURAS

BH ₄	Tetrahydrobiopterina
CAT	enzima catalese
EAO	espécies ativas de oxigênio
FC	freqüência cardíaca
GPx	enzima glutaciona peroxidase
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada
GMPc	guanosina ciclase 3'5'-monofosfato
HDL	lipoproteína de alta densidade
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
KO	camundongo Knockout para receptor de LDL
LPO	lipoperoxidação
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDLr	receptor para lipoproteína de baixa densidade
LOOH	hidroperóxidos lipídicos
LOO ⁻	lipoperóxidos
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
NOx	nitratos totais
NO ₂	dióxido de nitrogênio
O ₂ ⁻	ânion superóxido
PA	pressão arterial

PAM	pressão arterial média
QL	quimiluminescência Iniciada por t-BOOH
SOD	enzima superóxido dismutase
t-BOOH	hidroperóxido de tert-butil
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -Representação esquemática da captação de colesterol pela célula, via LDLr. Substâncias vasoativas derivadas do endotélio.....	05
FIGURA 2 - Colesterol total em mg/dL.....	09
FIGURA 3 – Pressão arterial média (mmHg) durante registro de repouso por vinte minutos nos animais estudados.....	46
FIGURA 4 – Delta (mmHg) da resposta hipotensora, provocada pela injeção de nitroprussiato de sódio.....	47
FIGURA 5 – Delta (mmHg) da resposta hipertensora provocada pela injeção de fenilefrina.....	49
FIGURA 6 – Resposta taquicárdica (índice médio em bpm/mmHg) decorrente da injeção de nitroprussiato de sódio.....	50
FIGURA 7 – Resposta bradicárdica (índice médio em bpm/mmHg) decorrente da injeção de fenilefrina.....	52
FIGURA 8 – Quimiluminescência nos eritrócitos em contagem segundo por mg de proteína (cps/mg de proteína).....	54
FIGURA 9 – Quimiluminescência no tecido cardíaco em contagem segundo por mg de proteína (cps/mg de proteína).....	55
FIGURA 10 – Níveis plasmáticos de carbonilas apresentados em Nano moles por mg de proteína (nmolels/mg de proteína)....	56

FIGURA 11 – Níveis de carbonilas no tecido cardíaco apresentados em nano moles por mg de proteína (nmoles/mg de proteína).....	58
FIGURA 12 – Níveis plasmáticos de Nitratos Totais apresentados em micro moles por litro (umoles/L).....	59
FIGURA 13 – Níveis de Nitratos Totais no tecido cardíaco apresentados em micro moles por litro (umoles/L).....	60
FIGURA 14 – Atividade da superóxido dismutase nos eritrócitos apresentada em USOD/mg de proteína.....	61
FIGURA 15 – Atividade da superóxido dismutase no tecido cardíaco apresentada em USOD/mg de proteína.....	63
FIGURA 16 – Atividade da catalase nos eritrócitos apresentada em pmoles/mg de proteína.....	64
FIGURA 17 – Atividade da catalase no tecido cardíaco apresentada em pmoles/mg de proteína.....	65
FIGURA 18 – Atividade da glutathione peroxidase nos eritrócitos apresentada em nmoles/min/mg de proteína.....	66
FIGURA 19 – Correlação positiva entre a atividade da SOD e níveis plasmáticos de NOx.....	67
FIGURA 20 – Correlação positiva entre a atividade da CAT e níveis plasmáticos de NOx.....	67
FIGURA 21 – Correlação positiva entre a atividade da GPx e níveis plasmáticos de NOx.....	68

1. INTRODUÇÃO

O estudo das doenças cardiovasculares, sejam elas causas ou efeitos da hipertensão, vem assumindo papel cada vez mais importante na busca de soluções para os problemas do homem moderno. Dia a dia as populações substituem suas dietas por alimentos mais fáceis de preparar, altamente palatáveis, porém muito mais calóricos e com menos nutrientes essenciais à saúde. Se considerarmos que os hábitos da vida moderna também incluem o sedentarismo, facilmente compreenderemos o surgimento da obesidade e de todas as conseqüências da ingesta desbalanceada de gorduras, como o diabetes e a hipertensão.

A hipertensão arterial, responsável por muitos casos de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e nefropatia crônica, encontra-se dentre as principais causas de doenças cardiovasculares, apresentando-se como doença crônico-degenerativa que afeta 20% da população dos países industrializados do mundo. Além disso, ela é freqüentemente associada com fatores de risco adicionais para aterosclerose, tais como: hipercolesterolemia, deficiência de estrógenos e hiperinsulinemia (Nicckenig e col., 2002). No presente estudo um aumento dos níveis de colesterol foi causado pela ausência de receptores para o LDL.

1.1 Camundongo com ausência do receptor para lipoproteínas de baixa densidade (LDLr)

Neste estudo, utilizamos um camundongo geneticamente manipulado, homocigoto para a ausência do receptor de lipoproteínas de baixa densidade. O LDLr é um receptor com papel fundamental na homeostase do colesterol, pois regula a absorção de lipoproteínas que fornecem o colesterol necessário tanto para biogênese das membranas celulares, quanto para a formação de ácidos biliares e esteróides (figura 1). Os hepatócitos são o principal sítio de remoção de lipoproteínas da circulação, porém os LDLr são também expressos em um grande número de outras células, como por exemplo nos fibroblastos (Ishibashi e col., 1993, Marks & Marks 1998).

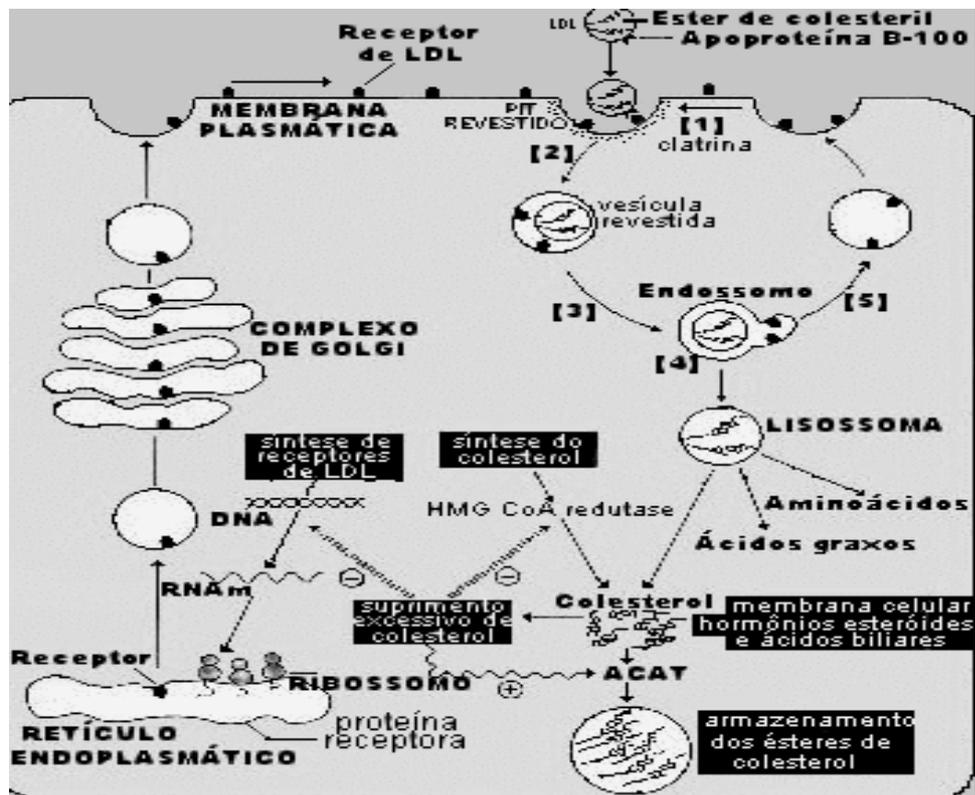


Figura1: Representação esquemática da captação de colesterol pela célula, via LDLr. Fonte : Site do iemrams.

Os LDLr são produzidos pelo retículo endoplasmático e complexo de Golgi e vão para a superfície da célula, onde são ligados a proteínas que após se envaginarem na membrana, se dissociam formando endossomos. Após

ligarem-se ao LDL, os receptores o carregam para o interior do endossomo por endocitose. Nos endossomos, as lipoproteínas se dissociam dos receptores e, depois da fusão dos endossomos com lisossomos, ocorre digestão do LDL por enzimas hidrolíticas, o que permite a utilização do colesterol pela célula. Quando há um excesso de colesterol no interior dessa célula, ocorre redução na síntese de hidroximetil-glutaril COA redutase (HMGCOA redutase) que é a principal enzima da síntese de colesterol, e dos LDLr. Assim, pode ocorrer diminuição tanto na síntese dos receptores, como da enzima responsável pela sua síntese (Gent & Braakman, 2004) quando por exemplo, o consumo de gordura na dieta é elevado ou o LDLr está ausente no organismo.

A absorção celular de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) contribui para diminuição de lipoproteínas e do colesterol circulante. Dessa forma, o LDLr é um mediador da remoção de LDL do plasma (Jax Mice Database, 2004) e por estar ausente nos camundongos utilizados nesse estudo, representa um excelente modelo de estudo das alterações provocadas pelas elevadas taxas de colesterol sanguíneo sobre o estresse oxidativo e o controle reflexo da pressão arterial (PA).

1.2 Hipercolesterolemia

Como sabemos, o colesterol é um importante constituinte do corpo humano, pois integra as membranas celulares, é usado na síntese de sais biliares, precursor de hormônios esteróides e de vitamina D. Porém, altos níveis de colesterol e de lipoproteínas estão entre os principais fatores de risco para doenças cardiovasculares (Sullivan 2001, Fuster e col., 1992). Como

exemplo, pode-se citar a aterosclerose, que é uma doença complexa e multifatorial, determinada tanto por fatores ambientais, como genéticos. Essa é uma patologia das artérias de grande e médio calibre, caracterizada por alterações da íntima, representadas por acúmulo de lipídios, componentes do sangue, carboidratos complexos, células e material intercelular (Wick e col., 1995; Schmitz e col., 1991; Rival e col., 2002).

O colesterol total que circula no sangue é formado pelas lipoproteínas HDL (lipoproteína de alta densidade), LDL e VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade). O LDL é a fração mais abundante, e ao mesmo tempo a mais nociva, pois tem uma baixa solubilidade podendo levar à formação de placas ateromatosas. Níveis plasmáticos de colesterol total superiores a 220mg/dL são considerados altos (Fuentes, 2004). Os quadros patológicos mais freqüentes de hipercolesterolemia podem ser decorrentes de dieta alimentar não balanceada rica em colesterol ou de origem genética (Sullivan 2002, Reddy & Yusuf, 1998).

Devido à ausência de LDLr nos camundongos estudados, o LDL permanece mais tempo livre na circulação, ocasionando um aumento dos níveis de colesterol no sangue para o dobro do normal (Merat e col., 2000).

A importância do estudo desse modelo de camundongos baseia-se no fato de que, em seres humanos, também podemos encontrar doença de origem genética. Um exemplo é a hipercolesterolemia familiar, que resulta de anomalias no gene que codifica o receptor de superfície celular para remoção do LDL sangüíneo. Em humanos, o gene para LDLr está situado no braço curto do cromossomo 19. Mais de 150 diferentes mutações no gene de LDLr já foram

descritas, incluindo inserções, deleções, mutações sem sentido e de sentido trocado (Gent & Braakman, 2004).

A hipercolesterolemia familiar é uma doença autossômica dominante, com duas síndromes clínicas diferentes: heterozigota e homozigota. (Goldstein & Brown 1995) Nos heterozigotos, indivíduos que têm metade do número usual de receptores funcionais, níveis sanguíneos elevados de colesterol são observados no nascimento, média de 350 mg/dL. Xantomas tendinosos desenvolvem-se em metade dos pacientes antes dos 30 anos de idade, e sintomas de doença cardíaca coronariana ocorrem antes dos 40 anos. Em homozigotos, indivíduos que não têm receptor para LDL, o conteúdo de colesterol sanguíneo atinge níveis muito elevados (600 a 1200 mg/dL), e todos os pacientes apresentam xantomas e aterosclerose generalizada já na infância. Os homozigotos não tratados morrem de infarto do miocárdio antes dos 30 anos de idade (Fuentes e col. 2004). Felizmente, apenas um em um milhão de pessoas é homozigota para essa doença, sendo mais freqüente a hipercolesterolemia familiar na forma heterozigota afetando pelo menos um em cada 500 adultos (Schmidt & Kostner, 1994).

Além disso, de acordo com a literatura, altos níveis de colesterol ainda podem estimular os leucócitos a liberar espécies ativas de oxigênio (EAO) que contribuem para a instalação da aterosclerose (Ludwig e col., 1982, Kok e col. 1991; Prasad & Kalra 1989). A hipercolesterolemia parece estar associada com estresse oxidativo dependente de disfunção endotelial, onde espécies reativas de oxigênio, tais como o ânion superóxido (White e col., 1993) contribuem para a doença circulatória.

Nosso estudo procurou verificar se a ausência do LDLr altera os padrões de estresse oxidativo em camundongos *KO* para esse receptor, e se diminui a biodisponibilidade do óxido nítrico, testada pela quantificação de seus metabólitos em nível sangüíneo.

1.3 Estresse Oxidativo e sua relação com a hipercolesterolemia

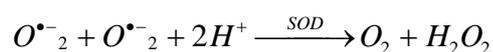
As espécies ativas de oxigênio (EAO), como por exemplo: radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e outros radicais derivados do oxigênio, são geradas em células aeróbicas durante a redução de oxigênio molecular por reações enzimáticas, cadeia transportadora de elétrons e autooxidação de diversas substâncias. (Halliwell & Gutteridge,1985; Yokoyama, 2004).

Normalmente, as EAO são mantidas em baixas concentrações pelo sistema antioxidante, mas quando sua produção está aumentada, elas podem sobrecarregar a capacidade desse sistema, resultando no aparecimento de estresse oxidativo e danos biológicos, como por exemplo, oxidação de lipoproteínas.(Cathcart e col., 1995 Sies & Mehlhorn 1986). O estresse oxidativo gerado pelas EAO, tem sido relacionado com doenças tais como aterosclerose, câncer e doenças neurodegenerativas (Witztum, 1994; Kodja & Harrison 1999). Uma alta produção de EAO e/ou um aumento do estresse oxidativo pode estar relacionado com a gênese da disfunção endotelial, iniciação e progressão da aterosclerose e seus efeitos adversos (Yokoyama, 2004; Cross e col.,1987).

Os efeitos biológicos dos radicais livres sobre lipídios, DNA e proteínas, são controlados por uma variedade de antioxidante exógenos, provenientes da dieta, incluindo vitamina E, C, e componentes fenólicos; e por antioxidantes endógenos, tais como as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (Halliwell & Gutteridge, 1985 ; Gul e col. 2000).

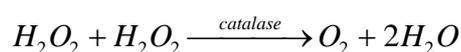
O radical superóxido é convertido até peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima SOD, que é encontrada em quantidades elevadas nas células de mamíferos e acelera a reação em 10^4 vezes a frequência de dismutação espontânea num pH fisiológico (Reação 1).

Reação 1



Por sua vez, o H_2O_2 é metabolizado à água e oxigênio por duas importantes enzimas intracelulares: CAT e GPx (reação 2 e 3, respectivamente).

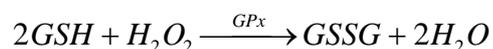
Reação 2



A catalase desempenha um importante papel na eliminação do H_2O_2 , promovendo a sua catálise até água.

A GPx também funciona como mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo, convertendo a glutathione reduzida (GSH) à glutathione oxidada (GSSG), removendo H_2O_2 e formando água (reação 3) (Ferrari e col., 1985).

Reação 3



Como as EAO são continuamente formadas em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo, todas as células aeróbias possuem mecanismos para mitigar seus efeitos agressivos (Dormandy 1978).

Um dos principais mecanismos de lesão em modelos experimentais, onde há aumento da produção de EAO, é a lipoperoxidação (LPO). As membranas das células de mamíferos contêm grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados que podem sofrer lesão peroxidativa. Reações de lipoperoxidação em cadeia, com subsequente quebra de membranas celulares e lipossomais, podem ser induzidas por EAO geradas enzimaticamente. O radical hidroxil e possivelmente o oxigênio singlete reagem com lipídios insaturados de biomembranas, resultando na geração de radicais lipoperóxidos, hidroperóxidos lipídicos e produtos da fragmentação como o malondialdeído, cuja determinação é um dos métodos utilizados para avaliação do estresse oxidativo.

A baixa concentração de SOD e CAT no espaço extracelular resulta na aumentada susceptibilidade dos componentes do espaço intersticial ao fluxo de EAO. Em princípio, qualquer mecanismo que provoque aumento do consumo de oxigênio tecidual promove incremento da geração de EAO, demonstrando que o ato de respirar nos torna altamente suscetíveis ao estresse oxidativo (Salin & McCord, 1977).

Pode-se dizer que um organismo encontra-se sob estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam dominantes (Sies & Mehlhorn 1986).

