

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:  
Cardiologia e Ciências Cardiovasculares

**Irbesartana reduz trombose e resposta vascular à  
lesão mecânica em modelo animal de lesão endotelial  
e hipercolesterolemia**

**Alex Gules Mello**

*Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde:  
Cardiologia e Ciências Cardiovasculares  
para obtenção do título de Mestre em  
Cardiologia*

Orientador: Prof. Dr. Paulo D. Picon

**Porto Alegre**

*Aos meus pais, Batista e Nice, pelo amor, carinho, dedicação, estímulo e exemplo em todos os sentidos;*  
*às minhas irmãs, Andréia e Aline, por estarem ao meu lado dando apoio em todas as realizações;*  
*às minhas tias Dione, Jandira e Lourdes, pela ajuda constante;*  
*à Deus, por essas pessoas em minha vida.*

## **Agradecimentos**

*À Professora Nadine Clausell, por sua compreensão e incentivo para realização do Mestrado;*

*aos amigos do Centro Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela inestimável colaboração técnica e prática;*

*ao Professor Mário Penz e ao Sandro pela colaboração imprescindível e criatividade no processo envolvendo a dieta dos animais;*

*aos Professores Paulo E. Leães e Celso Blacher, pelos exemplos de médicos e pesquisadores;*

*aos amigos Maurício, Caroline e Fernanda pelo apoio e colaboração linguística;*

*aos amigos da NUCLIMED/HCPA, pelo estímulo e incansável auxílio técnico e pessoal;*

*à Professora Maria I. Edelweiss, pela disponibilidade e o carinho na etapa mais difícil para a realização deste trabalho;*

*ao Dr. Andry F. Costa, por estar presente em todas as etapas do trabalho como amigo, incentivador e colaborador;*

*ao Professor Paulo D. Picon, pelo exemplo profissional, ético, humano e pelo dedicado trabalho de orientação neste projeto.*

## Sumário

Resumo estruturado ..... 4

Artigo em português ..... 6

## **Irbesartana reduz trombose e resposta vascular à lesão mecânica em modelo animal de lesão endotelial e hipercolesterolemia.**

Alex G. Mello, Andry F. Costa, Paula X. Picon, Fabiane B. Nietto, Marcos P. Mosmann, Maria I. Edelweiss, Paulo D. Picon.

Programa de Pós-Graduação em Cardiologia, Serviço de Cardiologia, Medicina Interna e Patologia do HCPA, Programa de Pós-Graduação em Cardiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), UFRGS, RS, Brasil.

Endereço para correspondência: Dr Alex Gules Mello, Unidade de Pesquisa Clínica do HCPA, Rua Ramiro Barcelos 2350, 3º andar, sala 306, Bairro Rio Branco, 90035003 Porto Alegre, RS-Brasil. Tel: +55 51 21018752; fax: + 55 51 21018751; e-mail: [nuclimed@hcpa.ufrgs.br](mailto:nuclimed@hcpa.ufrgs.br)

### RESUMO:

**Introdução:** o controle parcial das ações da angiotensina II (Ang-II) pode ser realizado pelo uso de bloqueadores do receptor da angiotensina II (BRA). Seus efeitos pró-aterogênico e pró-trombótico têm sido alvo de estudos clínicos e experimentais na literatura científica internacional. **Objetivos:** avaliar os efeitos antiateroscleróticos e antitrombóticos de bloqueador do receptor da angiotensina II, a irbesartana, em modelo experimental de trombose arterial em coelhos submetidos à desendotelização aórtica e dieta rica em colesterol. **Material e Métodos:** foram analisados cinquenta e dois coelhos Nova Zelândia, machos, brancos e pesando, em média, 2,96kg. Todos os animais foram submetidos à desendotelização aórtica por cateter Fogarty 3F e, a seguir, divididos em dois grupos. Ao grupo de tratamento ativo foi administrado irbesartana, na dose de 37,5mg/dia, via oral, e, ao grupo controle, placebo.

Ambos os grupos receberam, durante vinte e oito dias, dieta rica em colesterol 0.33%. Ao final deste período, os animais foram mortos, após receberem tratamento indutor de trombose à base de veneno da víbora *Russelis* e adrenalina. **Resultados:** no grupo irbesartana, oito dos vinte e sete animais (29.6%) desenvolveram trombose arterial, comparativamente a quatorze dos vinte e cinco (56%) no grupo controle (p=0.064). A extensão média de trombose arterial, avaliada por videoplanimetria, foi de  $78,3 \pm 111,4 \text{ mm}^2$  no grupo controle, e  $10,7 \pm 24,5 \text{ mm}^2$ , no grupo irbesartana (p=0.010). Ocorreu uma redução significativa das lesões ateroscleróticas caracterizadas por fibrose da íntima, fibrose da média e no escore global de lesão vascular nos animais que receberam irbesartana. No grupo irbesartana, a média do colesterol total foi  $419.9 \pm 377 \text{ mg/dl}$  e, no grupo controle,  $702.6 \pm 279 \text{ mg/dl}$  (P=0.004), LDL  $340,6 \pm 338 \text{ mg/dl}$  e  $561,7 \pm 247 \text{ mg/dl}$  (P=0.013), triglicérides  $57,8 \pm 28 \text{ mg/dl}$  e  $107,8 \pm 19 \text{ mg/dl}$  (P<0,001) e HDL  $163,9 \pm 115 \text{ mg/dl}$  e  $117,5 \pm 184 \text{ mg/dl}$  (P=NS) respectivamente. **Conclusões:** a irbesartana melhorou o perfil lipídico, reduziu a extensão da trombose arterial e o escore de resposta à lesão vascular, neste modelo experimental de lesão endotelial química e mecânica associados à hipercolesterolemia e vasoconstrição.

## **INTRODUÇÃO:**

O sistema renina-angiotensina (SRA), por meio de uma série de respostas fisiológicas, tem como função principal a regulação do controle da pressão arterial e a manutenção da homeostasia eletrolítica, relacionando-se diretamente, em consequência, com alterações e doenças tais como hipertensão, insuficiência cardíaca e nefropatia diabética. Isto ocorre, principalmente, por ação direta do produto final dessa seqüência de ativações, a angiotensina II, por intermédio da sua ligação com receptores de superfície celular, em especial receptores tipos 1 e 2 (AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>)<sup>1</sup>.

O controle ou bloqueio farmacológico das ações do SRA pode ser realizado por medicamentos bloqueadores da atuação da enzima de conversão, que transforma a angiotensina I em angiotensina II (Ang-II), por fármacos denominados inibidores da enzima de conversão (IECA) ou, ainda, pelo uso de bloqueadores do receptor AT<sub>1</sub> da angiotensina II (BRAs)<sup>2,3</sup>.

A utilização dos BRAs também têm sido relacionada, por seu mecanismo de ação, com a redução do desenvolvimento e progressão da aterosclerose e, igualmente, do seu desfecho clínico de maior impacto, a trombose arterial.

Irbesartana, um BRA, demonstrou possuir, em comparação com outros fármacos da mesma classe, maior biodisponibilidade oral e capacidade de ligação com o receptor AT<sub>1</sub><sup>4,5</sup>. Além disso, em pacientes com doença arterial coronariana, síndrome metabólica ou diabetes melito, já foram evidenciados os benefícios clínicos deste BRA, na redução de mecanismos inflamatórios e evolução da aterosclerose<sup>6-11</sup>. A relação do SRA com aterosclerose se expressa, ainda, pela demonstração de intensa presença de enzima de conversão da

angiotensina (ECA) tecidual em macrófagos de placas ateroscleróticas humanas<sup>12</sup>, sugerindo que tanto o aumento da produção de angiotensina tecidual decorrente da presença da ECA nestes sítios, quanto seu bloqueio de ação podem ter benefício na doença arterial coronariana.