O Colesterol, principal fator de risco na aterosclerose, pode ser considerado um agente pró-oxidante (Pacifi & Davies, 1991). Na hipercolesterolemia, o colesterol contido nos eritrócitos, leucócitos, polimorfos nucleares, e células endoteliais aumenta podendo provocar incremento na produção de radicais livres (Prasad & Kalra 1989; Kok e col. 1991). Assim, alguns autores sugerem que a resistência dos eritrócitos ao estresse oxidativo esteja diminuída na hipercolesterolemia (Simon e col., 1998; Yalcin e col., 1989). Além disso, ocorrem alterações nas enzimas antioxidantes plasmáticas e teciduais na hipercolesterolemia, o que pode limitar sua capacidade de neutralizar os radicais livres (Efe e col. 2004; Araujo e col.1995).

EAO, como os radicais superóxido e hidroxil, contribuem para modificações oxidativas do LDL, além de implicarem em alterações no relaxamento dependente do endotélio (White e col., 1993). Acreditamos que animais que não possuem LDLr, apresentem taxas sanguíneas de colesterol mais elevadas, provocando aumento na formação de EAO, diminuindo a biodisponibilidade de NO, e conseqüentemente provocando aumento da PA.

Alguns estudos ainda sugerem uma correlação entre o LDL oxidado e a enzima NADPH oxidase (Rueckschloss e col. 2001, Azumi e col. 2002, Kobayashi e col. 2003). No sistema cardiovascular, a NADPH oxidase está associada a membrana celular e usa como substrato o NADH ou o NADPH como doadores de elétrons. O NADPH, além de estar comprovadamente envolvido na geração de óxido nítrico na célula endotelial vascular, na presença da enzima NADPH oxidase também reage com 2 moléculas de oxigênio formando ânion superóxido ($\text{NADPH} + 2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NAD(P)}^+ + \text{H}^+ + 2 \text{O}_2^-$) (Rajagopalan e col. 1996, Mohazzab & Wolin 1994, Pagano e col. 1995,

Rubanyi & Vanhoutte 1986). Recentemente foi demonstrado que as NADPH oxidases são a maior fonte de superóxidos em miócitos e nas células vasculares (Griendling e col. 2000).

Correlações entre EAO, a subunidade p22phox da enzima NADPH oxidase e LDL oxidado também foram descritas. Assim, as EAO geradas pela p22phox medeiam a oxidação de mais LDL (Azumi e col., 2002). Sendo assim, através da enzima NADPH oxidase, o LDL oxidado pode estar contribuindo para um aumento na produção de radicais superóxido.

Há relatos na literatura de que o LDL oxidado poderia estar afetando a vasodilatação dependente do endotélio, através do decréscimo da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), levando a um possível aumento na pressão arterial. A inativação do NO, ocorre através de sua reação química com o radical superóxido, formando peróxinitrito, que é um ânion extremamente nocivo (Cominacini e col., 2001).

1.4 Óxido Nítrico

As células endoteliais que revestem as artérias e arteríolas sintetizam substâncias que podem afetar o grau de relaxamento ou de contração, da parede arterial. A mais importante substância vasodilatadora, denominada inicialmente de fator relaxante derivado do endotélio (Furchgott 1980) e depois quimicamente identificada por Moncada e col. 1991 é o bem conhecido óxido nítrico.

O NO é uma molécula gasosa e reativa, formada pela ativação da enzima NO sintase. Tem alta afinidade pelo grupo heme, reagindo com

metaloproteínas como a hemoglobina e a guanilato ciclase solúvel. A ativação desta última enzima, leva à formação da guanosina ciclase 3'5'-monofosfato (GMPc), que nas células da musculatura lisa vascular, leva a diminuição do cálcio intracelular com conseqüente relaxamento (Szabo 1995). Por esse mecanismo, o NO provoca relaxamento da musculatura lisa dos vasos, diminuindo a PA.

Além de manter o tônus arterial, evita a proliferação de células musculares lisas, diminui a adesão de monócitos e agregação plaquetária, funciona em altas concentrações como defesa a patógenos e células tumorais, e em baixas concentrações como um sinal em diversos processos fisiológicos, incluindo regulação do fluxo sangüíneo, neurotransmissão, aprendizado e memória (Nathan & Xie 1994). O NO também promove a proteção do LDL contra a oxidação pelos radicais livres, podendo inibir reações de propagação em cadeia de radicais peróxil lipídicos, além de inibir a reação de Fenton por se ligar ao íon ferroso e assim evitar a formação do radical hidroxil (Ródenas e col., 2000).

Sendo assim, o NO pode assumir diversos papéis, que variam da atenuação até a exacerbação dos danos teciduais. O NO ainda pode exercer efeitos citotóxicos através da reação com o radical superóxido, formando peróxinitrito, um potente agente oxidante (Houston e col., 1998). O papel do NO no processo de lipoperoxidação não está bem claro, pois este pode atuar tanto como antioxidante, quanto como pró oxidante, e isso depende de fatores como: a taxa de formação do radical superóxido (Hogg & Kalyanaraman, 1999). Havendo a formação de peróxinitrito, devido a um desbalanço entre o radical superóxido e o óxido nítrico, fica prejudicada sua função como

vasodilatador, tendo como conseqüência um aumento na pressão arterial (White e col. 1993).

A hipercolesterolemia diminui a atividade da NO sintase (NOS) e a vasodilatação dependente do endotélio (Cominacini, e col. 2001) promovendo um desbalanço entre as forças pró e antioxidantes e levando ao aumento da PA que pode ser momentâneo ou promover o estabelecimento de um quadro hipertensivo.

Na fase gasosa, o NO pode reagir com o oxigênio formando dióxido de nitrogênio (NO₂). Porém, na fase aquosa, forma nitrito. *In vivo*, nitrito reage com várias espécies, como a oxihemoglobina, e um produto final estável é formado podendo ser medido no plasma, o nitrato. Nesse estudo quantificamos os nitratos no plasma, como forma indireta para conhecer a biodisponibilidade do NO.

1.5 Hipertensão

A organização mundial da saúde definiu hipertensão como um aumento persistente da pressão arterial em níveis acima de 140 mmHg de pressão sistólica e/ou 90 mmHg de pressão diastólica. O elevado nível pressórico que caracteriza a hipertensão arterial inicialmente apresenta-se assintomático, mas pode contribuir para lesões de órgãos-alvo (Rubin, 2002).

A população negra, em particular, sofre as conseqüências da hipertensão e tem maior probabilidade de apresentar complicações graves quando comparada com a população cuja descendência é européia. Essa etiologia genética da hipertensão ainda não está bem explicada. Alguns

autores sugerem que existe uma correlação entre hipertensão e hiperlipidemias (Trieu & Uckun, 1998).

Outros dados na literatura também sugerem que a hipertensão arterial encontra-se entre as conseqüências da aterosclerose. Assim, a hipertensão e a aterosclerose são responsáveis por grande morbidade e mortalidade mundiais (Stojiljkovic e col. 2001).

Acreditando que algumas das conseqüências geradas por dislipidemias possam provocar hipertensão, e que a hipertensão provavelmente é acompanhada pela disfunção barorreflexa, foi objetivo desse estudo investigar se o aumento do colesterol sanguíneo que provavelmente acompanha a ausência do LDLr, também poderia provocar alterações no controle barorreflexo.

É de fundamental importância que a pressão arterial seja mantida dentro de uma estreita faixa de variação. Vários são os mecanismos que regulam a pressão arterial e garantem ajustes apropriados da freqüência e da contratilidade cardíaca e dos vasos de resistência e capacitância. Mecanismos neurais transportam informações periféricas, tais como nível pressórico, volemia, pH e temperatura, através de receptores específicos, e enviam estas informações a áreas do sistema nervoso central envolvidas na integração das respostas. Através de alterações de tônus simpático e vagal, respostas cardiocirculatórias específicas dos órgãos efetores contribuem para a estabilização e manutenção da pressão arterial, ampliando a capacidade do organismo de sobreviver e de se adaptar (Franchini & Cowley, 1996).

Dentre os mecanismos neurais responsáveis pela regulação da pressão arterial está o barorreflexo, o qual é um dos mais importantes mecanismos

reflexos de controle da pressão arterial momento a momento, que envia sinais por meio do sistema nervoso autonômico até a circulação.

1.6 Barorreceptores

Os níveis de pressão e de distensão da parede arterial são considerados determinantes primários para atividade dos barorreceptores, a qual é modulada por diversos fatores neuro-humorais (Angel-James, 1971, Kirchheim, 1976).

Os barorreceptores são receptores de estiramento, sensíveis às deformações vasculares, e estão localizados nas paredes das grandes artérias. Encontram-se generosamente distribuídos nas paredes das artérias carótidas internas, na região conhecida como seio carotídeo e no arco aórtico. Devido ao acoplamento de sua atividade com o ciclo cardíaco e de sua grande sensibilidade para detectar as alterações agudas de pressão arterial, constituem o principal sistema de regulação reflexa neural de ajuste momento-a-momento da pressão arterial (Irigoyen e col. 2001, Eckberg & Sleight 1992).

Os barorreceptores arteriais dão origem a um complexo arco reflexo com fibras aferentes constituídas pelo nervo do seio carotídeo e nervo depressor aórtico; um centro integrador formado pela amígdala, hipotálamo lateral, núcleo parabraquial da ponte (Franchini e col. 1994) e fibras eferentes representadas pelo sistema nervoso simpático e parassimpático (nervo vago). Dessa forma, através do reflexo comandado pelos barorreceptores aórticos e carotídeos, o sistema nervoso central mantém uma eficiente regulação sobre o débito

cardíaco e a resistência periférica, regulando a pressão arterial (Krieger e col., 1999, Michelini , 2000, Just e col. 2000).

O barorreflexo exerce importante papel na regulação da frequência cardíaca, do débito cardíaco, da contratilidade miocárdica, da vasomotricidade e da distribuição regional do fluxo sanguíneo. Decréscimos na atividade do barorreflexo ocorrem quando mudanças transitórias na pressão arterial não são detectadas adequadamente, e conseqüentemente não são contrabalançadas efetivamente por esses ajustes autonômicos compensatórios. (Eckberg & Sleight, 1992).

A função primordial do barorreflexo é a de tamponar variações bruscas da PA, em diferentes situações comportamentais como exercício físico, mudança de postura, sono, etc. (Fazan e col.,2001).

Embora os receptores arteriais sejam capazes de se adaptar aguda e cronicamente a altos níveis de PA (Krieger 1989), a disfunção barorreflexa tem sido documentada na hipertensão arterial e em outras doenças cardiovasculares em estudos clínicos e experimentais (Irigoyen & Krieger 1998, Zanchetti & Mancia 1991).

Há relatos na literatura de que altos níveis de colesterol poderiam estar contribuindo para um prejuízo na atividade barorreflexa, bem como para um aumento na disfunção endotelial e da biodisponibilidade de NO.(Patterson e col., 2002). Decréscimos na sensibilidade barorreflexa também podem estar associados aos efeitos estruturais ou bioquímicos da aterosclerose nos barorreceptores aórticos e carotídeos (Gianaros e col. 2002, Vlachakis e col.,1976). Esses achados nos levam a acreditar que também o controle

barorreflexo provavelmente encontra-se prejudicado em animais com ausência dos LDLr.

2. HIPÓTESE

A deficiência de receptores de LDL produz aumento dos níveis de colesterol total, provocando elevação do estresse oxidativo, o que pode levar à redução do controle barorreflexo da pressão arterial e hipertensão.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi quantificar as alterações do controle reflexo da circulação na ausência de receptores de LDL, bem como avaliar alterações do estresse oxidativo sistêmico e no miocárdio.

Específicos:

- Avaliar a pressão arterial em camundongos *knockout* para receptores de LDL.
- Avaliar a sensibilidade dos reflexos comandados pelos barorreceptores, nesses animais.
- Verificar os níveis óxido nítrico nesse modelo animal, que foi quantificado pela avaliação de seus metabólitos (nitratos totais).
- Medir o dano oxidativo sistêmico e cardíaco através de lipoperoxidação e de oxidação às proteínas.
- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) na ausência de receptores de LDL.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados camundongos machos controles (C57BL/6) e *Knockout* para receptores de lipoproteína de baixa densidade (peso entre 25 e 30 gramas), provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul em gaiolas contendo, no máximo, quatro animais. Os camundongos receberam água e ração padrão ad libitum, a temperatura foi mantida entre 20 e 25°C e o ciclo claro-escuro foi de 12 horas.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para realização deste estudo utilizamos camundongos controles C57BL/6 (C) e *Knockout* para receptores de LDL (KO).

Nas análises hemodinâmicas e de estresse oxidativo utilizamos 11 animais do grupo C e 6 do grupo KO. Para confirmar os níveis de colesterol, utilizamos mais dois grupos de animais, 13 do grupo C e 5 KO.

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 Procedimento Cirúrgico

Quatro dias antes do registro de pressão arterial/reflexos, os animais foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg) e Cloridrato de xilazina (16mg/kg) para implantação dos catéteres de polietileno. Duas cânulas preenchidas com soro fisiológico 0,9% e heparina sódica (Liquelme-Roche, 5000U) na proporção de 0,5ml para 0,02ml, respectivamente, foram introduzidas, através de uma pequena incisão na região esquerda do pescoço, na artéria carótida e veia jugular, para obtenção dos registros de pressão arterial, frequência cardíaca e administração das drogas. As cânulas foram fixadas com fio de algodão, passadas subcutaneamente, e exteriorizadas no dorso da região cervical onde foram fixadas à pele com fio de algodão.

4.3.2 Registro de Pressão Arterial

Quatro dias após a canulação, estando o animal acordado, a cânula arterial foi conectada a uma extensão de 10 cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal pela caixa (Plexiglas, 25x15x10cm) durante todo o experimento. A extensão foi conectada a um transdutor eletromagnético (P23 Db, Gould-Statham, Oxnard, CA, EUA) ligado a um pré amplificador (Hewlett-Packard 8805C, Puerto Rico, EUA). Os sinais de pressão arterial foram gravados durante 20 minutos em um microcomputador equipado com sistema de aquisição de dados (CODAS, 1Kz, DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA) que permitiu a análise dos pulsos da pressão, batimento a batimento (frequência de amostragem 2000 Hz por canal), para estudo dos valores de

pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca. Os valores de frequência cardíaca foram derivados do sinal pulsátil da pressão arterial.

4.4 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE REFLEXA PRESSORRECEPTORA

Após o registro da pressão arterial e da frequência cardíaca em repouso durante 20 minutos, foram injetadas as drogas vasoativas fenilefrina e nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA).

Fenilefrina, uma amina simpatomimética que atua sobre receptores alfa-adrenérgicos, para produzir vasoconstrição aumentando a resistência periférica, foi usada para provocar o aumento da pressão arterial. Pelo aumento da atividade vagal foi produzida bradicardia reflexa (comandada pelos pressoreceptores) que acompanhou a resposta pressora da fenilefrina.

Nitroprussiato de sódio, um potente vasodilatador tanto de arteríolas (vasos de resistência) como de veias (vasos de capacitância), diminui a resistência vascular periférica, reduzindo, desta forma, o retorno venoso ao coração com conseqüente redução da pré-carga ventricular. Sua ação se dá por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3', 5'-guanosina monofosfato (GMP cíclico) na musculatura lisa de vasos e outros tecidos. Este foi usado para provocar queda de pressão arterial com conseqüente taquicardia reflexa comandada pelos pressorreceptores.

Após conectar o animal ao sistema de registro, aguardou-se a estabilização da pressão arterial e frequência cardíaca aos níveis de repouso, para dar início a gravação por 20 minutos dos níveis cardiovasculares basais.

A sensibilidade pressorreceptora foi testada através de injeções de fenilefrina (40ng) e nitroprussiato de sódio (40ng) de forma randomizada. O volume injetado foi de 20 μ L para cada droga, sendo observado um intervalo mínimo entre injeções para que a pressão arterial e frequência cardíaca retornassem aos valores basais de repouso. Os picos, máximos e mínimos da pressão arterial, foram registrados após cada dose de fenilefrina ou nitroprussiato e comparados ao valor de pressão arterial média do período controle. Para cada dose de droga injetada, a variação máxima ou mínima da frequência cardíaca foi comparada com os valores de frequência cardíaca do período controle, imediatamente antes da injeção das drogas, para posterior quantificação das respostas.

Os deltas (mmHg) de resposta hipertensora ou hipotensora foram calculados através da subtração da pressão arterial máxima (para a fenilefrina), ou mínima (para o nitroprussiato) pelo valor da pressão arterial basal, obtida antes das injeções. Os valores apresentados representam a média \pm desvio padrão dos deltas de cada grupo.

Os índices médios de bradicardia e taquicardia reflexa foram calculados pela razão entre os deltas de frequência cardíaca e pressão arterial, que é a variável independente ($\Delta FC/\Delta PAM$).

4.5 MORTE DOS ANIMAIS E PREPARO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Após as etapas hemodinâmicas do experimento, os animais foram mortos através de decapitação. O sangue foi coletado por exsangüinação e centrifugado por cinco minutos a 3000rpm em centrífuga refrigerada, entre 0 e

4°C (Sorval RC 5B-rotor SM24, Du Pont Instruments, EUA), para separação do plasma, o qual foi reservado para dosagem de colesterol total, nitratos totais e carbonilas. Os glóbulos vermelhos foram lavados três vezes em solução fisiológica e mantidos na geladeira. As amostras para quantificar a lipoperoxidação consistiram de 75µl de glóbulos lavados, adicionados à 500µl de soro fisiológico. A análise da quimiluminescência foi realizada no mesmo dia ou no máximo no dia seguinte. Para determinação da atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase foram tomados 50µl da solução contendo os glóbulos vermelhos lavados. Essa solução de glóbulos vermelhos foi diluída em 0,5ml da solução com 1mM de ácido acético e 4 mM de sulfato de magnésio. As amostras foram congeladas para posterior determinação das atividades das enzimas.