Inúmeros modelos experimentais de aterosclerose e trombose têm sido empregados na literatura científica internacional. A utilização de coelhos Nova Zelândia submetidos à dieta rica em colesterol, durante oito meses, e a conseqüente avaliação do efeito da trombose, com a administração de pró-coagulante [*Russel's viper venom* (RVV)] e vasoconstritor (histamina ou adrenalina) sobre um endotélio aterosclerótico foram descritas, primeiramente, por Constantinides e Chakravarti<sup>13</sup>. Já se demonstrou, também, que adição da lesão endotelial provocada por cateter-balão, o tempo até a trombose foi reduzido para quatro meses<sup>14</sup> e, posteriormente, que este período poderia ser reduzido até um mês (P.P. Scipioni, comunicação pessoal, 2003). Este modelo tem sido utilizado<sup>15</sup>, com algumas modificações validadas por nosso grupo<sup>16</sup>.

O objetivo deste trabalho, assim, consistiu na análise do efeito antitrombótico do irbesartana, neste modelo de trombose arterial pós-lesão endotelial por cateter-balão e hipercolesterolemia, em coelhos. Secundariamente, foram avaliados os efeitos sobre a resposta vascular à lesão mecânica e sobre a alteração do perfil lipídico produzida pela dieta rica em colesterol nestes animais.

## **MATERIAL E MÉTODOS:**

**Procedimentos e logística:** o presente estudo desenvolveu-se na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.



Amostra: cinquenta e dois coelhos Nova Zelândia, machos, brancos, com idade média de 3 meses e peso médio de 2.96 kg. Os animais foram observados diariamente por um médico veterinário e mantidos em uma sala climatizada, com gaiolas individuais, em temperaturas entre 16°C e 22 °C. A umidade foi conservada em intervalo de 50% e 70%, e a iluminação foi controlada por temporizadores que mantinham iluminação artificial, com ciclos de 12 horas claro/escuro. Utilizou-se um sistema de gaiolas suspensas com arame galvanizado, para a separação individual dos animais. Amostragem: os coelhos foram divididos, sequencialmente, em dois grupos experimentais.

**Dieta rica em colesterol:** a preparação da dieta rica em colesterol a 0,33% foi realizada e supervisionada pelo grupo do Professor Mário Penz da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A dieta foi armazenada em condições ideais no Centro de Pesquisas do HCPA e administrada sob a orientação de médico veterinário.

**Protocolo indutor de trombose:** Todos os animais foram submetidos ao protocolo de desendotelização aórtica com balão, sendo anestesiados com quetamina (10mg/kg, via intramuscular) e diazepam (1mg, via intravenosa). Incisão longitudinal de 3 cm foi realizada na região inguinal direita e a artéria femoral dissecada. Introduziu-se cateter Fogarty 3F (Baxter) pela artéria femoral direita até o arco da aorta, sendo o balão inflado com 0,8ml de ar e, então tracionado, até atingir a artéria femoral. Esse procedimento foi realizado uma única vez. Após, a artéria femoral foi ligada e a ferida operatória suturada.

**Intervenções:** Posteriormente ao procedimento de desendotelização, os coelhos do grupo de tratamento ativo receberam, diariamente, 150g de ração comercial padronizada e

enriquecida em colesterol a 0,33%, além de irbesartana, na dose de 37.5 mg. A água foi oferecida *ad libitum*. O grupo controle foi submetido ao mesmo protocolo e dieta, recebendo, contudo, placebo, ao invés de irbesartana.

Vinte e oito dias após a lesão endotelial com cateter-balão, coletou-se amostra de sangue para aferição do perfil lipídico. Na seqüência, todos os animais receberam o protocolo indutor de trombose, que consistiu da administração intraperitoneal de 100µg/kg do pró - coagulante veneno de víbora *Russelis* (Sigma Co-Saint Louis, USA), seguido, passados 30 minutos, de administração intravenosa de 20µg/kg de adrenalina.

#### **Macroscopia aórtica, vídeoplanimetria e quantificação da área dos trombos:**

Transcorridas doze horas desse procedimento, os animais foram anestesiados com quetamina e diazepam e mortos com a utilização de lidocaína intracardíaca. Por incisão xifopubiana, abriram-se o tórax e o abdome, sendo dissecadas a aorta e as artérias ilíacas. Depois da excisão do bloco aorta-ilíacas, a aorta foi seccionada ao nível valvular e aberta longitudinalmente. A artéria aberta foi fixada em superfície plana. Procedeu-se, então, à avaliação macroscópica mediante fotografias, para posterior vídeoplanimetria.

As imagens digitalizadas foram avaliadas através de planimetria, sendo o resultado final expresso em milímetros quadrados (mm<sup>2</sup>), calculados a partir de um referencial de tamanho incluído quando da obtenção de cada imagem. Os pesquisadores sabiam quais os animais que receberam a intervenção, entretanto, a aferição da área de trombose foi realizada com o aferidor cego para a intervenção.

**Análise histológica:** Realizou-se avaliação microscópica a partir de dois cortes histológicos de cada uma das porções específicas da aorta (arco, tórax e abdome) e artérias

ilíacas. Além disso, todos os segmentos que apresentaram trombo aderido foram cortados de maneira seriada e estudados por microscopia ótica.

Com o objetivo de serem quantificadas as alterações histológicas observadas, fez-se uso de um escore adaptado de Uint e colaboradores<sup>17</sup>, empregado em outro experimento de integrantes do que levou a efeito a presente análise<sup>18</sup>. Este escore constitui-se de cinco parâmetros histológicos: 1) espessamento intimal (presença de células esponjosas e fibrose da camada intimal); 2) fibrose da camada média; 3) ruptura da camada média com ou sem calcificação; 4) presença de trombo; 5) edema da camada adventícia. A cada uma destas alterações observadas foram atribuídos valores de 0 a 4, para o menor e maior grau de apresentação destas variáveis. Com o intuito de se avaliar a lesão vascular de forma unificada, criou-se uma variável geral, envolvendo a média da soma dos escores obtidos em quatro critérios (células esponjosas, fibrose da intima, fibrose da média e ruptura e/ou calcificação da média). A soma destes valores expressa o grau máximo de lesões observadas por animal. Todas as avaliações histológicas foram realizadas com o patologista cego para a intervenção.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A frequência de trombose nos grupos irbesartana e placebo foi comparada utilizando-se o teste exato de Fisher. As variáveis contínuas com distribuição normal (peso e colesterol) são apresentadas como média  $\pm$  desvio padrão e foram comparadas pelo teste t de Student, para amostras independentes, enquanto as sem distribuição normal (área total de trombos e o escore de lesão histológica) foram comparadas nos dois grupos utilizando-se o teste da soma dos sinais de Wilcoxon. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente

significativas, quando a estimativa de erro alfa foi menor do que 5% ( $P < 0.05$ ). O banco de dados foi gerado e analisado no SPSS 11.0.

## **RESULTADOS:**

No início do estudo, as médias de peso foram maiores no grupo irbesartana do que no grupo placebo ( $3,27 \text{ kg} \pm 0,3$  e  $2,64 \text{ kg} \pm 0,1$ ) ( $P < 0,001$ ), e este achado manteve-se no peso final, antes da morte dos animais ( $3,24 \text{ kg} \pm 0,3$ , no grupo Irbesartana, e  $3,02 \text{ kg} \pm 0,3$ , no grupo controle) ( $P = 0,027$ ).

Com a finalidade de se aferir a alteração no perfil lipídico introduzida pela dieta rica em colesterol, realizou-se, ao término dos 28 dias e antes da morte, dosagem do colesterol total, HDL, LDL e triglicérides em todos os animais. No grupo irbesartana, a média do colesterol total foi  $419,9 \pm 377 \text{ mg/dl}$  e, no grupo controle,  $702,6 \pm 279 \text{ mg/dl}$  ( $P = 0,004$ ), de LDL,  $340,6 \pm 338 \text{ mg/dl}$  e  $561,7 \pm 247 \text{ mg/dl}$  ( $P = 0,013$ ) e triglicérides,  $57,8 \pm 28 \text{ mg/dl}$  e  $107,8 \pm 19 \text{ mg/dl}$  ( $P < 0,001$ ), respectivamente. Quanto ao HDL, a média foi  $163,9 \pm 115 \text{ mg/dl}$ , no grupo irbesartana, e  $117,5 \pm 184 \text{ mg/dl}$ , no grupo controle, não havendo diferença estatisticamente significativa.