4.5.1 Preparação das Amostras de Tecido

Após o sacrifício e coleta de sangue do animal, o coração foi coletado, pesado e então homogeneizado em aparelho ultra Turrax com solução de KCl (1,15% p/v) e PMSF. Em seguida, foi centrifugado sob refrigeração e, logo após, o sobrenadante foi separado para posteriores análises de carbonilas, nitratos totais, quimiluminescência e atividade das enzimas SOD e CAT .

4.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.6.1 Dosagem de Colesterol Total

Para a dosagem de colesterol total nas amostras de plasma, utilizou-se o método enzimático colorimétrico validado pela Organização Mundial da Saúde para humanos. As reações ocorrem com um grau elevado de especificidade, onde todo o colesterol presente reage com a enzima colesterol esterase e por uma cascata de reações origina o peróxido de hidrogênio.

Os reagentes utilizados nas reações são: enzimas colesterol esterase, colesterol oxidase, peroxidase, além do sistema cromóforo, composto por fenol e 4-aminoantipirina.

O método se baseia no princípio de que os ésteres de colesterol, presentes na amostra em estudo, são hidrolisados pela enzima colesterol esterase até colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é então oxidado pela enzima colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimida que é um produto corado, sendo determinado espectrofotômetricamente a 500nm. Os resultados foram expressos em mg/dL (Kaneko, 1997).

4.6.2 Dosagem de Proteínas e da concentração de hemoglobina

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg/ml (Lowry, 1951). Os resultados foram expressos em mg de proteína/ml de amostra.

A medida da concentração de hemoglobina foi realizada de acordo com o método de cianometahemoglobina. Esse método baseia-se na oxidação do

ferro da hemoglobina pelo ferricianeto de potássio em pH fracamente alcalino (7,7-8,0). Forma-se metahemoglobina que é convertida em cianometahemoglobina ao reagir com cianeto de potássio. Para a realização da medida, foram pipetados 5ml de solução de Drabkin (KCN 9 mM e $K_3[Fe(CN_6)]$ 0,9mM) e 20 μ l de glóbulos vermelhos previamente preparados. A leitura foi feita em espectrofotômetro Cary com comprimento de onda de 546 nm. A concentração de hemoglobina foi expressa em mg/ml.

4.6.3 Medida de Lipoperoxidação (LPO)

4.6.3.1 Quimiluminescência Iniciada por t-BOOH (QL)

O método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (o hidroperóxido de tert-butil – t-BOOH) à solução contendo os eritrócitos, ou homogeneizado de tecido, avaliando-se a capacidade de resposta produzida pela amostra. Esse teste consiste no fato de os hidroperóxidos serem espécies químicas bastante instáveis, e reagirem com lipídios da amostra, por um mecanismo radicalar, gerando produtos emissores de luz quantificável.

A quimiluminescência foi medida, no mesmo dia em que foi realizada a coleta de sangue, em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Bromma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em 4 mL de uma solução tampão de fosfatos (30mM), contendo KCl 120 mM (pH 7,4), ao qual foi adicionado 10 μ l

da amostra (homogeneizado de tecido ou glóbulos vermelhos previamente lavados e diluídos em soro fisiológico). Foram realizadas três leituras, considerada como a emissão basal de luz pelo homogeneizado ou solução de eritrócitos. O hidroperóxido de tert-butil foi usado na concentração de 400 mM, dos quais foram adicionados 30 µL no meio de reação. Foi medida a emissão máxima de luz e desta, descontada a emissão basal do homogeneizado para fins de cálculo. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps) por miligrama de hemoglobina ou proteína (Gonzalez Flecha et al, 1991).

4.6.4 Avaliação do Dano Oxidativo às proteínas

Esse ensaio está baseado na medida das carbonilas provenientes da oxidação de proteínas por radicais livres.

Primeiramente as amostras de plasma ou homogeneizado de tecido foram incubadas com 2,4-dinitro fenil hidrazina (DNPH) , enquanto o branco foi incubado com ácido clorídrico, por uma hora, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, ocorrendo uma leve agitação a cada quinze minutos. Em seguida acrescentou-se TCA 20% deixou-se em repouso por 10 minutos e centrifugou-se. Desprezou-se o sobrenadante, acrescentou-se TCA 10%, centrifugou-se novamente, e fez-se três lavagens do sedimento com uma mistura de acetato de etila- etanol (1:1), seguidas de centrifugações. Dissolveu-se então o sedimento em uma solução de guanidina, agitando-o durante dez minutos sob temperatura de 37°C. Logo após fez-se a leitura das amostras e dos brancos de cada uma delas em espectrofotômetro a 360nm. O resultado foi dado em nmoles/ mg de proteínas.

4.6.5 Enzimas antioxidantes

4.6.5.1 Superóxido Dismutase (SOD)

As superóxido dismutases catalisam a reação de dois ânions superóxido, com a conseqüente formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a CAT e a glutathiona peroxidase. A velocidade da reação catalisada pela SOD é 10^4 vezes maior que a velocidade de dismutação espontânea em pH fisiológico.

A técnica utilizada neste trabalho para determinação da SOD está baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção.

Uma vez que não se consegue determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, se utiliza a quantificação em unidades relativas. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado.

Para tanto, primeiramente foi efetuada uma curva padrão usando as concentrações de 0; 0,25; 0,5 e 1 unidade de SOD, através da qual foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos. Foram adicionados à cubeta a solução tampão (tris 50mM e EDTA 1mM), 4 μ l de solução de catalase (30 μ M) e

volumes adequados das soluções de SOD, obtendo-se as concentrações desejadas.

No meio de reação, foram utilizados 15 μ l da amostra (solução de eritrócitos ou homogeneizado de tecido previamente preparados), tampão Tris-Fosfato, 8 μ l de pirogalol (24mM) e 4 μ l de catalase (30 μ M). O aparelho foi zerado e as leituras realizadas. A variação na absorvância foi acompanhada a 420 nm durante 2 minutos e os resultados expressos em U SOD/mg de proteína (Marklund, 1985).

4.6.5.2 Catalase (CAT)

A atividade da catalase é diretamente proporcional a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio e obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem. Sendo assim, sua atividade pode ser medida através da avaliação do consumo de peróxido de hidrogênio.

Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorvância no comprimento de onda (λ) de 240nm, uma vez que é neste λ que ocorre maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Utilizam-se cubetas de quartzo devido à alta energia do comprimento de onda em que foram realizadas as medidas .

Para a realização das medidas foi usada uma solução tampão constituída de fosfatos a 50 mM em pH 7,4. Foram adicionados 955 μ l deste tampão e 30 μ l de amostra (solução de glóbulos vermelhos ou homogeneizado de tecido, previamente preparada) na cubeta do espectrofotômetro, sendo esta mistura descontada contra um branco de tampão fosfato. A seguir foram adicionados 15 μ l de peróxido de hidrogênio (0,3 mol/l) e foi monitorada a

diminuição da absorvância durante dois minutos no comprimento de onda selecionado.

Os resultados foram expressos em pmoles por mg de proteína (Boveris & Chance, 1973).

4.6.5.3 Glutathione Peroxidase (GPx)

A enzima glutathione peroxidase (GPx) catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione oxidada (GSSG) e o produto de redução do hidroperóxido. Logo, sua atividade pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPx.

A amostra foi preparada adicionando-se uma mistura de cianetos para inibir a atividade pseudo-peroxidase da hemoglobina, a fim de que esta não interferisse no ensaio. Para medir a concentração de hemoglobina, misturou-se 100 μ l da solução de glóbulos vermelhos com 1ml da solução de Drabkin (8,5% da solução de KCN (9mM), 66% da solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ (0,9mM), q.s.p. 10 ml de água destilada) e fez a leitura a um comprimento de onda de 546nm.

Depois de conhecida a concentração de hemoglobina, tomou-se, para cada 0,6mg/ml de hemoglobina, 100 μ l de solução transformante(50% de KCN (9mM), 50% de $K_3[Fe(CN)_6]$ (0,9mM)) que transforma toda a hemoglobina em cianometahemoglobina inibindo a atividade peroxidante da hemoglobina.

Para medir a atividade da GPx , foram adicionados 330 μ l de tampão (EDTA 1mM em fosfato de potássio, pH 7,7), 50 μ l de amostra transformada, 500 μ l de NADPH (10mM), 10 μ l de azida (1mM), 50 μ l de glutathione reduzida

(100mM em ácido metafórico a 5%) e 10 μ l de glutathiona redutase. Registrou-se a absorvância por um período de dois a quatro minutos a 340nm, para obtenção da linha de base. Em seguida adicionou-se 150 μ l de hidroperóxido de tert-butil (10 mM), e leu-se por mais alguns minutos. A atividade da GPx foi medida em um espectrofotômetro de marca Varian, modelo Cary. Os resultados foram expressos em μ moles/min/mg de proteína (Flohé & Gunzler, 1984).

4.6.6 Medida de Nitratos Totais

Os níveis de nitratos são avaliados pela reação das amostras com o reagente de Griess, pelo método descrito por Granger. As amostras são incubadas com cofatores enzimáticos e nitrato redutase por trinta minutos em temperatura ambiente, para conversão de nitrato em nitrito. O nitrito formado é então analisado pela reação deste com o reagente de Griess, que forma um composto corado que é medido espectrofotometricamente no comprimento de onda de 540 nm. Os resultados são avaliados comparando-se com uma curva padrão feita utilizando-se nitrato de sódio 1mM (Granger 1999).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística dos dados, foi utilizado o software GraphPad Instat, versão 3.0 para Windows 95 (GraphPad Software, San Diego, California, EUA). Os gráficos mostrados nas figuras foram gerados pelo software MS Excel 2000.

Para as análises estatísticas foram calculadas as médias e seus desvios padrão sendo a comparação entre os valores, realizada pelo Teste T de Student para amostras não pareadas.

Os valores apresentados são as médias \pm desvio padrão e foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

Para os testes de correlações realizados, foi utilizada a correlação de Pearson ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 EFEITO DA AUSÊNCIA DE RECEPTORES DE LDL NOS NÍVEIS DE COLESTEROL TOTAL

A ausência de receptores de LDL provocou um aumento significativo no nível de colesterol total (mg/dL) no grupo KO ($178,82 \pm 35,46$; n=5) em relação ao controle ($109,79 \pm 12,97$; n=4). Os dados de colesterol total obtidos na análise enzimática estão apresentados na FIGURA 2 .

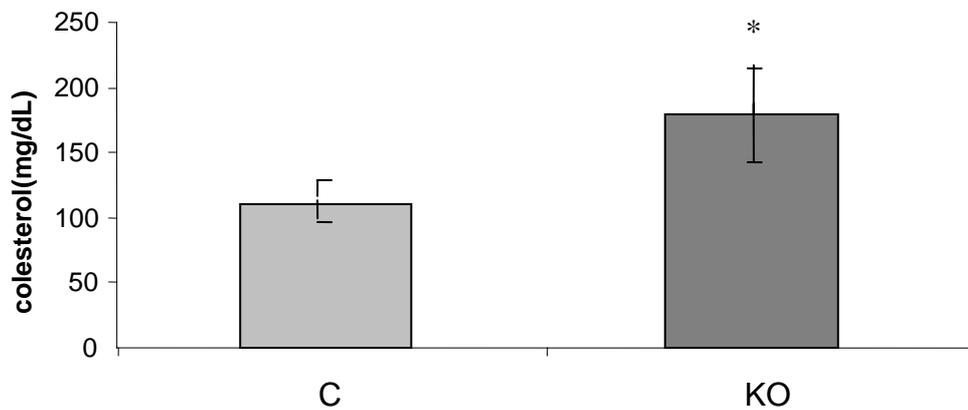


FIGURA 2 – Colesterol Total (mg/dL) . Os valores representam medias \pm desvio padrão da média (DPM).

C= Controle; KO= Knockout

* $p < 0,05$ em relação ao grupo C

5.2 EFEITO DA AUSÊNCIA DE RECEPTORES DE LDL NA PRESSÃO ARTERIAL

A ausência de receptores de LDL provocou um aumento significativo da pressão arterial média (mmHg) no grupo KO ($139,9 \pm 3,06$; n=6) em relação ao controle ($117,74 \pm 6,18$; n=11), mas não provocou mudanças significativas na frequência cardíaca (C= $635,47 \pm 38,36$; KO= $642 \pm 70,85$) . Os dados de pressão arterial obtidos dos registros contínuos de vinte minutos (batimento a batimento) estão apresentados na figura 3 .

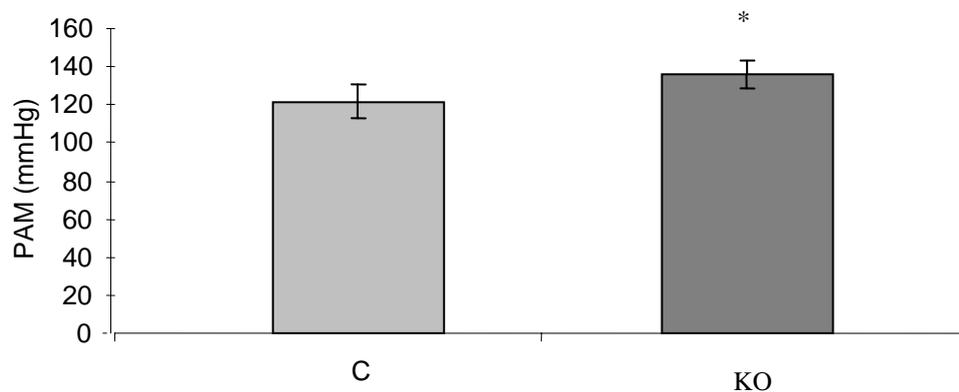


FIGURA 3 – Pressão arterial média (mmHg) durante registro de repouso por vinte minutos nos grupos estudados. Os valores representam médias \pm DPM.

C= Controle; KO= Knockout .

* $p < 0,05$ em relação ao grupo C.

5.3 EFEITO DA AUSÊNCIA DE RECEPTORES DE LDL NA RESPOSTA DA PRESSÃO ARTERIAL

5.3.1 Resposta hipotensora ao nitroprussiato de sódio

A resposta hipotensora (delta médio em mmHg) desencadeada pela injeção de uma única dose de nitroprussiato de sódio, mostrou-se significativamente diminuída no grupo KO ($18,41 \pm 7,32$; n=5) quando comparada aos animais do grupo controle ($28,85 \pm 4,30$; n=5). Os resultados são mostrados na figura 4.

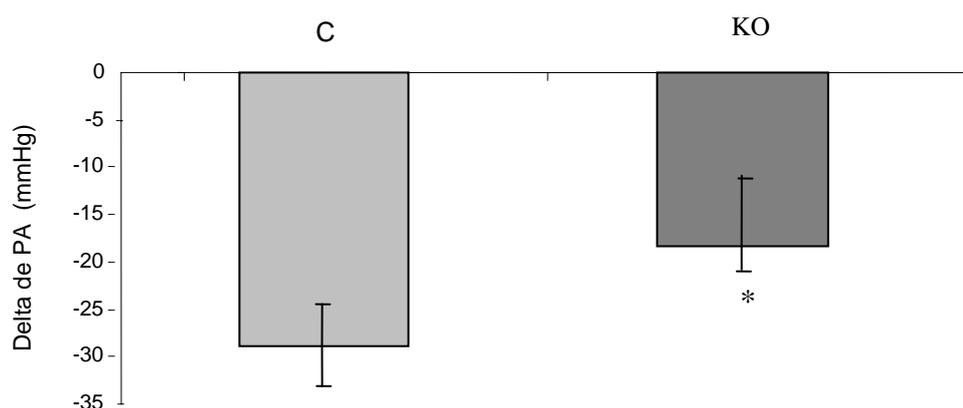


FIGURA 4 – Delta (mmHg) da resposta hipotensora, provocada pela injeção de nitroprussiato de sódio. Os valores representam médias \pm DPM.

C= Controle; KO= Knockout .

* $p < 0,05$ em relação ao grupo C.

5.3.2 Resposta pressora à fenilefrina

A resposta pressora (delta em mmHg) desencadeada pela injeção de dose única de fenilefrina, mostrou-se significativamente diminuída no grupo KO ($20,55 \pm 9,30$; n=5) quando comparada aos animais do grupo controle ($41,55 \pm 14,95$; n=7). Os resultados são mostrados na figura 5.