O efeito da irbesartana sobre a resposta vascular à lesão endotelial foi avaliado por critérios específicos e escore global de lesão vascular. Individualmente, a presença de células esponjosas, presença de ruptura da média e/ou calcificação e a intensidade de edema da camada adventícia não foram significativamente diferentes nos 2 grupos. Entretanto, houve redução no grupo irbesartana em relação ao placebo da fibrose da camada íntima ( $P < 0,001$ ), fibrose da camada média ( $P = 0,025$ ) e o escore global de lesão vascular ( $P = 0,030$ ).

No grupo controle, quatorze dos vinte e cinco animais estudados (56%) desenvolveram trombose arterial. Dentre os vinte e sete coelhos que receberam irbesartana, oito (29.7%) apresentaram trombos brancos, 24 horas após receberem o tratamento indutor de trombose. Tal diferença, entretanto, não atingiu significância estatística ( $P=0,064$ ).

Na avaliação por vídeoplanimetria, a extensão média de trombose arterial foi significativamente maior no grupo controle, sendo  $78,3 \pm 111 \text{ mm}^2$ , comparativamente a  $10,7 \pm 24 \text{ mm}^2$ , no grupo que recebeu tratamento com irbesartana ( $P=0.010$ ).

## **DISCUSSÃO:**

**Perfil Lipídico:** em nossa amostra, a irbesartana mostrou ser capaz de reduzir os níveis séricos de colesterol total, LDL e triglicérides em coelhos tratados com dieta rica em colesterol, quando comparado ao grupo controle. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo que comparou valsartana e benazepril, em coelhos com dieta rica em colesterol. O valsartan reduziu os níveis de triglicérides ( $P<0,05$ ) e de colesterol total ( $P=NS$ ), em comparação com o grupo controle<sup>19</sup>. Sanz et al demonstraram, em estudo experimental com delineamento semelhante ao anterior, que irbesartana e losartana, da mesma forma, reduziram os níveis de colesterol total, triglicérides e LDL significativamente, além de não terem alterado os níveis de HDL, quando comparados com o grupo controle<sup>20</sup>. O mecanismo pelo qual os BRAs reduziram o perfil lipídico nestes estudos não está estabelecido, sendo esses resultados ainda bastante controversos.

**Trombose Arterial:** a redução dos números de animais com trombose arterial e da extensão média de trombose arterial encontrada na presente análise assemelha-se ao estudo de

Johnstone et al, em que, utilizando candesartana em coelhos com dieta rica em colesterol, submetidos à lesão endotelial com cateter-balão, encontrou-se uma frequência de trombose 25% menor no grupo tratado com o BRA ( $P < 0.05$ )<sup>21</sup>. A explicação destes resultados talvez esteja relacionada não somente com o bloqueio das propriedades vasoconstritoras da angiotensina II, mas, também, com a interação do SRA com um dos mais importantes reguladores do sistema fibrinolítico, o PAI-1 (inibidor-1 do ativador do plasminogênio). Tal interação foi verificada em estudos como o de Vaughan et al, que demonstraram que a exposição de células bovinas do endotélio aórtico à angiotensina II elevou os níveis do antígeno PAI-1 e do RNAm de PAI-1. Análise por Northern blot, após lesão endotelial por cateter-balão na aorta de ratos, demonstrou, igualmente, aumento significativo de RNAm de PAI neste sítio, em relação ao grupo controle<sup>22</sup>. Os benefícios do bloqueio da angiotensina II por intermédio do uso de IECA foram demonstrados nesse mesmo modelo, pela redução da indução da expressão de PAI-1 em 44% ( $P < 0.05$ ), com a utilização de método de lesão endotelial semelhante a do presente trabalho (cateter-balão)<sup>23</sup>. De forma idêntica, outro IECA (quinapril) mostrou redução durante 24 horas e do pico matinal da atividade do PAI-1<sup>24</sup>. A utilização de BRAs com essa mesma finalidade também já demonstrou influência sobre os níveis de PAI-1, como demonstrou o ensaio clínico ISLAND, verificando ser a irbesartana ser capaz de reduzir, ao final de quatro semanas, os níveis de PAI-1 em 19%, relativamente ao placebo, em pacientes com síndrome metabólica ( $P < 0.001$ )<sup>8</sup>. Reforçando esses achados sobre o sistema fibrinolítico e o uso de BRAs, Oubina et al explicitaram que a valsartana reduziu a atividade do PAI-1 e aumentou a do t-PA, além de ter reduzido os níveis de fibrinogênio e o tempo de trombina, em coelhos hipercolesterolêmicos<sup>25</sup>.

A possibilidade de efeito antitrombótico da Ang-II envolve, também, a ativação e agregação plaquetária. Ping Li et al demonstraram que a irbesartana foi capaz de reduzir a agregação plaquetária, agindo como um antagonista do receptor  $TxA_2/PGH_2$  (tromboxano  $A_2$  /prostaglandina endoperóxido  $H_2$ ), em artérias coronárias de cães e em plaquetas humanas<sup>26</sup>. Resultados semelhantes foram obtidos *in vitro* com losartana<sup>27</sup>. O efeito sobre a inibição da ativação plaquetária igualmente já foi evidenciado com losartana e irbesartana<sup>28</sup>. Estes benefícios podem estar relacionados à atividade do óxido nítrico (NO), como inibidor da adesão e agregação plaquetárias. Leszek et al demonstraram que os BRAs utilizados nesse estudo induziram liberação de NO nas células endoteliais e, principalmente, em plaquetas. Além disso, houve redução da adesão e da agregação plaquetária correlacionada com os níveis de NO produzido por cada uma das medicações utilizadas no experimento<sup>29</sup>. Estudo posterior sugeriu que este efeito antitrombótico via NO realizava-se pela ação da angiotensina-(1-7)<sup>30</sup>. Os resultados do presente modelo experimental estão de acordo com algumas das evidências acumuladas em relação ao potencial efeito antitrombótico dos BRAs.

**Resposta da parede arterial à lesão química e mecânica:** houve redução da intensidade das lesões histológicas avaliadas neste modelo (fibrose da íntima, fibrose da média e score global de aterosclerose). A utilização da dieta rica em colesterol pode ter representado uma influência particular neste modelo experimental, pois em estudos prévios a hipercolesterolemia foi capaz de aumentar em, aproximadamente, cinco vezes a expressão do receptor da Ang-II, principalmente o receptor  $AT_1$ , além de reduzir a vasodilatação endotélio-dependente, em coelhos Nova Zelândia<sup>31</sup>. Daugherty et al evidenciaram que a aterosclerose induzida por hipercolesterolemia foi capaz de aumentar significativamente os níveis sistêmicos de Ang-II, bem como de todo o SRA sistêmico<sup>32</sup>. Portanto, além de ser um fator

independente de risco cardiovascular, a hipercolesterolemia relaciona-se diretamente ao SRA, aumentando as chances de efeito clínico, com o uso de medicamentos BRA.

A redução da resposta vascular à lesão mecânica e química neste modelo experimental também já foi demonstrada através do bloqueio do SRA com o uso de captopril<sup>18</sup>, bem como na redução da aterosclerose utilizando-se fármacos IECA, em coelhos<sup>33,34</sup> e macacos *cynomolgus*<sup>35,36</sup>, alimentados com dieta rica em colesterol. O uso de fármacos BRAs, da mesma forma, foi avaliado em outros estudos com este intuito. Em macacos *cynomolgus*, utilizando dieta rica em colesterol, o uso de losartana reduziu a extensão da placa aterosclerótica na aorta, coronárias e carótidas de maneira significativa<sup>37</sup>. No estudo de Johnstone et al, houve, igualmente, redução significativa ( $P < 0.001$ ) da aterosclerose, avaliada pela razão da área íntima-média da aorta infrarenal, no grupo tratado com o BRA. Candesartana também mostrou ser capaz de reduzir a razão da área de macrófagos, em relação à área correspondente, na placa aterosclerótica<sup>21</sup>. Este benefício está de acordo, com a observação de que, através de análise imunohistoquímica, os macrófagos são os principais tipos de célula na patogênese da aterosclerose desse modelo experimental<sup>19</sup>. Hope et al utilizaram coelhos Watanabe para avaliar duas doses de irbesartana (30mg/kg/dia e 75mg/kg/dia), contra placebo. A maior dose foi capaz de diminuir significativamente a superfície aterosclerótica aórtica, ao final de nove meses de seguimento, mas associada à redução da pressão arterial. A quantidade de colesterol na aorta foi menor ( $P < 0.02$ ) com as duas doses do medicamento comparativamente ao placebo<sup>38</sup>. Redução, em coelhos ateroscleróticos, das áreas de lesão da íntima, bem como do lúmen, também foi encontrada com o uso de valsartana ( $P < 0.05$ ). Neste mesmo estudo, houve melhora da resposta na



vasodilatação induzida por acetilcolina, em relação ao grupo controle com dieta rica em colesterol<sup>39</sup>.