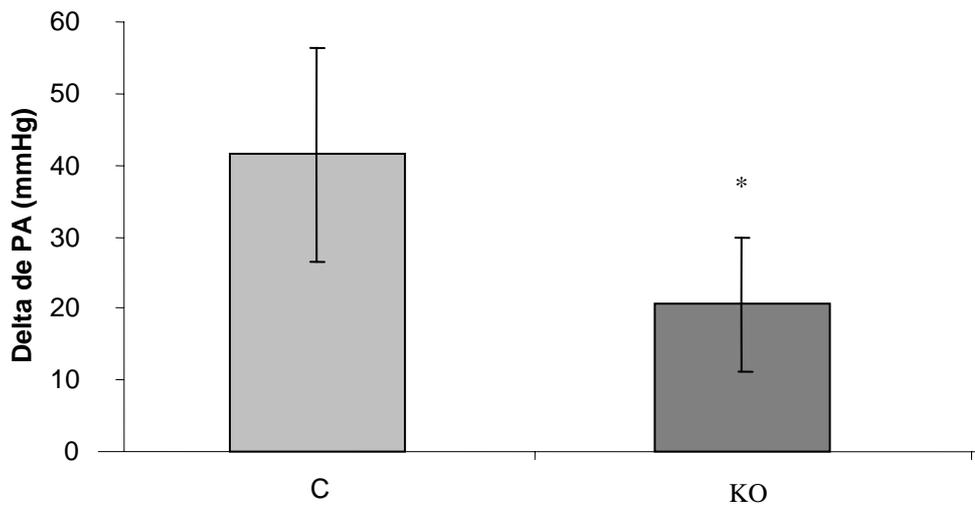


FIGURA 5 – Delta (mmHg) da resposta hipertensora provocada pela injeção de fenilefrina. Os valores representam médias \pm DPM.

C= Controle; KO= Knockout .

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.4 EFEITO DA AUSÊNCIA DE RECEPTORES DE LDL SOBRE A SENSIBILIDADE DO REFLEXO PRESSORRECEPTOR ANALISADA PELO ÍNDICE DE SENSIBILIDADE

5.4.1 Taquicardia reflexa

A resposta taquicárdica ($\Delta FC/\Delta PAM$; índice em bpm/mmHg), decorrente da queda de PAM produzida pela injeção de nitroprussiato de sódio, foi significativamente reduzida nos animais KO ($-1,16 \pm 0,73$) quando comparados

aos controles ($-2,22 \pm 0,61$) (FIGURA 6). Para obter esses índices de sensibilidade foram comparadas variações semelhantes de PA, pois os animais respondem diferentemente à fenilefrina e nitroprussiato de sódio, e se um responde mais, pode ter mais bradicardia, por exemplo.

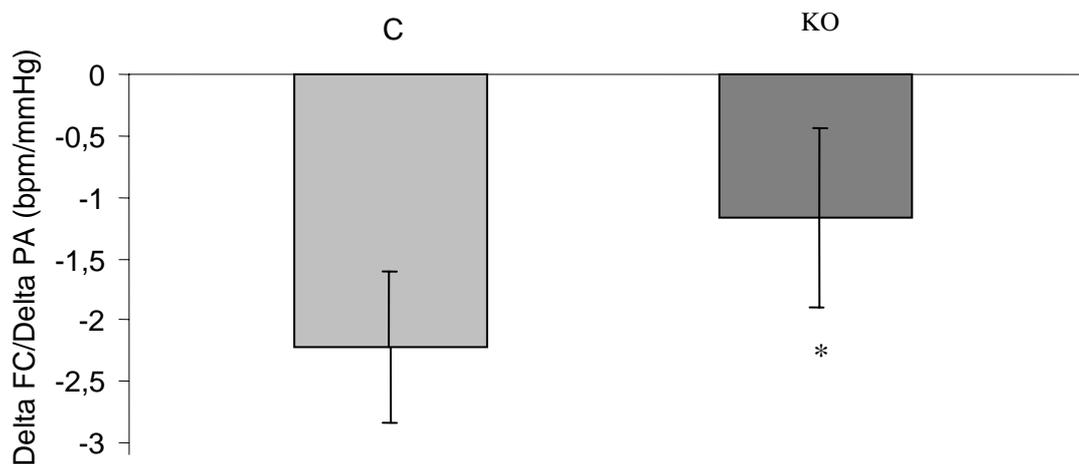


FIGURA 6 – Resposta taquicárdica (índice médio em bpm/mmHg) decorrente da injeção de nitroprussiato de sódio. Os valores representam médias \pm DPM.

C= Controle; KO= Knockout .

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.4.2 Bradicardia reflexa

A resposta bradicárdica (índice médio em bpm/mmHg), decorrente do aumento da PAM produzida por injeção de fenilefrina foi significativamente reduzida nos animais KO ($-2,58 \pm 0,71$) quando comparados aos controles ($-4,43 \pm 1,53$)(FIGURA 7). Os resultados são representados pelas médias \pm desvio padrão.

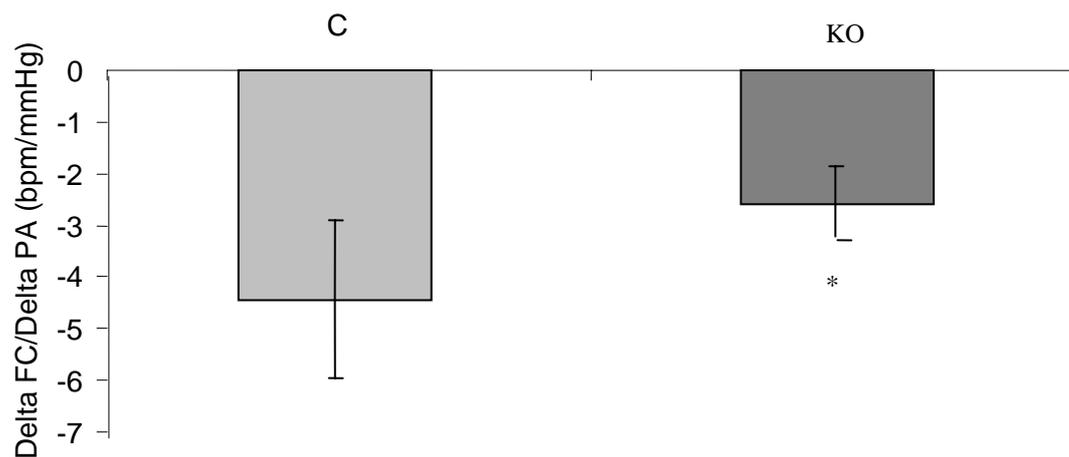


FIGURA 7 – Resposta bradicárdica (índice médio em bpm/mmHg) decorrente da injeção de fenilefrina. Os valores representam médias \pm DPM.

C= Controle; KO= Knockout .

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

5.5.1. Quimiluminescência nos Eritrócitos

Os valores de QL nos eritrócitos (contagem por segundo/mg de proteína) mostraram-se significativamente diferentes entre o grupo KO (21847 ± 5591 ; $n=5$) e o grupo controle (13351 ± 5526 ; $n=6$) (FIGURA 8).

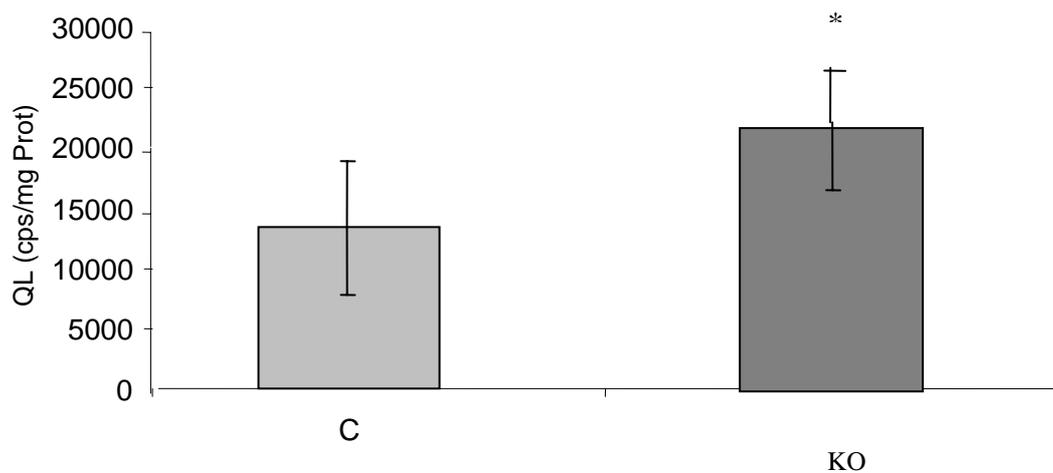


FIGURA 8 – Quimiluminescência em contagens por segundo por mg de proteína (cps/mg de proteína). Os valores representam médias \pm DPM.

C= Controle; KO= Knockout .

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.5.2 Quimiluminescência no Tecido Cardíaco

Os valores de QL no tecido cardíaco (contagem por segundo/mg de proteína) mostraram-se significativamente diferentes entre o grupo KO ($1805,38 \pm 264,9$; $n=4$) e o grupo controle ($1209,93 \pm 404,1$; $n=4$) (FIGURA 9).

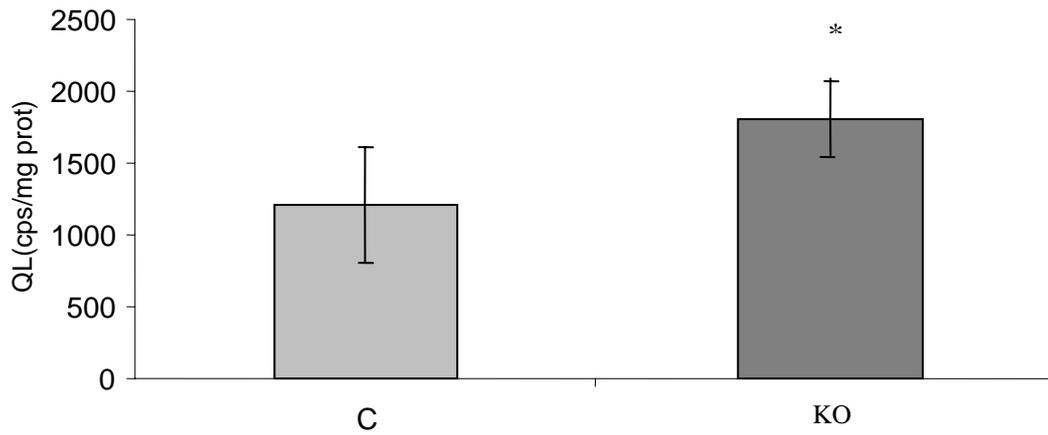


FIGURA 9– Quimiluminescência em contagens por segundo por mg de proteína (cps/mg de proteína). Os valores representam médias \pm DPM.

C= Controle; KO= Knockout .

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.5.3 Dano Oxidativo às Proteínas nos eritrócitos

Os níveis de carbonilas nos eritrócitos (nmoles/mg de proteína) mostraram-se significativamente diferentes entre o grupo KO ($1,354 \pm 0,223$; $n=4$) e o grupo C ($0,98 \pm 0,167$; $n=6$) (FIGURA 10).

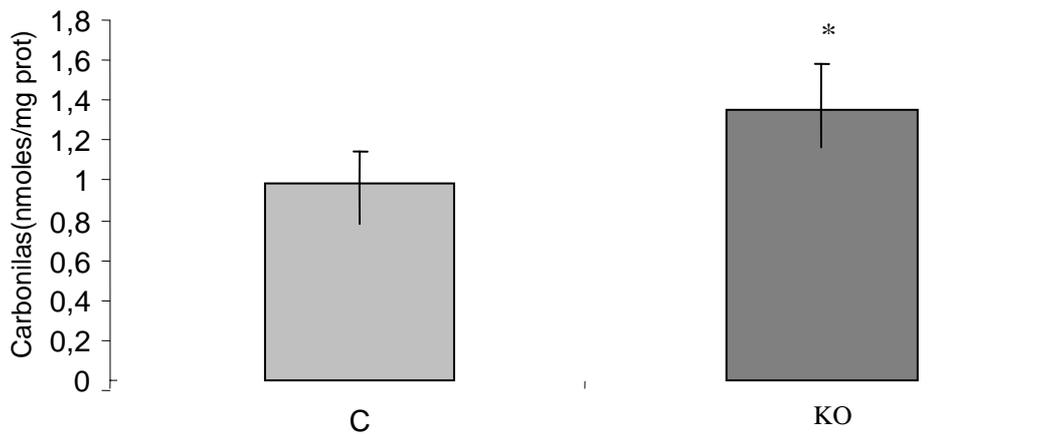


FIGURA 10 – Níveis de Carbonilas apresentados em nanomoles por mg de proteína (nmol/mg de proteína). Os valores representam médias \pm DPM.

C= Controle; KO= Knockout .

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.5.4 Dano Oxidativo às Proteínas no tecido cardíaco

Os níveis de carbonilas no tecido cardíaco (nmol/mg de proteína) mostraram-se significativamente diferentes entre o grupo KO ($16,57 \pm 6,05$; $n=6$) e o grupo controle ($9,19 \pm 2,442$; $n=11$) (FIGURA 11).

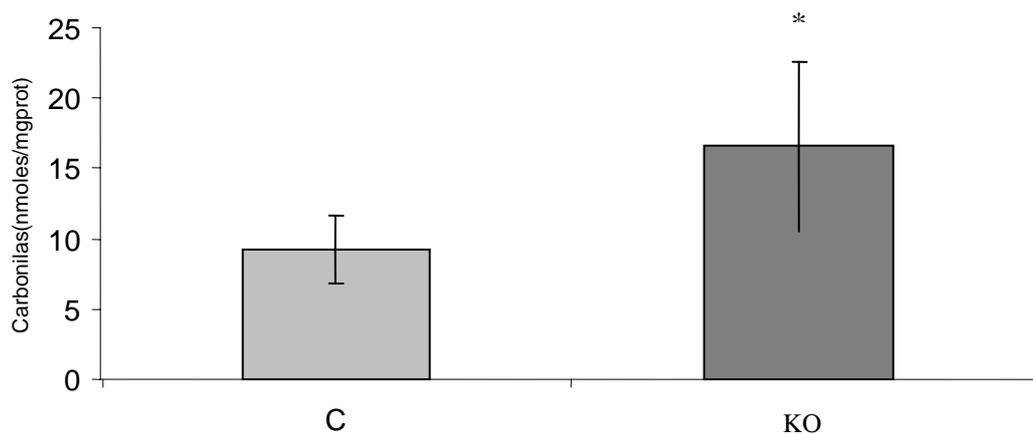


FIGURA 11 – Níveis de Carbonilas apresentados em nanomoles por mg de proteína (nmol/mg de proteína). Os valores representam médias \pm DPM.

C= Controle; KO= Knockout .

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.5.6 Dosagem de Nitratos Totais no Plasma

Os níveis de Nitratos Totais no Plasma ($\mu\text{mol/L}$) mostraram-se significativamente menores no grupo KO ($3,49 \pm 0,52$; $n=6$) em relação ao grupo controle ($4,72 \pm 0,55$; $n=7$) (FIGURA 12).

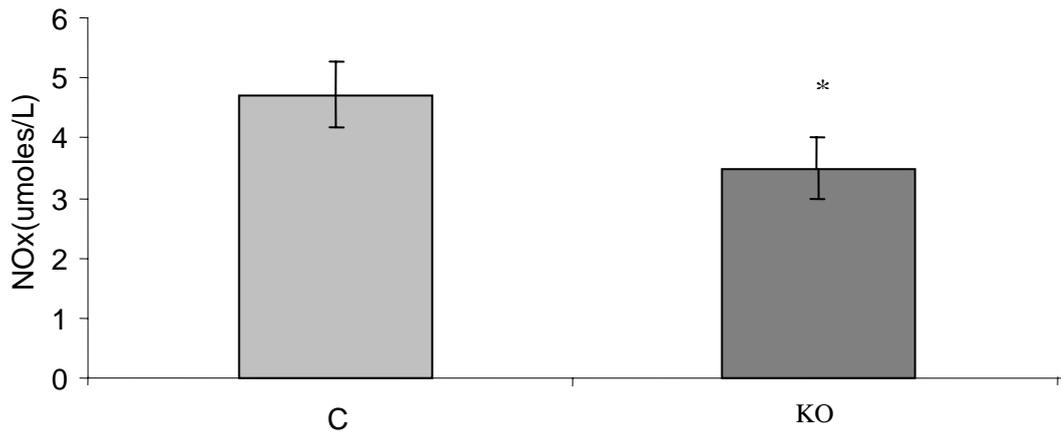


FIGURA 12 – Os Níveis de Nitratos Totais são apresentados em micro moles por litro (umoles/L). Os valores representam medias \pm DPM.

C= Controle; KO= Knockout .

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.5.7 Dosagem de Nitratos Totais no Tecido Cardíaco

Os níveis de nitratos totais no tecido cardíaco (umoles/L) mostraram-se significativamente menores no grupo KO ($7,79 \pm 1,62$; $n=7$) em relação ao grupo controle ($10,53 \pm 1,37$; $n=5$) (FIGURA 13).

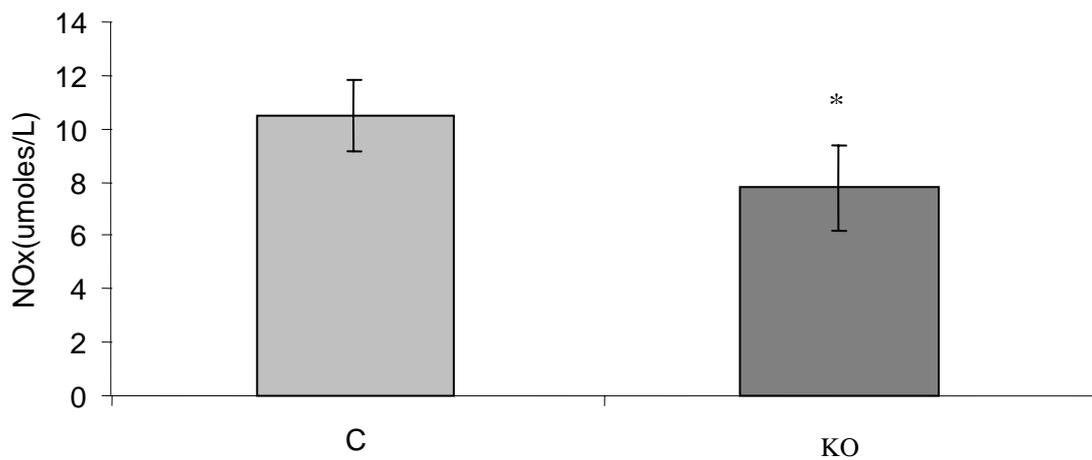


FIGURA 13 – Níveis de Nitratos Totais em tecido cardíaco apresentados em micro moles por litro (umoles/L). Os valores representam médias \pm DPM.