Os mecanismos propostos para estes resultados, obtidos com o uso de BRAs na patogênese da aterosclerose, encontram-se baseados em evidências experimentais da interação do SRA, por intermédio da Ang-II com outros elementos de cada etapa que compõe o processo evolutivo aterosclerose-trombose. Considerando-se que a LDL oxidada é fundamental na aterogênese, Li DY et al, por exemplo, demonstraram aumento da expressão de receptores endoteliais específicos para LDL oxidado (LOX-1) e da captação de LDL oxidada, dependentes da concentração de Ang-II em artérias coronárias humanas, sendo este efeito revertido com o bloqueio AT<sub>1</sub><sup>40</sup>.

Mais ainda, Shlomo et al evidenciaram que a Ang-II estimula a oxidação lipídica do LDL mediada por macrófagos, relacionado diretamente com a peroxidação lipídica celular<sup>41</sup>. O bloqueio do fator nuclear kappa B (NFκB) também demonstrou reduzir, de maneira significativa, a lesão em órgão-alvo, em ratos com expressão exagerada dos genes da renina e angiotensinogênio humano<sup>42</sup>, comprovando a relação da Ang-II também com este fator de transcrição celular, sabidamente relacionado com ativação de mecanismos inflamatórios, tais como citocinas e moléculas de adesão, e imunológicos<sup>43</sup>.

Warnholtz et al verificaram, em coelhos Nova Zelândia, que a hipercolesterolemia está associada com disfunção endotelial e aumento da produção de superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), através da ativação da NADPH oxidase vascular. O bloqueio AT<sub>1</sub>, nesse trabalho, normalizou a atividade da oxidase, além de reduzir a área da placa aterosclerótica e da infiltração de macrófagos<sup>44</sup>. A simples utilização de uma dieta normal em coelhos previamente estimulados com dieta rica

em colesterol é capaz de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio e acúmulo de LDL oxidado, nas placas ateroscleróticas<sup>45</sup>. Também em células endoteliais humanas, a angiotensina II é capaz de aumentar a expressão do receptor de LDL oxidado e sua captação para formação de células esponjosas<sup>46</sup>. Estes achados demonstram o envolvimento direto da Ang-II e o receptor AT<sub>1</sub> com hipercolesterolemia e estresse oxidativo, marcadores fundamentais na evolução da placa aterosclerótica e estão de acordo com os nossos achados de diminuição da resposta vascular à lesão química e mecânica.

**Limitações:** uma das limitações do nosso experimento foi à ausência, por dificuldades técnicas, de medidas da pressão arterial (PA) nos dois grupos. Entretanto, em estudos experimentais onde essas medidas foram realizadas sistematicamente, a variação significativa da PA, utilizando-se BRAs em diferentes dosagens e períodos de acompanhamento, não foi diferente em relação ao placebo. Como exemplo, a utilização de candesartana contra placebo, em coelhos Nova Zelândia, com dieta rica em colesterol, durante oito semanas, não demonstrou diferença estatística nos níveis de pressão arterial entre os dois grupos. Outro estudo experimental, fazendo uso de coelhos geneticamente hipercolesterolêmicos (Watanabe), para avaliar, contra placebo, o efeito antiaterosclerótico da irbesartana (em dose superior à utilizada no presente trabalho – 30 mg/kg/dia), não encontrou diferenças significativas nos níveis de pressão arterial, ao final de nove meses de seguimento<sup>17</sup>. Mizuo et al demonstraram que o uso de um BRA (HR 720) em macacos também não alterou significativamente, ao final de seis meses, as médias da PA quando comparado ao placebo<sup>34</sup>. Tais resultados sugerem que as possíveis diferenças pressóricas no presente trabalho não tenham sido significativas, embora não possam ser descartadas, considerando-se a ausência de efeito hipotensor significativo, em alguns modelos

experimentais utilizando-se BRAs, inclusive irbesartana, em dose superior à utilizada neste estudo.

### **CONCLUSÕES:**

A irbesartana, administrado por via oral, durante vinte e oito dias, em modelo experimental de lesão endotelial por cateter-balão e dieta rica em colesterol, foi capaz de reduzir, em coelhos Nova Zelândia, a extensão da trombose medida por vídeoplanimetria, os níveis séricos de colesterol total, triglicérides e LDL e a resposta vascular à lesão endotelial quando comparados ao grupo controle que recebeu placebo.

Concluimos, portanto, que, neste estudo, a irbesartana reduziu a resposta vascular arterial à lesão química e mecânica e trombose em coelhos, podendo esse benefício ser atribuído ao bloqueio dos efeitos vasoconstritores da Ang-II, bem como às suas demais ações sobre o processo evolutivo da aterosclerose e seus desfechos de trombose.

## **IRBESARTAN REDUCES THROMBOSIS AND VASCULAR MECHANICAL INJURY RESPONSE IN ANIMAL MODEL OF ENDOTHELIAL INJURY AND HYPERCHOLESTEROLEMIA**

### **Summary**

**Introduction:** partial control of the angiotensin II (Ang-II) can be realized through angiotensin II (BRA) receptor blockades. Its proatherogenic and prothrombotic effects have been the targets to clinical and experimental studies in the international scientific literature. **Goals:** to evaluate the antiatherosclerotic and antithrombotic effects in the angiotensin II receptor blockade, irbesartan in an experimental model of arterial thrombosis in rabbits submitted to

aortic endothelium loss and cholesterol-rich diet<sup>1</sup>. **Materials and Methods:** fifty-two New Zealand rabbits were analyzed, male, white and weighing, in average, 2,96kg. All the animals were submitted to an aortic endothelium loss through Fogarty 3F catheter and next divided in two groups. To the active group was administered irbesartan, with an oral dose of 37,5mg/day and to the control group was administered placebo. Both groups received, during twenty-eight days, cholesterol-rich diet at 0.33%. At the end of this period, all animals were killed, after receiving a thrombosis inductor with a Russelis viper poison base and adrenaline. **Results:** in the group of irbesartan, eight of the twenty-seven animals (29.6%) developed arterial thrombosis, comparatively to the fourteen of the twenty-five (56%) of the control group (p=0.064). The average extension of the arterial thrombosis, evaluated through videoplanimetri, was  $78,3 \pm 111,4$  mm<sup>2</sup> in the control group and  $10,7 \pm 24,5$  mm<sup>2</sup> in the irbesartan group (p=0.010). Occurred a significant reduction of the atherosclerotic injuries characterized by intima fibrosis, average fibrosis and in the global score of the vascular injury in the animals that received irbesartan. In the irbesartan group, the total average cholesterol was  $419,9 \pm 377$  mg/dl and in the control group was  $702,6 \pm 279$  mg/dl (P=0.004), LDL  $340,6 \pm 338$  mg/dl and  $561,7 \pm 247$  mg/dl (P=0.013), triglycerides  $57,8 \pm 28$  mg/dl and  $107,8 \pm 19$  mg/dl (P<0,001) and HDL  $163,9 \pm 115$  mg/dl and  $117,5 \pm 184$  mg/dl (P=NS) respectively. **Conclusions:** the irbesartan improved the lipid profile, reduced the arterial thrombosis extension and reduced the response score of the vascular injury, in this experimental model of the chemical and mechanical endothelial injury associated to the hypercholesterolemia and vasoconstriction.

## **Introduction**

The renin-angiotensin (SRA) system, through a series of physiological responses, has as main function regulating the arterial pressure control and the electrolytic homeostasis maintenance, relating directly, as consequence, with alterations and diseases such as hypertension, cardio insufficiency and diabetic nephropathy. This occurs, mainly, by a direct action of the final product of these activations, the angiotensin II, through its connection to cell surfaces receptors, specially types 1 and 2 (AT1 e AT2).<sup>1</sup>

The control or the pharmacological blockade of the SRA actions can be accomplished through medicine blockades of the conversion enzyme action, which transforms the angiotensin I in angiotensin II (Ang-II), by pharmacy called conversion enzyme inhibitors (IECA) or even by the use of the AT1 ad angiotensin II (BRAs) receptor blockades.<sup>2,3</sup>

The BRAs utilization has been also related, by its action mechanism, with the reduction of the atherosclerosis development and progression and, likewise, of its major clinical impact upshot, the arterial thrombosis.

Irbersatan, a BRA, demonstrated to have, comparing to others pharmacy of the same class, higher oral biodisponibility and capacity of connection with the AT1<sup>4,5</sup> receptor. Besides that, in patients with coronary artery diseases, metabolic syndrome or Diabetes mellitus, the clinical benefits of this BRA have been already showed up in the reduction of the inflammatory mechanisms and the evolution of the atherosclerosis <sup>6-11</sup>. SRA relation with the atherosclerosis are also expressed through the demonstration of the intense presence of the conversion enzyme of the tissue angiotensin (ECA) into macrophages of human atherosclerotic plaques, <sup>12</sup> suggesting that in both the

increase of the tissue angiotensin production by the presence of ECA in these sites and its action blockade might have some benefits in the coronary arterial diseases.

Several experimental models of atherosclerosis and thromboses have been used in the international scientific literature. The utilization of New Zealand rabbits, induced by a cholesterol-rich diet, during eight months, and the consequent evaluation of the thrombosis effect, with the administration of the procoagulant [Russel's viper venom (RVV)] and vaso-constrictor (histamine or adrenaline) upon the atherosclerotic endothelium were described, at first, by Constantinides e Chakravarti.<sup>13</sup> It was also showed that in the addition of the endothelial injury caused by catheter balloon, the time to the thrombosis was reduced to four months<sup>14</sup> and, later, this period could be reduced to one month (P.P. Scipioni, Comunicação Pessoal, 2003). This model has been used<sup>15</sup> with some modifications validated by our group<sup>16</sup>.

So, the main goal of this paper was consisted by an analysis of the irbesartan's anti-thrombotic effect, in this model of arterial thrombosis after endothelial injury caused by catheter balloon and hypercholesterolemia, in rabbits. Secondly, were evaluated the effects about the vascular response to the mechanic injury and about the lipid profile alteration produced through the cholesterol-rich diet in these animals.

## **Material and Methods**

Procedures and logistic: this study was developed at Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Animal Experimentation Unit of the Research Center of the Clinical Hospital from Porto Alegre). Sample: Fifty-two New Zealand rabbits, male, white, with medium age of 3 months and medium weight

of 2,96kg. The animals were daily observed by a veterinary and kept in an acclimatized room, in individual cages, under a temperature of 16°C - 22 °C. The humidity was conserved in intervals of 50% - 70% and the illumination was controlled by postpones used by a cholesterol-rich diet in these animals. Which had artificial illumination with cycles of 12 hours clear/dark. It was used a system of cages poised on galvanized wire, keeping the individual separation between the animals. Cross-section: the rabbits were divided, sequencelly, in two experimental groups.

Cholesterol-rich diet: the preparation of the Cholesterol-rich diet in 0,33% was made and supervision by Professor Mario Pens, from Agronomy College of the Universidad Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). The diet was hoarded in ideal conditions at the Centro de Pesquisas do HCPA and it was administrated under the veterinary orientation.

Thrombosis Induction Protocol: all the animals were submitted to the protocol of the aorta endothelium loss with balloon, they were sedated with ketamine (10mg/kg through intramuscular injection) and diazepam (1mg, intravenously). A longitudinal incision of 3 cm was made on the right inguinal region and the femoral artery was dissected. A catheter Fogarty 3F (Baxter) was introduced through the right femoral artery toward the arch of the aorta, inflating the balloon with 0,8ml of air, then it suffered traction, until reached the femoral artery. This procedure was made only one time. After that, the femoral artery was linked and the operatorial wound was sutured.

Interventions: After the procedure of endothelium loss, the rabbits of the active program were given 150g of patternalized ration of food daily; this ration of food was enriched in 0,33% of cholesterol, besides the irbesartan, with a dosage of 37.5mg. The water was

offered ad libitum. The control group was submitted to the same protocol and diet, however, receiving placebo instead irbesartan.

Twenty-eight days after the endothelial injury with a catheter balloon, was collected a blood sample to measure the lipid profile. In the sequence, all the animals received the thrombosis inductor protocol, which was consisted of an administration of intraperitoneal in a dose of 100 $\mu$ g/kg of the procoagulant poison viper Russelis (Sigma Co-Saint Louis, USA), after 30 minutes, was administered a dose of adrenaline 20 $\mu$ g/k through intravenous injection.

Aortic macroscopy, videoplanimetri and the quantification in the thrombos area: After twelve hours of this procedure, all the animals suffered anesthesia of quetamina and diazepam and were killed by the use of intracardio lidocaine injection. Through a xiphopubian incision, the chest and the abdomen were cutted, having the aorta and iliac arteries dissected. The next step was to remove the iliac artery blockade; the aorta was seccionated toward the valvular level and opened longitudinally. The artery opened was fixed in a flat surface. Then, occurred a macroscopic evaluation through photographs, to following videoplanimetri.

The digitalized images were evaluated through planimetri, the final result was express in square millimeters (mm<sup>2</sup>), calculated by a referential of size included in each obtained image. The researches knew which animals had received the intervention; however, the gauging of the thrombosis area was realized with the blind gauge for the intervention.

Histological analysis: A microscopic evaluation was realized through two histological cuts in each one of the specific portions of the aorta (arch, chest e abdomen) and iliac



arteries. Besides, all the segments that had presented attached thrombus were cutted in a sequence and studied by optical microscopy.

With the main goal of having the observed biological alternances quantificated, was used an adaptated score of Uint and collaborators<sup>17</sup>, which was used in another experiment of integrants that lead to this present analysis<sup>18</sup>. This score was based on five histological parameters: 1) intimal thickening (presence of sponge cells fibrosis of the intimal plaque) 2) media tissue fibrosis; 3) media tissue rupture; 4) presence of thrombus; 5) adventitia tissue edema. To each of these observed alternances were attributed values of 0 to 4, to the minor and to the higher degree for these variables presentation. In order to evaluate the vascular injury in a unified way was created general variable involving an average summation of the scores obtained through for criteria (sponge cells, intima fibrosis, media fibrosis and media l rupture and/or calcification). The sum of these values expresses the maximum degree of the observed injuries per animal. All the histological evaluations were realized with a blind pathologist for the intervention.

### **Statistical Analysis**

The frequency of thrombosis in the groups of irbesartan and placebo was compared using Fisher's exact test. The continual variables with a normal distribution (weight and cholesterol) are presented as medium  $\pm$  standard deviation and were compared through Student's test t to independent samples, while the others, which didn't have a normal distribution (total area of the thrombus and the histological injury score) were compared in both groups using Wilcoxon's Sign-test. The differences between both groups were

considered statically significantly, when the alpha error estimative was lower than 5% ( $P < 0.05$ ). The database was made and analyzed trough SPSS 11.0.

In the beginning of this study, the average of weight were largest in the irbesartan group than in the placebo group ( $3,27 \text{ kg} \pm 0,3$  and  $2,64 \text{ kg} \pm 0,1$ ) ( $P < 0,001$ ), and this discovery was kept in the final weight, before the animal's death ( $3,24 \text{ kg} \pm 0,3$ , in the Irbesartan, and  $3,02 \text{ kg} \pm 0,3$  in the control group) ( $P = 0,027$ ).