C= Controle; KO= Knockout .

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.5.8 Atividade das enzimas antioxidantes

5.5.8.1 Superóxido Dismutase nos Eritrócitos

A atividade da SOD nos eritrócitos U/mg de proteína apresentou-se significativamente reduzida no grupo KO ($13,04 \pm 1,884$; $n=6$) quando compara ao grupo Controle ($17,15 \pm 2,68$; $n=8$) (FIGURA 14).

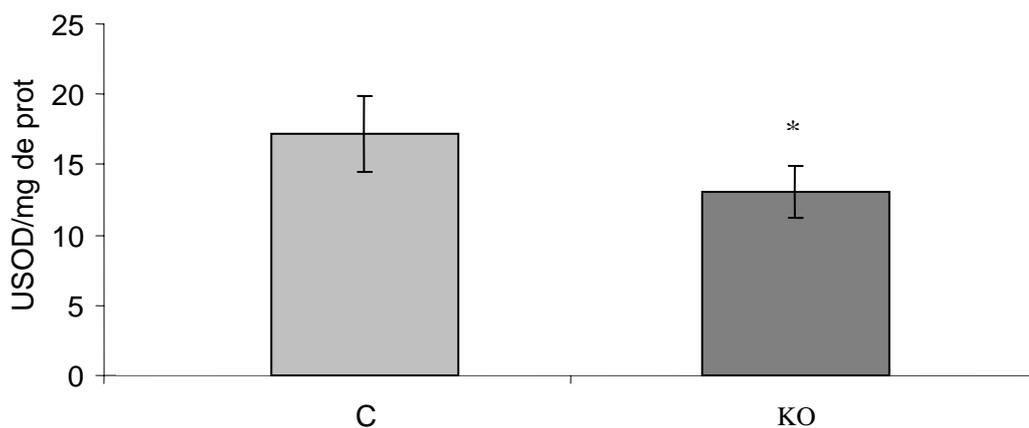


FIGURA 14 – Atividade da superóxido dismutase apresentada em U/mg de proteína. Os valores representam medias $\pm \pm$ DPM.

C= Controle; KO= Knockout .

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.5.8.2 Superóxido dismutase no Tecido Cardíaco

A atividade da SOD no tecido cardíaco U/mg de proteína apresentou-se significativamente reduzida no grupo KO ($25,15 \pm 3,01$; $n=5$) quando comparada ao grupo Controle ($32,84 \pm 6,75$; $n=6$) (FIGURA 15).

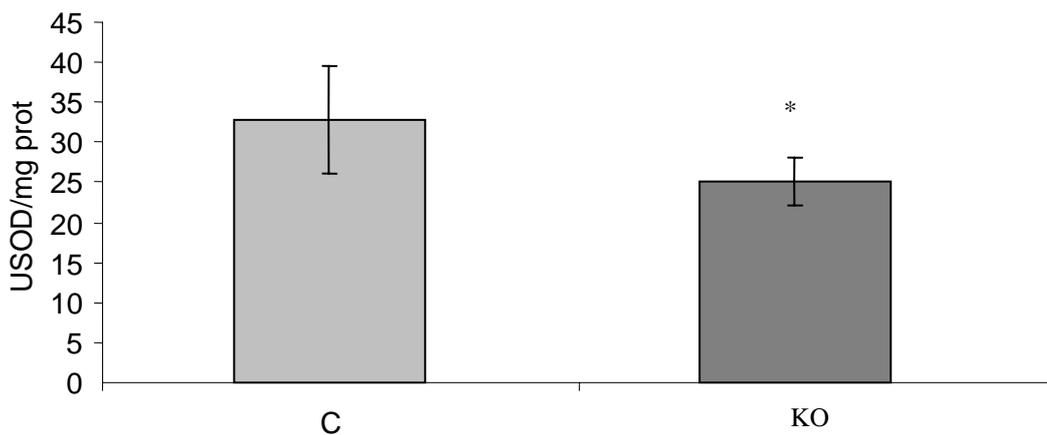


FIGURA 15 – Atividade da superóxido dismutase em eritrócitos em U/mg de proteína. Os valores representam médias \pm DPM.

C= Controle; KO= Knockout .

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.5.8.3 Catalase nos Eritrócitos

A atividade da catalase nos eritrócitos (pmoles/mg de proteína) apresentou-se significativamente menor no grupo KO ($0,50 \pm 0,16$; $n=6$) em relação ao grupo Controle ($1,15 \pm 0,09$; $n=7$) (FIGURA 16).

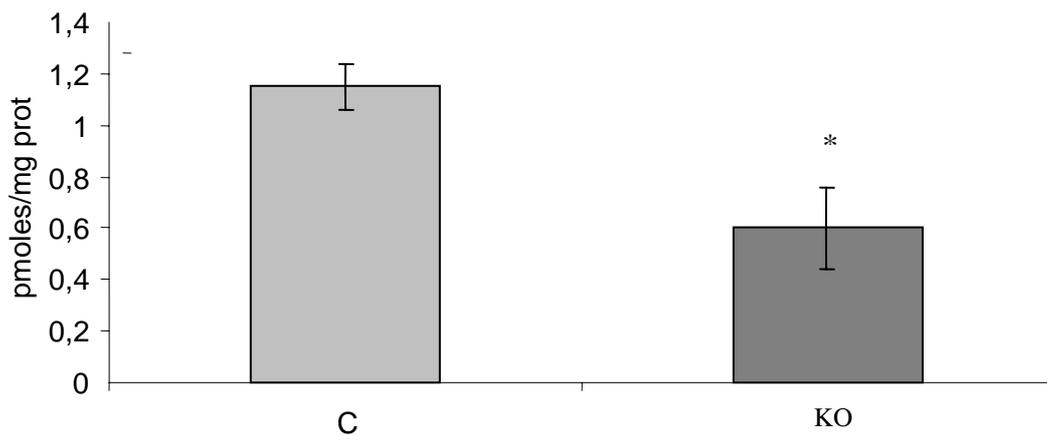


FIGURA 16 – Atividade da catalase em eritrócitos apresentada em pmoles/mg de proteína. Os valores representam médias \pm DPM.

C= Controle; KO= Knockout .

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.5.8.4 Catalase no Tecido Cardíaco

A atividade da catalase no tecido cardíaco (pmoles/mg de proteína) apresentou-se significativamente menor no grupo KO ($2,94 \pm 0,46$; $n=6$) em relação ao grupo Controle ($3,96 \pm 0,79$; $n=6$) (FIGURA 17).

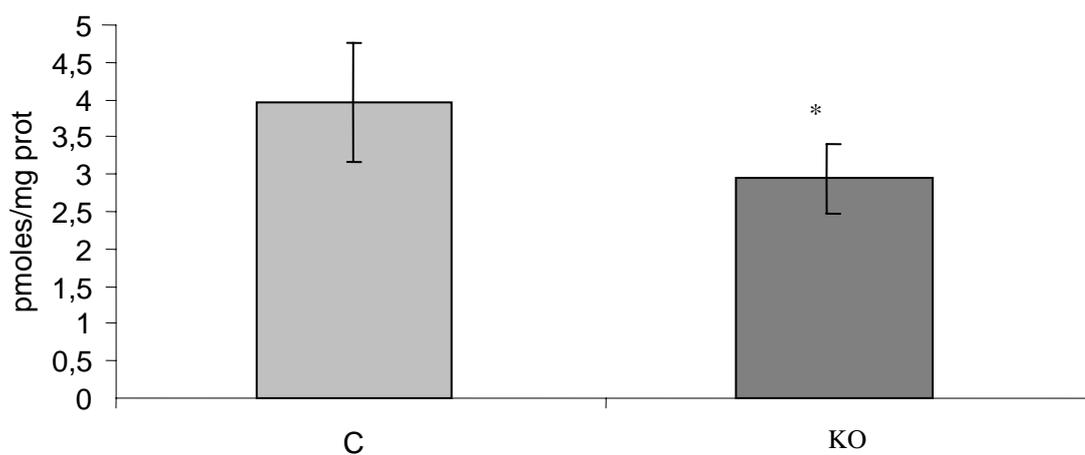


FIGURA 17 – Atividade da catalase em tecido cardíaco apresentada em pmoles/mg de proteína. Os valores representam médias \pm DPM.

C= Controle; KO= Knockout .

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.5.8.5 Glutathione Peroxidase nos Eritrócitos

A atividade da glutathione peroxidase nos eritrócitos (nmoles/min/mg de proteína) apresentou-se significativamente menor no grupo KO ($2,81 \pm 1,54$; $n=6$) em relação ao grupo Controle ($6,09 \pm 2,22$; $n=13$) (FIGURA 18).

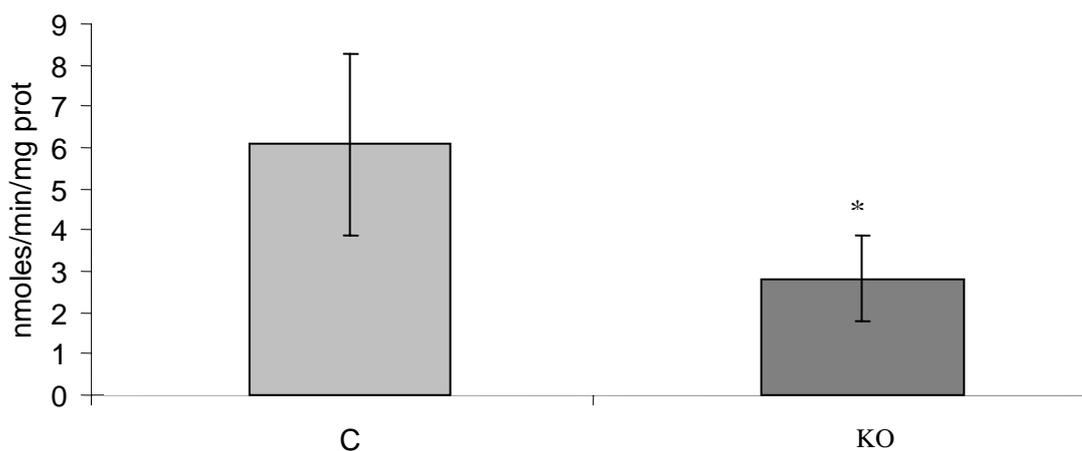


FIGURA 18 – Atividade da glutathione peroxidase apresentada em nmoles/min/mg de proteína. Os valores representam medias \pm DPM.

C= Controle; KO= Knockout .

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.5.9 Relação entre a atividade da SOD em eritrócitos e os níveis plasmáticos de NOx.

Foi observada uma forte correlação positiva ($r=0,9$; $p \leq 0,05$) entre a atividade da enzima SOD nos eritrócitos (USOD/mg de prot) e os níveis plasmáticos de NOx (umoles/L), mostrando que quanto maior a atividade da enzima SOD, maiores são os níveis de NOx (FIGURA 19).

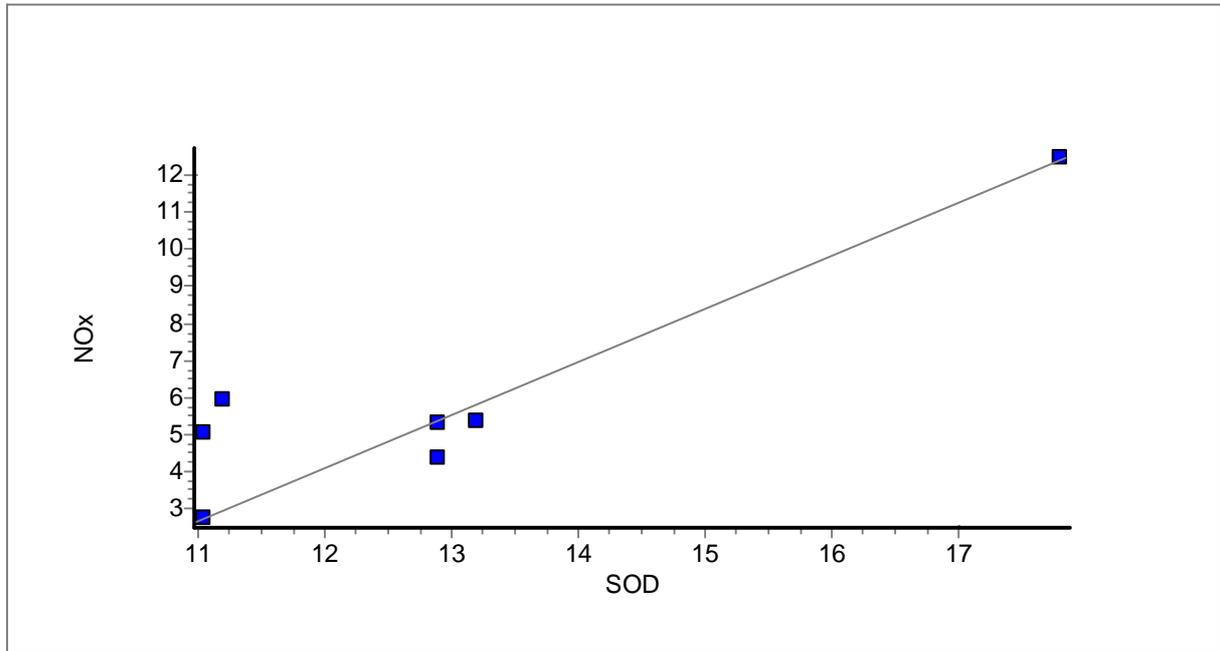


FIGURA 19 – Correlação positiva ($r=0,9$) entre a atividade da SOD e níveis plasmáticos de NOx ($p<0,05$).

5.5.10 Relação entre a atividade da CAT em eritrócitos e os níveis plasmáticos de NOx.

Foi obtida uma correlação positiva ($r=0,70$; $p \leq 0,05$) entre a atividade da enzima CAT nos eritrócitos (pmoles/mg de proteína) e os níveis plasmáticos de NOx (umoles/L), mostrando que quanto maior a atividade da enzima CAT, maiores são os níveis de NOx (FIGURA 20).

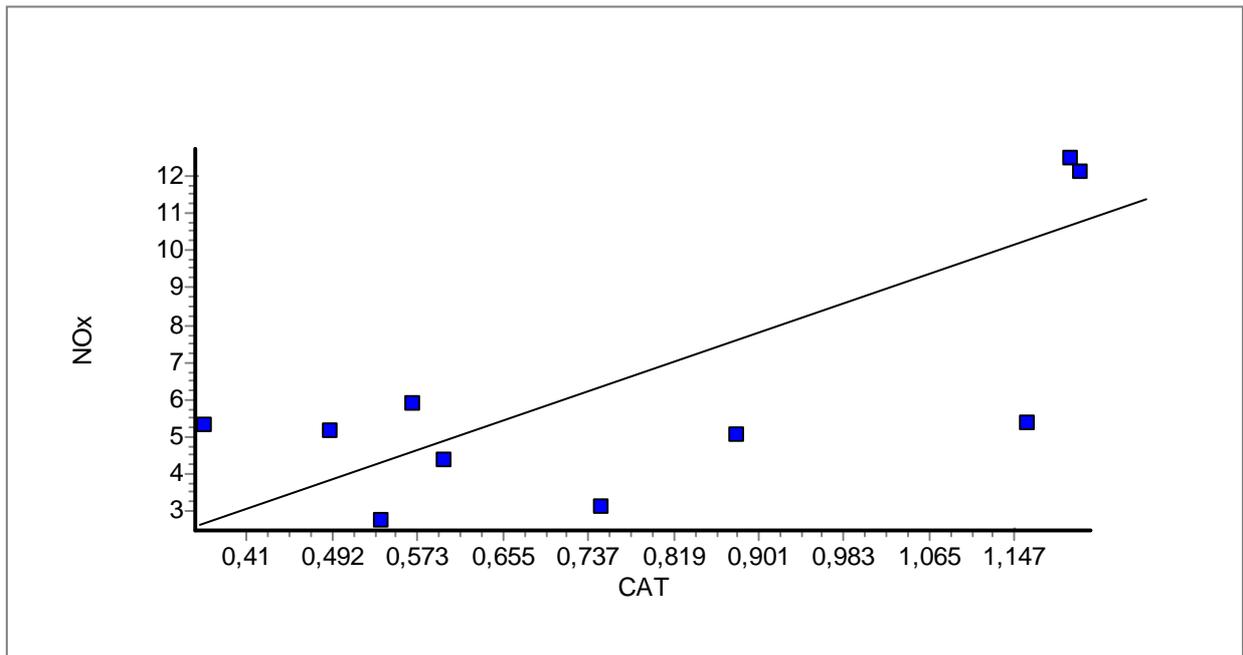


FIGURA 20 – Correlação positiva ($r=0,7$) entre a atividade da CAT e níveis plasmáticos de NOx ($p<0,05$).