In order to confirm the alteration in the lipid profile introduced through a cholesterol-rich diet was realized, after 28 days and before the animal's death, a dosage of the total cholesterol, HDL, LDL and triglycerides in each animal. In the irbesartan group, the total cholesterol medium was  $419.9 \pm 377 \text{ mg/dl}$  and in the control group was  $702.6 \pm 279 \text{ mg/dl}$  ( $P = 0.004$ ), of LDL,  $340,6 \pm 338 \text{ mg/dl}$  and  $561,7 \pm 247 \text{ mg/dl}$  ( $P = 0.013$ ) and triglycerides,  $57,8 \pm 28 \text{ mg/dl}$  e  $107,8 \pm 19 \text{ mg/dl}$  ( $P < 0,001$ ), respectively. In the HDL, the average between them both was  $163,9 \pm 115 \text{ mg/dl}$ , in the irbesartan group, and  $117,5 \pm 184 \text{ mg/dl}$ , in the control group, there was no statistically significant differences.

The irbesartan effect over the vascular response to the endothelial injury was evaluated through specific criteria and global score of the vascular injury. Individually, the presence of sponge cells, presence of the media rupture and/or calcification and the intensity of the adventitia tissue edema wasn't significantly different in both groups. However, there was reduction in the irbesartan group in relation to the placebo of the fibrosis in the intima tissue ( $P < 0,001$ ), media tissue fibrosis ( $P = 0,025$ ) and the vascular injury global score ( $P = 0,030$ ).

In the control group, fourteen animals of the twenty-five animals studied (56%) developed arterial thrombosis. Among the twenty-seven rabbits that received irbesartan,

eight (29.7%) had presented white thrombus; 24 hours after receive the inductor thrombosis treatment. Such difference, however, did not reach statistical significance. In the evaluation through videoplanimetry, the average extension of arterial thrombosis was significantly bigger in the control group, being  $78,3 \pm 111 \text{ mm}^2$ , comparatively to  $10,7 \pm 24 \text{ mm}^2$ , in the group who had received an irbesartan treatment  $P (=0.010)$ .

## **Discussion**

**Lipid Profile:** in our sample, irbesartan showed to be able of reducing the serum levels of the total cholesterol, LDL and triglycerides in rabbits treated with cholesterol-rich diet. Valsartan reduced the triglycerides levels ( $P < 0,05$ ) and the total cholesterol ( $P = \text{NS}$ ), in comparison to the control group<sup>19</sup>. Sanz et al showed, in an experimental study with a similar procedure to the previous study presented, where irbesartan e losartan as the same way reduced the total cholesterol levels, when compared to the control group<sup>20</sup>. The mechanism through the BRAs had reduced the lipid profile in these studies are not established, being these results still quite controversy.

**Arterial Thrombosis:** the numbers reduction of the animals with arterial thrombosis and the average extension of arterial thrombosis found in this analysis are similar to Johnstone's study, in which, using candesartan in rabbits with cholesterol-rich diet, were submitted to endothelial injury with catheter balloon, was found a thrombosis frequency 25% inferior in the group treated with BRA ( $P < 0.05$ ).<sup>21</sup> The explanation of these results might be related not only with the blockade of the properties of the angiotensin vasoconstrictors II, but also with the SRA interaction with one of the most important fibrinolytic system regulators, PAI-1 (inhibitor-1 of the plasminogen activator). Such

interaction was verified in studies as Vaughan et al, which had showed that the expositions of ox cells of the aortical endothelium to angiotensin II had increased the antigen PAI-1 and RNAm de PAI-1 levels. In the analysis by Northern blot, after an endothelial injury through catheter balloon in the aorta of mice, equally showed a RNAm de PAI significant increasement in this site, in relation to the control group<sup>22</sup>. The benefits of the angiotensin II blockade through the use of IECA were demonstrated in this same model, through the induction of the expression PAI-1 in 44% ( $P < 0.05$ ) reduction, using an endothelial injury method similar to this present study (catheter balloon)<sup>23</sup>. In an identical form, another IECA (quinapril) showed reduction during 24 hours and morn heights of PAI-1<sup>24</sup> activity. The use of BRAs with this same purpose had already showed influence over the PAI-1 levels, as it had showed the clinic essay ISLAND, verifying that irbesartan is able to cause reduction, at the end of four weeks, the PAI-1 levels in 19%, relatively to placebo, in patients with metabolic syndrome ( $P < 0.001$ )<sup>8</sup>. Reinforcing these findings over the fibrinolytic system and the use of BRAs, Oubina et al explicit that valsartan had reduced PAI-1 activity and increased the levels of the fibrinogen and the time of the thrombin, in hypercholesterolemics<sup>25</sup> rabbits.

The probability of the antithrombotic of Ang-II effect also involves the joining platelettes activation. Ping Li et al had showed that irbesartan was able to reduce the joining platelettes, acting as a receptor's antagonist  $TxA_2/PGH_2$  (thromboxane  $A_2$ /prostaglandin endoperóxido  $H_2$ ), in coronary arteries of dogs and in human plaquettes<sup>26</sup>. Similar results were obtained in vitro with losartan<sup>27</sup>. The effect over the inhibition of the platelettes activation has been equally showed with losartan e irbesartan<sup>28</sup>. These benefits can be related to nitric oxide (NO) activity, as an adhesion and joining platelettes

inhibitor. Leszek et al showed that the Leszek et al showed that the BRAS used in this study has induced the NO liberation in the endothelial cells and, mainly, in the platelettes. Besides, there was an adhesion and joining platelettes correlated with the NO levels produced by each one of the medications used in the experiment<sup>29</sup>. An afterwards study suggested that this antithrombotic through NO effect was realized by angiotensin-(1-7)<sup>30</sup> action. The results of this present experimental model are in agreement with some of the evidences accumulated in relation to the BRAs antithrombotic potential effect.

Response of the arterial wall to the chemical and mechanical injury: there was a reduction of the histological injuries intensity evaluated in this model (intima fibrosis, media fibrosis and atherosclerosis total score). The cholesterol-rich diet utilized might have presented a particular influence in this experimental model, because in previous studies the hypercholesterolemia was able of increase in, proximally, five times the Ang-II receptor expression, besides to reduce the vasodilatation dependent endothelial, in New Zealand rabbits<sup>31</sup>. Daugherty et al showed that the atherosclerosis inducted through hypercholesterolemia was able to increase significantly Ang-II systemic levels, just like the whole systemic SRA<sup>32</sup>. Hence, furthermore being an independent factor of cardiovascular risk, hypercholesterolemia is directly related with SRA, increasing the clinic effect chances, with the use of BRA medicines.

The vascular response to the chemical e mechanical injury reduction in this experimental model have been also demonstrated through the SRA blockade with the use of captopril<sup>18</sup>, just like in the atherosclerosis reduction using IECA pharmacies, in rabbits<sup>33,34</sup> and in cynomolgus mokeys<sup>35,36</sup>, fed with cholesterol-rich diet. The use of

pharmacies BRAs, in the same way, was evaluated in others studies with this same purpose. In cynomolgus monkeys, using a cholesterol-rich diet, the use of losartan had reduced the extension of the atherosclerosis plaque in the aorta, coronaries and carotid in a significant way<sup>37</sup>.

In Johnstone et al study, there was, equally, significant reduction ( $P < 0.001$ ) of the atherosclerosis, evaluated trough the measure area of the aorta infrarenal intima-media, in the group treated with BRA. Candesartan also showed to be able of reducing the macrophages measure area, in relation to the correspondent area, in the atherosclerosis plaque<sup>21</sup>. This benefit is in agreement, observing that through immunohistoquimic analysis, that macrophages are the main types of cells in the atherosclerosis pathogenesis of this experimental model<sup>9</sup>. Hope et al used Watanabe rabbits to evaluate two doses of irbesartan (30mg/kg/day and 75mg/kg/day), against placebo. The biggest dose was able of reducing significantly the aortic atherosclerosis surface, at the end of nine months of use, but associated to the arterial pressure reduction. The quantity of cholesterol in the aorta was fewer ( $P < 0.02$ ) with two comparatively dose of the medicine to the placebo<sup>38</sup>. Reduction, in atherosclerotic rabbits, at the intima injury areas, such as in the lumen, was also found with valsartan ( $P < 0.05$ ) use. In this same study, there was an improvement of the vasodilatation response inducted through acetylcholine, in relation to the control group with cholesterol-rich diet<sup>39</sup>.