5.5.11 Relação entre a atividade da GPx em eritrócitos e os níveis plasmáticos de NOx.

Foi obtida uma correlação positiva ($r=0,79$; $p \leq 0,05$) entre a atividade da enzima GPx em eritrócitos (nmoles/min/mg de proteína) e os níveis plasmáticos de NOx (umoles/L), mostrando que quanto maior a atividade da enzima GPx, maiores são os níveis de NOx (FIGURA 21).

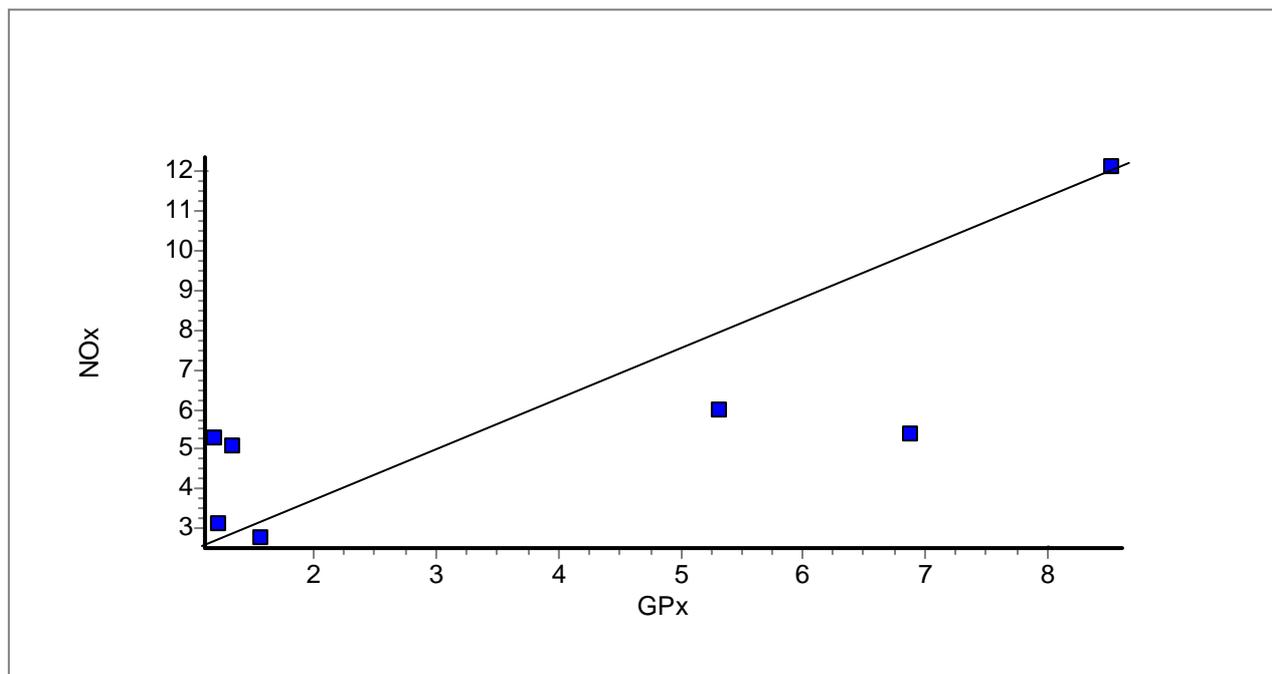


FIGURA 21 – Correlação positiva ($r=0,79$) entre a atividade da GPx e níveis plasmáticos de NOx ($p<0,05$).

6. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo observar o efeito da ausência de receptores para LDL sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca basal, o controle reflexo da circulação; e as alterações bioquímicas ligadas ao estresse oxidativo, que poderiam estar ocorrendo nesse modelo experimental.

Nossos resultados mostraram que os camundongos *KO* apresentam maior PAM do que os controles, mas a FC basal não diferiu significativamente entre os grupos. Por outro lado, observamos redução da sensibilidade barorreflexa, pois tanto a taquicardia em resposta às quedas de PAM, quanto a bradicardia, em resposta às elevações de PAM, apresentaram-se prejudicadas no grupo *KO*.

Além disso, os animais *KO* apresentaram níveis plasmáticos de colesterol total significativamente superiores aos camundongos do grupo controle, mas os metabólitos do óxido nítrico (NOx), estavam reduzidos tanto no plasma como em tecido cardíaco nesses animais. Finalmente, as medidas de QL, que avalia o dano oxidativo aos lipídios; e carbonilas, que avalia o dano oxidativo às proteínas, estavam significativamente aumentadas nos animais *KO*, tanto em eritrócitos como no tecido cardíaco. Também foi observada uma diminuição da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) nos eritrócitos e tecido cardíaco dos animais desse grupo.

Muitos estudos demonstram que o bloqueio da síntese de NO causa aumento na PA (Vasquez e col. 1994; Minami e col. 1995; Gardiner e col. 1990; Souza e col. 2001; Sander e col. 1997; Cunha e col. 1993). A diminuição da

biodisponibilidade do NO pode apresentar causas variadas, mas o resultado final é semelhante, independentemente da causa determinante.

Uma diminuição significativa nos níveis de NOx totais, como observada no grupo *KO*, pode demonstrar uma diminuição na biodisponibilidade do NO circulante. A possível deficiência de NO, prejudicaria a vasodilatação dependente do endotélio, e isso poderia ser uma das causas do aumento da PA verificada nos animais *KO*. Nossos resultados concordam com os relatos de Trieu e Uckun (1998), que mostram a presença de hipertensão arterial nos camundongos *KO* para receptores de LDL. Além disso, o modelo de hipercolesterolemia utilizado neste estudo, assemelha-se fortemente com a hipercolesterolemia familiar em humanos, que normalmente é acompanhada de hipertensão. Nosso estudo também concorda com os achados de Ishibashi e col. (1993), que estudando camundongos hipercolesterolêmicos por dieta hipercalórica, demonstraram a presença de hipertensão nesses animais.

Se acreditarmos que o modelo de animais *KO*, reproduz a condição de hipercolesterolemia familiar, é de grande valia estudar os mecanismos de controle da PA nesses camundongos, pois esses resultados podem contribuir para a compreensão dessa doença em humanos. Entre os mecanismos de controle da PA que pode se apresentar como uma das principais causas/efeitos da hipertensão, podemos citar o prejuízo do controle barorreflexo pois de acordo com La Rovere e col. (1998), a sua disfunção contribui para a doença cardiovascular. Sendo assim, uma alteração no funcionamento barorreflexo pode ser mais um fator de risco para os pacientes com hipercolesterolemia.

Em nosso estudo, observamos um prejuízo no controle reflexo barorreceptor nos animais *KO*. Uma das causa para esse resultado poderia ser

atribuída à hipertensão, que poderia estar provocando adaptação dos pressoreceptores a patamares mais elevados de PA, porém com um prejuízo na regulação reflexa da FC. De fato, muitos autores relatam uma associação entre a hipertensão e a redução da sensibilidade barorreflexa (Irigoyen e col., 1998; Mancina e col., 1997; Bristow e col., 1969; Parati e col., 1988), o que está de acordo com os resultados encontrados nesse estudo.

Ao injetarmos nitroprussiato de sódio, um potente vasodilatador por doar NO ao sistema circulatório, observamos a redução da PA e a conseqüente diminuição dos impulsos aferentes barorreceptores que reprimem a atividade simpática para o coração. Como resultado, observa-se uma resposta reflexa que determina o aumento da FC. Em nosso estudo, os camundongos do grupo *KO* apresentaram uma resposta taquicárdica significativamente reduzida em relação aos controles, demonstrando um prejuízo na resposta do sistema nervoso simpático nesses animais.

Por outro lado, ao injetarmos fenilefrina, um potente alfa-agonista que provoca intensa vasoconstrição, estimulamos o sistema barorreceptor a deprimir a atividade simpática sobre o coração e vasos. Ficando a atividade parassimpática facilitada para o coração. Como resultado, observamos uma resposta reflexa que determina a redução da FC. Em nosso estudo, os camundongos do grupo *KO* apresentaram uma resposta bradicárdica significativamente reduzida em relação aos controles, demonstrando uma deficiência na resposta do sistema nervoso parassimpático nesses animais. Tanto alterações do arco reflexo comprometendo a via aferente, a integração central ou a via eferente, podem ser responsáveis pela atenuação do barorreflexo. Essas alterações também podem ocorrer tanto no sistema

nervoso simpático, como no parassimpático (Matsuda e col. 1995). Em nosso estudo, observamos um prejuízo no controle da FC, tanto pelo sistema nervoso simpático quanto parassimpático.

Poucos pesquisadores estudaram o barorreflexo nesse modelo de camundongo. No entanto, Li e colaboradores (1996) demonstraram que em coelhos hipercolesterolêmicos, altos níveis de colesterol podem alterar a sensibilidade dos barorreceptores arteriais. E de acordo com os estudos de Dalessandri e col. (1990), a distensibilidade da parede aórtica é reduzida na hipercolesterolemia, o que também pode contribuir para o prejuízo do barorreflexo.

Além disso, a possível diminuição da biodisponibilidade do NO, evidenciada pela menor quantidade de NOx nos camundongos KO, também mostrou uma associação com a disfunção barorreflexa. De acordo com os estudos de Spieker e col. (2000), uma inibição da enzima NOS, responsável pela síntese de NO, prejudica o sistema barorreceptor em humanos. Outros estudos indicam um papel para o NO na regulação central dos reflexos (Hirooka, 1996; Kagiya, 1997), demonstrando que os níveis sanguíneos de NO são importantes no controle da FC e do tônus dos vasos.

Wilfert e col. (2000) e Li e col. (1996), demonstraram que um prejuízo na atividade dos barorreceptores, pode ser devido a um acúmulo de EAO. Em nosso estudo não foram dosadas diretamente as EAO, no entanto, os resultados encontrados na QL e carbonilas, que refletem o dano oxidativo sanguíneo ou tecidual, indicam que provavelmente tenha ocorrido um aumento nos níveis de EAO nos animais KO.

Como observamos um quadro de estresse oxidativo nos camundongos KO, acreditamos que as EAO podem estar interagindo com o NO inativando-o. Essa idéia concorda com os resultados de Panza e col. (1990), que vêm demonstrando que a maior geração de EAO causa uma diminuição do NO biodisponível. A menor disponibilidade de NO induz a um prejuízo na função endotelial levando, entre outros efeitos, a uma redução na vasodilatação dependente do endotélio. De fato, segundo Rubanyi & Vanhoute (1986) e Gryglewski e col. (1986), o NO pode ser destruído pelo radical superóxido e protegido por *scavengers* de EAO dentre eles, as enzimas antioxidantes. Nossos resultados mostram uma diminuição da atividade enzimática antioxidante, facilitando um aumento da reatividade das EAO.

Além do provável aumento de EAO, que podem degradar NO, encontramos uma redução dos níveis de NOx nos animais KO. De fato, acreditamos que esteja ocorrendo uma redução na síntese de NO, o que poderia explicar a diminuição dos níveis plasmáticos de NOx. Muitas evidências apontam para o LDL oxidado como um provocador de disfunção endotelial não só por promover um aumento da degradação de NO, como por reduzir a sua síntese e ainda diminuir a expressão da enzima NO sintase (Tanger e col., 1993; Chin e col., 1992; Shimokawa & Vanhoute, 1988 e Galle e col., 1995). Da mesma forma que esses autores, nossos resultados sugerem aumento do estresse oxidativo nos animais KO, facilitando a oxidação do LDL, a disfunção endotelial e a redução da síntese de NO. Sendo assim, seria coerente acreditar na possibilidade da diminuição da expressão da NOS ou no desvio dessa enzima para a produção do ânion superóxido.

Outra explicação possível para a redução da síntese do NO foi descrita por Lepage e col. em 1996. Esses autores, estudando pacientes hipercolesterolêmicos, encontraram um aumento na produção de dimetilarginina assimétrica. A dimetilarginina é um aminoácido que compete pelo substrato com a L-arginina, o precursor da síntese de NO, diminuindo assim a sua produção. Além disso, Mayer e col., (1991) e Heinzl e col., (1992) relataram que uma outra substância, a tetrahidrobiopterina (BH₄), que é um cofator essencial da NOS por doar elétrons para a hidroxilação da L-arginina, aumenta a atividade da enzima NOS. O estresse oxidativo, observado nos animais *KO* de nosso estudo, poderia estar acelerando a oxidação de BH₄ (Davies & Kaufman, 1993; Harrison & Ohara, 1995), provocando a sua deficiência e conseqüentemente a diminuição da síntese de NO (Schmidt e col., 1992). Não foi nosso objetivo medir a BH₄ ou a produção de dimetilarginina, e também não é nosso objetivo centrar a discussão nessas substâncias. Queremos apenas salientar que já existem alguns mecanismos propostos, que podem explicar o aumento da PA, do estresse oxidativo e da diminuição na biodisponibilidade de NO, na hipercolesterolemia.

Não sabemos exatamente qual o mecanismo fisiopatológico que está provocando o aumento da PA em nossos animais, mas certamente o estresse oxidativo e os níveis de colesterol são partícipes desse processo. Provavelmente o estresse oxidativo, ocasionado pelo desbalanço entre as forças oxidantes e antioxidantes em favor das EAO, poderia reduzir a capacidade de relaxamento derivado do endotélio, levando ao aumento da PA. Nossos resultados sugerem que a redução dos níveis de NO_x, encontrada nos camundongos *KO*, não é devida ao aumento do estresse oxidativo. Nos

animais *KO*, apesar da QL e carbonilas estarem aumentadas, sugerindo aumento de EAO, os NOx estão diminuídos. Isso indica que provavelmente as EAO não encontram NO biodisponível no plasma dos animais *KO* de maneira que possam degradá-lo, como ocorreria no grupo controle, se o estresse oxidativo estivesse aumentado. Já que um aumento de EAO desacoplaria a NOS, causando diminuição de NO.

Por outro lado, ao analisarmos a atividade de todas as enzimas antioxidantes, observamos que estão significativamente reduzidas nos camundongos *KO*. Dessa forma, não seriam suficientes para detoxificar o provável excesso de EAO produzida nesse modelo. A atividade da SOD, que catalisa a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio, apresentou-se 24% menor nos eritrócitos de animais *KO*. Um resultado semelhante foi encontrado quando avaliamos essa enzima no tecido cardíaco, que apresentou uma redução de 23,4% nos animais *KO*, em relação aos controles.

Esses resultados sugerem que, a atividade reduzida dessa enzima nos animais *KO*, contribui para o aumento do estresse oxidativo. De acordo com Ballinger e col (2000), as EAO induzem à oxidação de proteínas, de DNA e de lipídeos nas células vasculares, e, dessa forma, contribuem tanto para o aumento da lipoperoxidação como dos níveis de carbonilas. Esses relatos concordam com os nossos achados que mostraram aumento significativo da QL, da oxidação de proteínas e dos níveis de colesterol plasmático nos animais com ausência dos receptores para LDL.

A diminuição na atividade da SOD encontrada nos animais *KO*, resulta em menor proteção aos lipídios e proteínas, contra os ataques do radical superóxido. A principal isoforma da SOD é extracelular (SOD-EC) (Marklund e

col., 1982). Como encontramos uma redução da atividade da SOD nos camundongos *KO*, acreditamos que os altos níveis de colesterol nesses animais, podem estar afetando a ligação da SOD-EC com a superfície endotelial. Segundo Lepage e col. (1996), uma razão para a redução da atividade da SOD, seria a hipercolesterolemia que estaria associada a baixos níveis de zinco, um cofator da enzima.

A enzima CAT, um *scavenger* específico de peróxido de hidrogênio, também teve sua atividade significativamente diminuída nos animais *KO*. Nos eritrócitos a redução da atividade dessa enzima foi de 56%, e no tecido cardíaco de 25,7% em relação aos controles.

Como a CAT promove a catálise do peróxido de hidrogênio até água, e esse peróxido de hidrogênio pode ser proveniente da reação catalisada pela SOD, que também encontra-se com sua atividade reduzida nos animais *KO*, acreditamos que esta seja uma possível causa da redução da atividade da CAT nesses camundongos, já que esta enzima depende em parte do produto da reação catalisada pela SOD.

Os resultados da enzima GPx mostraram que a atividade dessa enzima estava 54% menor nos animais *KO* do que nos controles. Embora a GPx não seja específica para seu substrato, podemos dizer que a atividade dessa enzima encontra-se reduzida nos camundongos *KO*, pelo menos em parte, pelo mesmo motivo que a atividade da CAT também está. A enzima GPx detoxifica o peróxido de hidrogênio produzido pela reação catalisada pela SOD, e também converte hidroperóxidos lipídicos a álcoois não tóxicos (Gutteridge e col., 1995). Portanto, com a redução da atividade da GPx, os animais *KO*

apresentam um prejuízo duplo: estão menos protegidos contra o peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos.

Do ponto de vista do estresse oxidativo, é curioso que ocorra simultaneamente aumento de EAO, um “scavenger” de NO, e redução de NOx. É provável que a redução dos níveis de NOx, encontrada nos camundongos *KO*, seja causada pelo aumento da formação de ânion superóxido pela própria NOS. Pritchard e col. (1995), ao incubar células endoteliais com LDL, demonstraram um aumento da produção de ânion superóxido. Esse fenômeno foi bloqueado ao se administrar um bloqueador da NOS, como o *NG*-nitro-Larginina metil ester. Esses achados indicam que a NOS no estado desacoplado pode contribuir para a produção de ânion superóxido na hipercolesterolemia. Essa hipótese é reforçada em nosso estudo pelo aumento do estresse oxidativo associado à redução de NOx. Ao contrário do esperado, os animais com maior estresse oxidativo apresentaram um grau de inativação do NO, inferior aos animais controles.

Curiosamente, também encontramos uma correlação positiva entre os níveis de NOx e cada uma das atividades das enzimas antioxidantes SOD ($r=0,9$), CAT ($r=0,70$) e GPx ($r=0,79$), demonstrando que quanto menor a capacidade antioxidante enzimática, e por consequência maior o estresse oxidativo, menor também a degradação do NO nesse modelo. É possível que as EAO estejam desviando sua capacidade oxidativa para oxidar o LDL que está anormalmente elevado no plasma e tecido cardíaco dos animais *KO* e com isso desencadeando a disfunção endotelial discutida anteriormente.

Muitos autores relatam um aumento do estresse oxidativo em hiperlipidemias (Ozdermirler e col., 1997; Zimmerman e col., 1997; Erdinçler e

col., 1997; Rodriguez e col., 2001; Davi e col., 1997). De acordo com os estudos de Kok e col. (1991) e Prasad & Kalra (1989), na hipercolesterolemia diversas células são ativadas, aumentando a produção de EAO. Luscher & Barton (1997), demonstraram um aumento na produção de radicais superóxido e outras EAO em coelhos hipercolesterolêmicos por dieta hipercalórica. Além disso, Ludwig e col. (1982) e Krause e col. (1993) também afirmam que o colesterol é um importante estímulo para a liberação de EAO por leucócitos.

A partir desses resultados, fica fácil aceitar que existe uma estreita relação entre os níveis séricos de colesterol, o aumento do estresse oxidativo e também da curiosa correlação positiva entre os níveis de NOx e das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, que foi encontrado nos animais *KO* para o receptor de LDL.

No entanto, outros autores discordam daqueles encontrados nesse estudo. Silva e col. (1995), demonstraram aumento na atividade da SOD em coelhos hipercolesterolêmicos após receberem dieta hipercalórica. Weinbrenner e col. (2003) demonstraram que um aumento de LDL oxidada é acompanhado por aumento da atividade das enzimas SOD e GPx em pacientes com doença coronariana estável e clinicamente tratados.

Provavelmente as diferenças metodológicas e a espécie utilizada, tenham contribuído para as diferenças nos resultados. Além disso, não podemos descartar a idéia de que a manipulação genética, para deletar o gene responsável pela formação do receptor de LDL, possa provocar importantes mudanças fisiológicas adaptativas que não estão presentes nos outros animais ou na espécie humana.

A diminuição da atividade das enzimas analisadas, pode ser um importante fator de limitação na capacidade antioxidante. Associando-se esse resultado ao aumento dos danos oxidativos, demonstrados nesse estudo, através de QL e carbonilas, poderíamos dizer que uma insuficiente detoxificação de EAO pelas enzimas estudadas, estaria ocasionando um desbalanço entre os sistemas oxidante e antioxidante nos eritrócitos, e no tecido cardíaco. Isso aceleraria os processos de peroxidação nesse modelo de hipercolesterolemia. Nossos resultados sugerem que o desbalanço no sistema antioxidante/oxidante parece resultar da ausência de receptores de LDL que provoca aumento do colesterol sangüíneo. Esse desequilíbrio pode ser causado pela aumentada produção de ânion superóxido, produzido pela própria NOS, induzida pela hipercolesterolemia e ainda pela redução da atividade das enzimas antioxidantes. Esses resultados em conjunto levam ao aparecimento do estresse oxidativo, diminuição do NO biodisponível e aumento da PA.

Também acreditamos que a deficiência na produção de NO nos animais *KO* pode estar causando alterações das condições hemodinâmicas, favorecendo a vasoconstrição, e contribuindo para o aumento da resistência vascular periférica. O fato do NO não ser apenas um potente vasodilatador, mas também atuar inibindo a migração de células musculares lisas vasculares, agregação plaquetária, oxidação de LDL e inflamação vascular (Ródenas e col., 2000), faz dele um importante vaso protetor. Os estudos de Kawashima e col., 2001 tem demonstrado a importância do NO no remodelamento vascular em situações de injúria tecidual, e as evidências apontadas em seus relatos

indicam um papel regulatório para o NO endotelial na função e integridade vascular.

Se estamos diante de uma menor produção de NO, na ausência dos receptores para LDL, que é acompanhada por hipercolesterolemia, aumento da PAM, do estresse oxidativo e prejuízo do controle barorreflexo, não é difícil entender a ocorrência de aterosclerose na evolução dessa patologia. Muitos estudos ainda serão necessários para compreender os mecanismos envolvidos na disfunção endotelial, capaz de provocar doenças cardiovasculares com consequências devastadoras para a saúde humana.

7 . CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doenças cardiovasculares representam a mais importante causa de mortalidade nas civilizações ocidentais, incluindo o Brasil. Os fatores de risco claramente definidos, tais como: hipercolesterolemia, hipertensão arterial, obesidade, etc são condições muito freqüentemente associadas a maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Além disso, a hipercolesterolemia familiar (doença caracterizada pela deficiência ou má formação de LDLr que causa um acúmulo excessivo de colesterol no plasma) também pode estar fortemente associada com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Para melhor estudar as conseqüências dessa doença no sistema cardiovascular, alguns modelos experimentais foram desenvolvidos, dentre eles os camundongos knockout para receptores de LDL, os quais foram alvo de nosso estudo.

Ao estudarmos esses animais, observamos aumento dos níveis plasmáticos de colesterol, os quais estavam acompanhados de redução dos níveis de NO. Sabendo-se que um insuficiente relaxamento derivado do endotélio tem sido relatado em uma variedade de modelos animais de hipercolesterolemia (Lefer e col., 1993; Rossitch e col., 1991), acreditamos que esta seja a causa da presença de hipertensão nos camundongos knockout, e que os altos níveis de PA nesses animais contribuíram para redução da sensibilidade barorreflexa. Além disso, a disfunção endotelial na hipercolesterolemia é em grande parte causada pela redução da

biodisponibilidade de NO, e múltiplos fatores contribuem para isso. Dentre eles, o aumento da inativação do NO por EAO e inibição da formação de NO por diferentes mecanismos.

A medida das enzimas antioxidantes, das carbonilas e da QL mostrou que na ausência de receptores de LDL ocorre um desbalanço entre espécies oxidantes e antioxidantes, caracterizando um quadro de estresse oxidativo. A redução da atividade das enzimas antioxidantes nos animais knockout sugere uma menor proteção ao NO contra EAO, o que pode contribuir para o processo hipertensivo, especialmente em face da redução da biodisponibilidade do óxido nítrico.

8. CONCLUSÕES

Através de nossos resultados concluímos que a ausência de receptores de LDL provoca aumento dos níveis de colesterol total, além de reduzir a atividade barorreflexa, aumentar a pressão arterial, reduzir a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, aumentar os danos oxidativos aos lipídios e proteínas e reduzir os níveis de nitratos totais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGEL-JAMES, J.E., The Effects Of Changes Of Extramural, 'Intrathoracic', Pressure On Aortic Arch Baroreceptors. *J. Physiol*, 214: 89-103, 1971.

ARAUJO, F.B., BARBOSA, D.S., HSIN, C.Y., MARANHÃO R.C. & ABDALLA D.S.. Evaluation of oxidative stress in patient hyperlipidemia. *Atherosclerosis*, 117,61-71. 1995.

AZUMI H, INOUE N, OHASHI Y, TERASHIMA M, MORI T, FUJITA F, AWANO K, KOBAYASHI K, MAEDA K, HATA K ET AL. Superoxide generation in directional coronary atherectomy specimens of patients with angina pectoris : important role of NADPH oxidase. *Atrterioescler Thromb Vasc Biol*,22:1838-1844, 2002.

BALLINGER, S. W., C. PATTERSON, C. N. YAN, R. DOAN, D. L. BUROW, C. G. YOUNG, F. M. YAKES, B. VAN HOUTEN, C. A. BALLINGER, B. A. FREEMAN, AND M. S. RUNGE. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ. Res.* 86:960-966. 2000.

BOVERIS, A. AND B. CHANCE. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134:707-716. 1973.

BRISTOW JD, HONOUR AJ, PICKERING GW, SLEIGHT P & SMYTH HS. Diminished baroreflex sensitivity in high blood pressure. *Circulation*, 39: 48-54, 1969.

CARVALHO, M.H.C., D. NIGRO, Z.B. FORTES, R. SCIVOLETTO. Reatividade vascular, hipertensão arterial e endotélio. *Hiper Ativo*: 2(1):22-31. 1995.

CASTRO L, RODRIGUEZ M, RADI R, *J. Biol. Chem.* 269,29405-29408, 1994.

CAT, G. G., F. VEGLIO, F. RABBIA, A. MILAN, T. GROSSO, AND L. CHIANDUSSI. Baroreflex sensitivity in secondary hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* 23:89-99, 2001.

CATHCART MK, MOREL DV, CHILSOLM GM. Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic. *J.Leukocyte Biol.*;38:341, 1995.

CHIN JH, AZHAN S, HOFFMAN BB. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest* ;89:10-8, 1992.

COMINACINI L, RIGONI A, PASINI AF, GARBIN U, DAVOLI A, CAMPAGNOLA M, PASTORINO A M, CASCIO V L, SAWAMURA T. The binding of oxidized lipoprotein to ox-LDL receptor 1 reduces the intracellular

concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *The Journal of Biological Chemistry* 276:13750-13755, 2001.

CROOK, M.A. & MILLER, N.J. Serum antioxidant status in hypobetalipoproteinemia. *Atherosclerosis*, 131, 135-136, 1997.

CROSS C.E., HALLIWELL, B., BORRIS, E.T., PRYOR, W., AMES, B.N., SAUL, R.L. MCCORD, J.M. & HARMAN, D. Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.*, 107,526-545, 1987..

CUNHA, R. S., A. M. CABRAL, AND E. C. VASQUEZ. Evidence that the autonomic nervous system plays a major role in the L- NAME-induced hypertension in conscious rats. *Am. J. Hypertens.* 6:806-809, 1993..

DALESSANDRI KM, BOGREN H, LANTZ BM, TSUKAMOTO H, BJORKERUD S, AND BROCK J. Aortic compliance in hypercholesterolemic Watanabe rabbits compared to normal New Zealand controls. *J Invest Surg* 3: 245–251, 1990.

DAVDA R K, STEPNIAKOWSKI K T, LU G, ULLIAN M E, GOODFRIEND T L, EGAN B M. Oleic acid inhibits endothelial nitric oxide synthase by a protein kinase C independent mechanism. *Hypertension.* 26(5):764-70, 1995.

DAVIES, M.D., AND S. KAUFMAN. Products of the tyrosine-dependent oxidation of tetrahydrobiopterin by rat liver phenylalanine hydroxylase. Coleman, *Arch. Biochem. Biophys.* 304:9–16, 1993..

DAVI G, ALESSANDRINI P, MEZZETTI A, MINOTTI G, BUCCIARELLI T, COSTANTINI F, CIPOLLONE F, BON GB, CIABATTONI G, PATRONO C. In vivo formation of 8-epiprostaglandin F₂ is increased in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;17:3230–3235, 1997.

DORMANDY, T. L.. Free-radical oxidation and antioxidants. *Lancet* 1:647-650, 1978.

ECKBERG DL, SLEIGHT P: Human Baroreflexes in Health and Disease. *Oxford University Press*, 1992.

EFE H, DEGER O, KIRCI D, KARAHAN SC, OREM A & CALAPOGLU M. Decreased neutrophil antioxidative enzyme activities and increased lipid peroxidation in hyperlipoproteinemic human subjects. *Clin. Chim. Acta*, 279, 155-165, 1999.

ERDİNÇLER DS, SEVEN A, INCI F, BEGER T, CANDAN G. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental animals: effects of aging and hypercholesterolemic diet. *Clinica Chimica Acta* 265:77-84. 1997.

Executive Summary of The Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*; 285: 2486-2497, 2001.

FAZAN VPS, SALGADO HC, BARREIRA AA. Aortic depressor nerve unmyelinated fibers in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 280: H1560-4, 2001.

FAULHABER J, AND EHMKE H. Autonomic Cardiovascular Control In Conscious Mice. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 279: R2214–R2221, 2000.

FERRARI R., C. CECONI, S. CURELLO, A. CARGNONI, E. CONDORELLI, AND R. RADDINO. Role of oxygen in myocardial ischaemic and reperfusion damage: effect of alpha-tocopherol. *Acta Vitaminol.Enzymol.* 7 Suppl:61-70, 1985.

FLOHE, L. AND W. A. GUNZLER. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105:114-121, 1984..

FRANCHINI, K. G., I. A. CESTARI, AND E. M. KRIEGER. Restoration of arterial blood oxygen tension increases arterial pressure in sinoaortic-denervated rats. *Am. J. Physiol* 266:H1055-H1061, 1994.

FRANCHINI, K. G. AND A. W. COWLEY, JR. Renal cortical and medullary blood flow responses during water restriction: role of vasopressin. *Am. J. Physiol* 270:R1257-R1264, 1996..

FUENTES F., DELGADO J., FERNÁNDEZ-PUEBLA R. A., PÉREZ-JIMÉNEZ Y F., Evaluación del riesgo cardiovascular en la hipercolesterolemia familiar *Monocardio*; 6: 82-87, 2004.

FURCHGOTT RF, ZAWADSKI JF. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288:373–376, 1980.

FUSTER V; BADIMON JJ, CHESEBRO JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N.Engl.J. Med.* 326:242-259,1992

GALLE J, BENGEN J, SCHOLLMEYER P, WANNER C. Impairment of endothelium-dependent dilation in rabbit renal arteries by oxidized lipoprotein (a). Role of oxygen-derived radicals. *Circulation*;92:1582–9, 1995.

GARDINER, S. M., A. M. COMPTON, T. BENNETT, R. M. PALMER, AND S. MONCADA. Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 15:486-492, 1990.

GENT J, BRAAKMAN I., Low-density lipoprotein receptor structure and folding. *Cell Mol Life Sci.* Oct;61(19-20):2461-70, 2004.

GIANAROS PJ, JENNINGS RJ, OLAFSSON B G, STEPTOE A, KSUTTON-TYRRELL K, MULDOON MF, AND MANUCK S B .Greater Intima–Media

Thickness in the Carotid Bulb Is Associated With Reduced Baroreflex Sensitivity *American Journal of Hypertension*, 15:, 486-491, 2002.

GIMBRONE JR. MA, BEVILACQUA MP, CUBULSKY MI. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte adhesion in inflammation and atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci*; 598:77–85, 1990.

GIMBRONE MA Jr. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J. Pathol.*; 155:1-5, 1999.

GOLDSTEIN JL, BROWN MS: Familial hypercholesterolaemia. In: Scriver CR y cols., *The metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1995: 1215-1245

GONZALEZ FLECHA B, LLESUY S & BOVERIS A., Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radical Biol Med*, , 10: 1093-100, 1991.

GRAHAM A, HOGG N, KALYANARAMAN B, O'LEAVY V, DARLEY-USMAR V, MONCADA S. Peroxynitrite modification of low density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett*. 330:181-185;1993.

GRANGER, 1999, Nitric Oxide Method. *Methods Enzymology* 301:58-61 – 1999.

GRIENDLING, K. K., D. SORESCU, AND M. USHIO-FUKAI. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* 86:494-5, 2000.

GRYGLEWSKI, R. J., R. M. PALMER, AND S. MONCADA. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320:454-456, 1986.

GUL M, KUTAY FZ, TEMOCIN S & HANNINEN O. Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian J. Exp. Biol*, 38,625-634, 2000.

GUTTERIDGE JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*; 41:1819-28, 1995.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. The importance of free radicals and catalytic metal ions in humans diseases. *Molec. Aspects Med.*;8:89, 1985.

HARRISON, G., AND Y. OHARA. Physiologic consequences of increased vascular oxidant stresses in hypercholesterolemia and atherosclerosis: implications for impaired vasomotion. *Am. J. Cardiol.* 75:75b–81b, 1995.

HENNINGER DD, GERRITSEN ME, GRANGER DN. LDL-receptor knockout mice exhibit exaggerated microvascular responses to inflammatory stimuli. *Circ Res.*;81:274 –281, 1997.

HEINZEL, B., M. JOHN, P. KLATT, E. BOHME, AND B. MAYER. Ca²⁺/calmodulin dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem. J.* 281:627–630, 1992.

HIRAMATSU K, BIERMAN EL, CHAIT A . Metabolism of low density lipoprotein from patients with hypertriglyceridemia and diabetes. *Diabetes*; 34:8, 1985.

HIROOKA, Y., J. W. POLSON, AND R. A. DAMPNEY. Pressor and sympathoexcitatory effects of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla. *J. Hypertens.* 14:1317-1324, 1996..

HISSNER R, NAUSER T, BUGNON P, LYE P.G., KOPPENOL W.H. Formation and properties of peroxy nitrite studied by laser flash photolysis, high pressure stopped flow and pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.* 10:1285-1292;1997.