The mechanisms proposed to this results, obtained with the use of BRAs in the atherosclerosis pathogenesis, are based in experimental evidences of the SRA interaction, through Ang-II with others elements of each phase that composes the atherosclerosis-thrombosis evolutive process. Considering that the oxidized LDLit is essential in the

atherogenesis, Li DY et al, for instance, demonstrated an increase of the specific endothelial expression receptors to oxidized LDL (LOX-1) and an increase of the capture of oxidized LDL, dependent of the ANG-II concentration in human coronary arteries, this effect was reversed through AT1 blockade.

More than this, Shlomo et al showed that Ang-II stimulates the oxidized LDL lipid through macrophages, related directly with the cell lipid peroxidation<sup>41</sup>. The blockade of the nuclear factor kappaB (NFκB) also demonstrated to reduce significantly the injury in the target-organ, in mice with exaggerated expression of renin genes human angiotensinogen<sup>42</sup>, also confirming ang-II relation with the cell transcription, precisely related with the activation of the inflammatory mechanisms, such as cytokines and adhesion molecules and immunologicals<sup>43</sup>.

Warnholtz et al verified that in New Zealand rabbits the hypercholesterolemia is associated with the endothelial dysfunction and the increase of the superoxide production (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), through the activation of the vascular oxidase NADPH. The AT1 blockade, in this work, normalized the oxidase activity, besides reducing the atherosclerotic plaque area and also reducing the macrophage<sup>44</sup> infiltration. The simple normal diet utilization in rabbits, previously stimulated with a cholesterol-rich diet, is able to reduce the production of reactive oxygen species and the accumulation of oxidized LDL, in the atherosclerotic plaques<sup>45</sup>. In endothelial human cells, angiotensinII is also able to increase the expression of the oxidized LDL receptor and its capture to the creation of sponge cells<sup>46</sup>. These findings show the Ang-II direct involvement and the AT1 receptor with hypercholesterolemia and oxidized stress, fundamental markers in the

atherosclerotic plaque evolution and they are in agreement in our findings about the decrease of the chemical and mechanical vascular injury response.

Limitations: one of the limitations of our experiment was the absence, because of the technical difficulties of the arterial pressure (PA) measure in both groups. However, in experimental studies where these measures were systematically realized, a significant PA variation, using BRAs in different doses and accompaniment periods, was not different in relation to placebo. For instance, the utilization of candesartan against placebo, in New Zealand rabbits, with cholesterol-rich diet, during eight weeks, had not showed a statistic difference in the arterial pressure levels in both groups. Another experimental study, using rabbits genetically hypercholesterolemic (Watanabe), to evaluate, against placebo, the irbesartan anti-atherosclerotic effect (in a higher dose than the dose used in this work - 30 mg/kg/day), did not find any significant differences in the arterial pressure level, at the end of nine months of treatment<sup>17</sup>. Mizuo et al showed that the BRA (HR 720) used in monkeys did not make significant difference either, at the end of six months, the PA averages when comparing to placebo<sup>34</sup>. Such results suggest that the possible pressured differences in the present work were not significant, although they cannot be discarded, considering the absence of the significant hypotensor effect, in some of the experimental models using BRAs, including irbesartan, in a higher dose used like the one in this study.

## **Conclusions**

Oral irbesartan, administered, during twenty-eight days, in a experimental model of endothelial injury through catheter balloon and cholesterol-rich diet was able to reduce, in New Zealand rabbits, the extension of the thrombosis measured by videoplanimetria,



the serum levels of the total cholesterol, triglycerides and LDL and the vascular response to the endothelial injury when compared to the control group which had received placebo.

Hence, in this study, we conclude that irbesartan reduced the arterial vascular response to the chemical and mechanical injury and thrombosis in rabbits, this benefit can be attributed to the blockade of the Ang-II vasoconstrictors effects, such as its others actions over the evaluative process of the atherosclerosis and its thrombosis upshots.

#### **REFERÊNCIAS:**

1. Chung O., Unger T..Angiotensin II receptor blockade and end-organ protection. **Am J Hypertens**, 1999.12:150S-156S.
2. Goodfriend T.L., Elliot M.E., Catt K.J., Angiotensin receptors and their antagonists. **N Engl J Med**, 1996. 334(25):1649-54.
3. Bumier M., Brunner H.R., Angiotensin II receptor antagonists. **Lancet**, 2000. 355:637-45.
4. Belz, G.G., Butzer R., Kober S., Mang C., Mutschler E. Time course and extent of angiotensin II antagonism after irbesartan, losartan, and valsartan in humans assessed by angiotensin II dose response and radioligand receptor assay. **Clin Pharmacol Ther**, 1999. 66(4):367-73.
5. Unger, T. Significance of angiotensin type 1 receptor blockade: why are angiotensin II receptor blockers different? **Am J Cardiol**, 1999. 84:9S-15S.
6. Proudfoot J.M., Croft K.D., Puddey I.B., Beilin L.B., Angiotensin II type 1

receptor antagonists inhibit basal as well as low-density lipoprotein and platelet-activating factor-stimulated human monocyte chemoattractant protein-1. **J Pharmacol Exp Ther**, 2003. 305(3):846-53.

7. Ceriello A., Assaloni R., Da Ros R., Maier A., Piconi L., Quagliaro L., Espósito K., Giugliano D. Effect of atorvastatin and irbesartan, alone and in combination, on postprandial endothelial dysfunction, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetic patients. **Circulation**, 2005. 111:2518-24.
8. Prasad A., Tupas-Habib T., Schenki W.H., Mincemoyer R., Panza J.A., Waclawin M.A., Ellahham S., Quyyummi A. Acute and chronic angiotensin-1 receptor antagonism reverses endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**, 2000. 101:2349-54.
9. Sola S., Muhammad Q.S., Cheema F.A., Khan-Merchant N., Menon R.G., Parthasarathy S., Khan B.V. Irbesartan and lipoic acid improve endothelial function and reduce markers of inflammation in the metabolic syndrome. **Circulation**, 2005. 111:343-48.
10. Khan B.V., Navalkar S., Khan Q.A., Rahman S.T., Parthasarathy S. Irbesartan, an angiotensin type 1 receptor inhibitor, regulates the vascular oxidative state in patients with coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol**, 2001. 38:1662-7.
11. Navalkar S., Parthasarathy S., Santanam N., Khan B.V. Irbesartan, an angiotensin type 1 receptor inhibitor, regulates markers of inflammation in patients with premature atherosclerosis. **J Am Coll Cardiol**, 2001. 37:440-4.

12. Diet F., Pratt R.E., Berry G.J., Momose N., Gibbons G.H., Dzau V.J. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. **Circulation**, 1996. 94:2756-67.
13. Constantinides P, Chakravarti R. Rabbit arterial thrombosis production by systemic procedures. **Arch Pathol**, 1961. 72:79-90.
14. Abela G.S., Picon P.D., Friedl SE, Gebara O.C., Miyamoto A., Federman M., Tofler G.H., Muller J.E. Triggering of plaque disruption and arterial thrombosis in an atherosclerotic rabbit model. **Circulation**, 1995. 91:776-84.
15. Wen-qiang C., Yun Z., Mei Z., Xiao-ping J., Yue Y., Yong-feng Z. Establishing an animal model of unstable atherosclerotic plaques. **Chin Med J**, 2004. 117(9):1293-98.
16. Costa A.F., Gamermann P.W., Picon P.X., Mosmann M.P., Kettlun A.M., Valenzuela M.A., Sarkis J.J.F., Battastini A.M.O., Picon P.D. Intravenous apyrase administration reduces arterial thrombosis in a rabbit model of endothelial denudation in vivo. **Blood Coagul Fibrinolysis**, 2004. 15:545-51.
17. Uint L., Laurindo F.R.M., Lopes E.A., Da-Luz P.L. Ballon-induced endothelial denudation promotes deep injury of the arterial wall. **Brazilian J Med Biol Res**, 1989. 22:913-15.
18. Wainstein M.V., Gonçalves S.C. Costa A.F., Mengarda C.V., Berlim G.L., Edelweiss M., Edelweiss M.I., Ribeiro J.P., Picon P.D. Effect of captopril in atherosclerosis and arterial thrombosis in an animal modelo of endothelial

lesion and hypercholesterolemia. **J Am Coll Cardiol**, 1998.31(5):33C..