HOOG N, KALYANARAMAN B, Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411, 378-384, 1999

HOUSTON M, CHUMLEY P, RADHAKRISHNAN R, RUBBO H, FREEMAN B A, Xanthine oxidase reaction with nitric oxide and peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 355:1-8, 1998.

HUIE R.E., PADMAJAN S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Comms.* 18:195-199;1993.

IRIGOYEN MC, KRIEGER EM, Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. *Braz J Med Biol Res* 31: 1213-20, 1998.

IRIGOYEN M C, CONSOLIM-COLOMBO F M, KRIEGER E M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. *Ver. Bras. Hipertensão*, 8:55-62, 2001

ISHIBASHI S, BROWN MS, GOLDSTEIN JL, GERARD RD, HAMMER RE, HERZ J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus – mediated gene delivery. *J Clin Invest*, 92: 883-893, 1993.

JAX MICE DATABASE. Product information. Disponível em <<http://jaxmice.jax.org/jaxmice-cgi/jaxmicedb.cgi?objtype=pricedetail&stock> > . Acesso em 04 Agosto de 2004.

JUST A, FAULHABER J, AND EHMKE H. Autonomic cardiovascular control in conscious mice. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 279: R2214–R2221, 2000.

KAGIYAMA, S., T. TSUCHIHASHI, I. ABE, AND M. FUJISHIMA. Cardiovascular effects of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla of rats. *Brain Res*. 757:155-158, 1997.

KANEKO J.J, HARVEY J.W., BRUSS M.L. *Clinical biology of domestic animals*. 5ed. Academic Press, 1997

KAWASHIMA S, YAMASHITA T, OZAKI M, OHASHI Y, AZUMI H, INOUE N, HIRATA K, HAYASHI Y, ITOH H, YOKOYAMA M: Endothelial NO synthase overexpression inhibits lesion formation in mouse model of vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21:201-207, 2001.

KAY NMR. Drosophila to bacteriophage to erythrocyte: the erythrocyte as a model for molecular and membrane aging of terminally differentiated cells. *Gerontology*, 37:5-32, 1991.

KIRCHHEIM, H.R., Systemic Arterial Baroreceptor Reflexes, *Physiol. Rev.*, 56: 100- 176, 1976.

KOK FJ, VAN POPPEL G, MELSE J, VERHEUL E, SCHOUTEN EG, KRUYSEN DHCM, HOFFMAN A . Do antioxidants and polyunsaturated fatty acids have a combined association with coronary atherosclerosis? *Atherosclerosis* 1991;31:85-90, 1991.

KOBAYASHI S, INOUE N, OHNISHI Y, TERASHIMA M, MATSUI K, MORI T, FUJITA H, AWARO K, KOBAYASHI K, AZUMI H : Interaction of oxidative stress and inflammatory response in coronary plaque instability: important role of C-reactive protein. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol*, 23:1398-1404, 2003.

KODJA, G., HARRISON, D.G. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc. Res.* 43, 562-571, 1999.

KOK FJ, VAN POPPEL G, MELSE J, VERHEUL E, SCHOUTEN EG, KRUYSSSEN DHCM, HORFMAN A. Do antioxidants and polyunsaturated fatty acids have a combined association with coronary atherosclerosis? *31:85-90*, 1991.

KOSKINEN P, KUPARI M, VIROLAINEN J, STJERNVALL J, JOLKKONEN J, TUOMILEHTO J & TIKKANEN MJ. Heart rate and blood pressure variability and baroreflex sensitivity in normotense with hypercholesterolaemia. *Clinical Physiology*, 15: 483-489, 1995.

KRAUSE S, POHL C, LIEBRENZ A, RUHLING K, LOSCHE W,. Increased generation of reactive oxygen species in mononuclear blood cells from hypercholesterolemic patients. *Tromb. Res.*; 71:137, 1993.

KRIEGER EM, IRIGOYEN MC, KRIEGER JE. Fisiopatologia Da Hipertensão. *RSCEPS* 9(1): 1-7, 1999.

KRIEGER, E. M. Arterial baroreceptor resetting in hypertension (the J. W. McCubbin memorial lecture). *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol Suppl* 15:3-17, 1989.

LA ROVERE MT, BIGGER JTJ, MARCUS FI. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. *Lancet*, 351:478–84, 1998.

LEPAGE S, BONNEFONT-ROUSSELOT D, BRUCKERT E, BOURELY B, JAUDON MC, DELATTRE J & ASSOGBA U. Antioxidant status of hypercholesterolemic patients treated with ldl apheresis. *Cardiovasc. Drugs Ther*, 10,567-571, 1996.

LERMAN A, HILDEBRAND JR. FL, MARGULIES KB ET AL. Endothelin: a new cardiovascular regulatory peptide. *Mayo Clin Proc*;65:1441–55, 1990.

LI Z, MAO HZ, ABOUD FM, AND CHAPLEAU MW. Oxygen-derived free radicals contribute to baroreceptor dysfunction in atherosclerotic rabbits. *Circ Res* 79: 802–811, 1996.

LOPES H.F., SILVA H.B., CONSOLIM-COLOMBO F.M., BARRETO FILHO J.A.S., RICCIO G.M.G., GIORGI D.M.A. AND KRIEGER. E.M. Autonomic abnormalities demonstrable in young normotensive subjects who are children of hypertensive parents. *Braz J Med Biol Res*, 33(1) 51-54, 2000.

LOWRY OH, ROSENBROUGH NT, FARR AL. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, , 193: 265-275, 1951.

LUDWIG PW, HUNNINGHAKE DB, HOIDAL JR, Increased leukocyte oxidative metabolism in hyperlipoproteinemia. *Lancet*; 2:348, 1982.

LUSCHER TF AND BARTON M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol.*;20(Suppl II):II3-II10, 1997.

MANCIA G, GRASSI G, FERRARI AU. Reflex control of circulation in experimental and human hypertension. In: Zanchetti A, Mancia G (eds.). *Handbook of Hypertension*, 17: Pathophysiology of Hypertension. Amsterdam, Netherlands, *Elsevier Science Publishers B.V.*, 568-601, 1997

MARKLUND SL, HOLME E, HELLNER L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta*; 126:41, 1982.

MARKLUND S. In handbook of Methods for Oxygen Radical Research. *Boca Raton*. CRC Press Pp243-247, 1995..

MARKS D.B., MARKS D.B. *Biochemistry* 4ed. Lippincott Williams & Wilkins – 1998

MATSUDA, T., J. N. BATES, S. J. LEWIS, F. M. ABOUD, AND M. W. CHAPLEAU. Modulation of baroreceptor activity by nitric oxide and S-nitrosocysteine. *Circ. Res.* 76:426-433, 1995.

MAYER, B., M. JOHN, E.R. WERNER, H. WACHTER, G. SCHULTZ, AND E. BOHME. Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multifunctional oxido-reductase. *FEBS Lett.* 288:187–191, 1991.

MERAT S, FRUEBIS J, SUTPHIN M, SILVESTRE M, REAVEN PD. Effect of aging on aortic expression of the vascular cell adhesion molecule-1 and atherosclerosis in murine models of atherosclerosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*; B55:B94, 2000.

MICHELINI, LC. Regulação momento a momento da pressão arterial na normo e na hipertensão. *Hipertenso* 3: 90-8, 2000.

MINAMI, N., Y. IMAI, J. HASHIMOTO, AND K. ABE. The role of nitric oxide in the baroreceptor-cardiac reflex in conscious Wistar rats. *Am. J. Physiol* 269:H851-H855, 1995.

MOHAZZAB, K. M., P. M. KAMINSKI, AND M. S. WOLIN. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am. J. Physiol* 266:H2568-H2572, 1994.

MONCADA, S., R. M. PALMER, AND E. A. HIGGS. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109-142, 1991.

NATHAN, C. AND Q. W. XIE. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 269:13725-13728, 1994..

NICKENIG G, DAVID G, HARRISON MD. The AT₁ Type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis. *Circulation*;105:530-536, 2002.

OELZE M, MOLLNAU H, HOFFMANN N, WARNHOLTZ A, BODENSCHATZ M, SMOLENSKI A, WALTER U, SKATCHKOV M, MEINERTZ T, MUNZEL T. Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ Res.* 87: 999–1005, 2000.

OZDEMIRLER G, OZTEZCAN S, TOKER G & UYSAL M. Peroxidation status of erythrocytes and apolipoprotein B containing lipoproteins in hypercholesterolemic subjects. *Int. Vitam. Nutr. Res.* 67, 130-133, 1997.

PACIFI RE, DAVIES KJA . Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress:the free radical theory of aging revisited. *Gerontology*; 137:166-80, 1991.

PAGANO, P. J., Y. ITO, K. TORNHEIM, P. M. GALLOP, A. I. TAUBER, AND R. A. COHEN. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am. J. Physiol* 268:H2274-H2280, 1995.

PALMER, R. M., A. G. FERRIGE, AND S. MONCADA. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526, 1987.

PANZA, J. A., A. A. QUYYUMI, J. E. BRUSH, JR., AND S. E. EPSTEIN. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* 323:22-27, 1990.

PARATI G, DI RIENZO M, BERTINIERI G, POMIDOSSI G, CASADEI R, GROPELLI A, PEDOTTI A, ZANCHETTI A, MANCIA G: Evaluation of the baroreceptor-heart rate reflex by 24-hour intra-arterial blood pressure monitoring in humans. *Hypertension*;12:214–222, 1988.

PATTERSON D, DICK J B C, STRUTHERS A D. Intensive statin treatment improves baroreflex sensitivity: another cardioprotective mechanism for statins? *Heart*;88:415–416, 2002.

PRASAD K AND KALRA J. Experimental atherosclerosis and oxygen free radicals. *Angiology*; 40:835-43, 1989.

PRITCHARD KA JR, GROSZEK L, SMALLEY DM, SESSA WC, WU M, VILLALON P, WOLIN MS, STEMERMAN MB. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res.* 77:510 –518, 1995.

RADI R, BECKMAN J.S., BUSH K.M., FREEMAN B.A, Peroxynitrite induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide . *Arch. Biochem. Biophys.* 288:481-487;1991.

RADI R, COSGROVE T.P, BECKMAN J.S., FREEMAN B.A, Peroxynitrite induced luminol chemiluminescence. *Biochem. J.* 290:51-57; 1993.

RAJAGOPALAN, S., S. KURZ, T. MUNZEL, M. TARPEY, B. A. FREEMAN, K. K. GRIENGLING, AND D. G. HARRISON. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest* 97:1916-1923, 1996.

REDDY KS, YUSUF S. Emerging epidemic of cardiovascular disease in developing countries. *Circulating*; 97:596-601, 1998.

RIVAL Y, BENÉTEAU N, TAILLANDIER T, PEZET M, DUPONT-PASSELAIGUE E, PATOISEAU J F, JUNQUÉRO D, COLPAERT F, DELHON A .PPAR α and PPAR β activators inhibit cytokine induced nuclear translocation of NF-KB and expression of VCAM-1 in EaHy926 endothelial cells. *European Journal of Pharmacology.* 435:143-151. 2002.

RÓDENAS J, CARBONELL T, MITJAVILA MT. Different roles for nitrogen monoxide and peroxynitrite in lipid peroxidation induced by activated neutrophils. *Free Radical Biology & Medicine*, 28,3:374-380, 2000..

RODRIGUEZ-PORCEL M, LERMAN A, BEST PJ, KRIER JD, NAPOLI C, LERMAN LO. Hypercholesterolemia impairs myocardial perfusion and

permeability: role of oxidative stress and endogenous scavenging activity. *J Am Coll Cardiol.*;37:806–815, 2001.

ROSS R . *Annu. Ver. Biochem*, 57:791-804, 1995.

RUBANYI, G. M. AND P. M. VANHOUTTE. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol* 250:H822-H827, 1986.

RUBBO H, RADI R, TRUJILLO M, TELLERI R, KALYANARAMAN B, BARNES S, KIRK M, FREEMAN B.A, Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen containing oxidized lipid derivatives. *J.Biol.Chem.* 269:26066-26075; 1994.

RUBIN E, FARBER J L, *Patologia*, 3 ed., Ed Guanabara Koogan – RJ, 2002.

RUECKSCHLOSS U, GALLE J, HOLTZ J, ZERKOWSKI HR, MORAWIETZ H: Induction of NADPH oxidase by oxidized low density lipoprotein in human endothelial cells antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. *Circulation*, 104:1767-1772, 2001.

SAKUMA S, FUJIMOTO Y, SAKAMOTO Y, UCHIYAMA T, YOSHIOKA K, NISHIDA H, FUJITA T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230,476-479, 1997..

SANDER, M., J. HANSEN, AND R. G. VICTOR. The sympathetic nervous system is involved in the maintenance but not initiation of the hypertension induced by N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester. *Hypertension* 30:64-70, 1997.

SCHMIDT H, KOSTNER GM. Hypercholesterolemia . *Wien Med Wochenschr.*;144(12-13):312-7, 1994.

SCHMIDT, K., E.R. WERNER, B. MAYER, H. WACHTER, AND W.R. KUKOVETZ. Tetrahydrobiopterin-dependent formation of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) in aortic endothelial cells. *Biochem. J.* 281:297–300, 1992.

SCHMITZ G, HANKOWITZ J, KOVACS EM. Cellular processes in atherogenesis: potential targets of Ca⁺² channel blockers. *Atherosclerosis*, 88:109-132, 1991.

SHIMOKAWA, H, KIM P & VANHOUTE PM., *Circ res.* 63,604-612, 1988.

SIES, H. AND R. MEHLHORN. Mutagenicity of nitroxide-free radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 251:393-396, 1986.

SILVA EL, MORIEL P, CHANG YH ABDALLA, DS. Plasma antioxidant enzymes and oxidized lipoproteins in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 36, 679-687, 1995.

SIMON E, PAUL JL, ATGER V, SIMON A & MOATTI N. Erythrocyte antioxidant status in asymptomatic hypercholesterolemic men. *Atherosclerosis*, 138, 375-391, 1998.

SOUZA, H. C., G. BALLEJO, M. C. SALGADO, V. J. DA SILVA, AND H. C. SALGADO. Cardiac sympathetic overactivity and decreased baroreflex sensitivity in L-NAME hypertensive rats. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 280:H844-H850, 2001.

SPIEKER LE, CORTI R, BINGGELI C, ET AL. Baroreceptor dysfunction induced by nitric oxide synthase inhibition in humans. *J Am Coll Cardiol*;36:213–18, 2000.

STEINBERG H O, PARADISI G, HOOK G, GROWDER K, CRONIN J, BARON A D. Free fatty acid elevation impairs insulin mediated vasodilation and NO production. *Diabetes*, 49(7):1231-8, 2000.

STOJILJKOVIC, M.P., ZHANG, D., LOPES, H.F., LEE, C.G., GOODFRIEND, T.L. & EGAN, B.M. Hemodynamic effects of lipids in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280, R1674–R1679, 2001..

SULLIVAN D R, Screening for cardiovascular disease with cholesterol. *Clinica Chimica Acta* 315:49-60. 2002.

SZABO, C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horiz.* 3:2-32, 1995.

TANNER FC, BOULANGER CM, LUSCHER TF. Endothelium-derived nitric oxide, endothelin, and platelet vessel wall interaction: alterations in hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost*;19:167–75, 1993.

TRIEU N.V., UCKUN F.M. Male-associated hypertension in LDLr deficient mice. *Biochemical and Biophysical research communications* 247: 277-279, 1998..

VASQUEZ, E. C., R. S. CUNHA, AND A. M. CABRAL. Baroreceptor reflex function in rats submitted to chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27:767-774, 1994.

VLACHAKIS ND, MENDLOWITZ M, DEGUIA DEGUSMAN D: Diminished Baroreceptor Sensitivity In Elderly Hypertensives: Possible Role Of Atherosclerosis. *Atherosclerosis* , 24:243–249 ,1976.

WEINBRENER T, CLADELLAS M, COVAS M I, FITÍ M, TOMÁS M, SENTÍ M, BRUGUERA J, MARRUGAT J. High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 168:99-106, 2003.

WHITE C.R., BROCK T., CHANG L.Y, CRAPO J., BRISCOE P., KU D.,BRADLET W.A., GIANTURGO S.H., GORE J., FREEMAN B.A , TARPEY

M.M. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Medical sciences* 91:1044-1048, 1993.

WICK G, SCHEFF G, AMBERGER A, KLEINDIENST R, XU Q. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol.Today*, 16:27-33, 1995.

WILFERT K, DRISCHEL K, UNBEHAUN A, GUSKI H, PERSSON PB, STAUSS HM: Vascular response to angiotensin II in atherosclerosis: Role of the baroreflex. *Hypertension*;35:685–690, 2000.

WITZTUM JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet.*; 344:793-5, 1994.

YOKOYAMA M. Oxidant stress and atherosclerosis. *Current Opinion In Pharmacology*, 4:110-115, 2004.

ZANCHETTI, A. AND G. MANCIA. Cardiovascular reflexes and hypertension. *Hypertension* 18:III13-III21, 1991.

ZERBI A. The national cholesterol education program: guidelines and commentaries. *Bol Asoc Med PR* , 82(11):491-5, 1990.

ZIMMERMAN L, ANTEBI H, MORVEN-BOURCIER C & ALCINDOR LG. In vitro peroxidation of plasma and erythrocyte lipids during WR-1339 induced hyperlipidemia in wistar rats. *Ann. Pharm. Fr.*, 55, 246-253, 1997.