19. Li J., Hirose N., Kawamura N., Arai Y., Antiatherogenic effect of angiotensin converting enzyme inhibitor (benazepril) and angiotensin II receptor antagonist (valsartan) in the cholesterol-fed rabbits. **Atherosclerosis**, 1999. 143:315-26.
20. Sanz M., Granado P., Tejerina T. Two angiotensin AT<sub>1</sub> receptor antagonists, irbesartan and losartan, effects in cholesterol-fed rabbits. **Eur J Pharmacol**, 2002. 442:99-106.
21. Jonhstone M.T., Perez A.S., Nasser I., Stewart R., Vaidya A., Ammary F.A., Schmidt B., Horowitz G., Dolgoff J., Hamilton J., Quist W.C. Angiotensin receptor blockade with candesartana attenuates atherosclerosis, plaque disruption, and macrophage accumulation within the plaque in a rabbit model. **Circulation**, 2004. 110:2060-65.
22. Vaughan D.E., Lazos S.A., Tong K. Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. **J Clin Invest**, 1995. 95:995-1001.
23. Hamdan A.D., Quist W.C., Gagne J.B., Feener E.P. Angiotensin-converting enzyme inhibition suppresses plasminogen activator inhibitor-1 expression in the neointima of ballon-injured rat aorta. **Circulation**, 1996. 93:1073-78.
24. Brown N.J., Airbasli M.A., Williams G.H., Litchfield W.R., Vaughan D.E. Effect of activation and inhibition of the renin-angiotensin system on plasma PAI-1. **Hypertension**, 1998. 32:965-71.
25. Oubina MP, d.L.H.N., Vazquez-Perez S, Cediell E, Sanz-Rosa D, Ruilope

- LM, Cachofeiro V, Lahera V., Valsartan improves fibrinolytic balance in atherosclerotic rabbits. **J Hypertens**, 2002. 20(2):183-6.
26. Li P., Fukuhara M., Diz D.I., Ferrario C.F., Brosnihan K.B. Novel angiotensin II AT<sup>1</sup> receptor antagonist irbesartan prevents thromboxane A<sub>2</sub>-induced vasoconstriction in canine coronary arteries and human platelet aggregation. **J Pharmacol Exp Ther**, 2000. 292(1):238-46.
27. Schwemmer M., Sommer O., Basseng E. Angiotensin receptor blocker losartan supresses platelet activity by interfering with thromboxane signaling. **Cardiovas Drugs Ther**, 2001. 15:301-307.
28. Montón M., Jimenez A., Nunez A., López-Blaya A., Farré J., Gómez J., Zalba L.R.; de Miguel L.S., Casado S., López-Farré A. Comparative effects of angiotensin II AT-1-Type receptor antagonists in vitro on human platelet activation. **J Cardiovasc Pharmacol**, 2000. 35(6):906-13.
29. Kalinowski L., Matys T., Chabielska E., Bucsko W., Malinski T. Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor antagonists inhibit platelet adhesion and aggregation by nitric oxide release. **Hypertension**, 2002. 40:521-27.
30. Kucharewicz I., Pawlak R., Matys T., Pawlak D., Buczko W. Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). **Hypertension**, 2002. 40:774-79.
31. Yang B.C., Phillips M.I., Mohuczy D., Meng H., Shen L., Mehta P., Mehta J.L. Increased angiotensin II type 1 receptor expression in hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 1998. 18:1433-39.

32. Daugherty A., Rateri D.L., Lu H., Inagami T., Cassis L.A. Hypercholesterolemia stimulates angiotensin peptide synthesis and contributes to atherosclerosis through the AT<sub>1A</sub> receptor. **Circulation**, 2004. 110:3849-57.
33. Hoshida S., Nishida M., Igarashi J., Aoki K., Hori M., Kuzuya T., Tada M. Vascular angiotensin-converting enzyme activity in cholesterol-fed rabbits: effects of enalapril. **Atherosclerosis**, 1997. 130: 53-59.
34. Hernandez A., Barberi L., Ballerio R., Testini A., Ferioli R., Bolla M., Natali M., Folco G., Catapano A.L. Delapril slows the progression of atherosclerosis and maintains endothelial function in cholesterol-fed rabbits. **Atherosclerosis**, 1998. 137:71-76.
35. Miyazaki M., Sakonjo H., Takai S. Anti-atherosclerotic effects of an angiotensin converting enzyme inhibitor and an angiotensin II antagonist in *Cynomolgus* monkeys fed a high-cholesterol diet. **Br J Pharmacol**, 1999. 128:523-29.
36. Song K., Shiota N., Takai S., Takashima H., Iwasaki H., Kim S., Miyazaki M. Induction of angiotensin converting enzyme and angiotensin II receptors in the atherosclerotic aorta of high-cholesterol fed *Cynomolgus* monkeys. **Atherosclerosis**, 1998. 138:171-82.
37. Strawn W.B., Chapple M.C., Dean R.H., Kivlighn S., Ferrario C.M. Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia. **Circulation**, 2000. 101:1586-93.
38. Hope S., Brecher P., Chobaniam A.P. Comparison of the effects of AT<sub>1</sub>

receptor blockade and angiotensin converting enzyme inhibition on atherosclerosis. **Am J Hypertens**, 1999. 12:28-34.

39. de las Heras N., Arangoncillo P., Maeso R., Vazquez-Pérez S., Navarro-Cid J., DeGasparo M., Mann J., Ruilope L.M., Cachofeiro V., Lahera V. AT<sub>1</sub> receptor antagonism reduces endothelial dysfunction and intimal thickening in atherosclerotic rabbits. **Hypertension**, 1999. 34:969-75.
40. Li D.Y., Zhang Y.C., Philips M.I., Sawamura T., Mehta J.L. Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation. **Circ Res**, 1999. 84:1043-49.
41. Keidar S., Kaplan M., Hoffman A., Aviram M. Angiotensin II stimulates macrophage-mediated oxidation of low density lipoproteins. **Atherosclerosis**, 1995. 115:201-15.
42. Muller D.N., Dechend R., Mervaala E.M.A., Park J.K., Schmidt F., Fiebeler A., Theuer J., Breu V., Ganten D., Haller H., Luft F.C. NF-kB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. **Hypertension**, 2000. 35:193-201.
43. Barnes P.J., Karin M. Mechanisms of Disease: Nuclear factor-kappa B - a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Eng J Med**, 1997. 336(15):1066-71.
44. Warnholtz A., Nickenig G., Schulz E., Macharzina R., Brasen J.H., Skatchkov M., Heitzer T., Stasch J.P., Griendling K.K., Harrison D.G., Bohm M., Meinertz T., Munzel T. Increased NADH-oxidase-mediated

superoxide production in the early stages of atherosclerosis. **Circulation**, 1999. 99:2027-33.

45. Aikawa M., Sugiyama S., Hill C.C., Voglic S.J., Rabkin E., Fukumoto Y., Schoen F.J., Witztum J.L., Libby P. Lipid lowering reduces oxidative stress and endothelial cell activation in rabbit atheroma. **Circulation**, 2002. 106:1390-96.
46. Morawietz H., Rueckschloss U., Niemann B., Duerrschmidt N., Galle J., Hakim K., Zerkowski H.R., Sawamura T., Holtz J. Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. **Circulation**, 1999;100:899-902.