

Maysa Dutra de Moura

Papel do flavonóide diocleína no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos deficientes no gene que codifica a apolipoproteína E

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2006

Maysa Dutra de Moura

Papel do flavonóide diocleína no desenvolvimento de aterosclerose em camundongos deficientes no gene que codifica a apolipoproteína E

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Dr^a. Jacqueline Isaura Alvarez Leite

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2006

Nome do Mestrando: Maysa Dutra de Moura

Nome do Orientador: Dr^a. Jacqueline I. Alvarez-Leite

Linha de Pesquisa do PPGA:
Nutrição, alimentação e saúde

Áreas de conhecimento (CNPq/CAPES)
5.07.01.00-2 – Ciência de Alimentos
5.07.01.01-0 – Valor Nutritivo de Alimentos

Instituições Participantes:
Instituto de Ciências Biológicas / UFMG

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Jacqueline I. Alvarez-Leite, pela oportunidade, credibilidade e confiança, que foram fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal. Sem a sua contribuição e ajuda este trabalho não teria se realizado e meu sonho não teria se concretizado.

À professora Renata Nascimento Freitas, com quem convivi e trabalhei durante minha graduação. Muito obrigada pelo grande incentivo e pela boa vontade que sempre teve em me ajudar!

Ao Daniel Cruz Bretas, que acreditando na minha competência, ajudou-me a dar mais esse passo. Obrigada por ter me possibilitado conquistar este sonho!

À Luciane Portugal, Luciana Fernandes, Érica Leandro e Luciano Alex, pelas inúmeras vezes que se deslocaram de suas casas aos fins-de-semana para me ajudarem com o tratamento experimental. Se não fosse pela boa vontade de todos vocês, este trabalho teria sido muito mais difícil e cansativo.

À Juliana Lauar que com sua prática e conhecimento, contribuiu muito para obtenção dos meus resultados.

Ao Laboratório de Bioquímica Nutricional, onde foi possível aprender a trabalhar em grupo e crescer como profissional. Obrigada a todos pelo apoio e pela convivência agradável do dia a dia.

À Maria Helena que sempre desempenha seu trabalho com muita competência e responsabilidade. Obrigada por sempre cuidar com tanto carinho do Biotério e dos nossos camundongos.

Ao IMPAR por sempre se colocar a nossa disposição e ao Laboratório de Neurociência por disponibilizar o micrótomo.

À coordenação e aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, pela realização desse curso.

Ao CNPQ, pela ajuda financeira que me foi concedida.

Aos meus pais e irmãos, que mesmo distantes sempre se fizeram presentes nos momentos mais difíceis. Obrigada pelo amor e carinho durante essa caminhada.

E, por fim, agradeço a Deus pela oportunidade da vida.

*“Não há maior crime que matar um sonho,
Nem maior virtude do que realizá-lo.”*

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 - Metabolismo de lipídeos e lipoproteínas plasmáticas:.....	19
2.2.1 - Patogênese da Aterosclerose:.....	24
2.3 - Aterosclerose em modelos murinos:	30
2.3.1. Camundongos LDLR ^{-/-} :	30
2.3.2. Camundongos apoE ^{-/-} :	31
2.4 - Endotélio vascular e aterosclerose:	32
2.5 - Radicais livres e sistema antioxidante na aterosclerose:	33
2.6 - Flavonóides:	35
2.7 - O Flavonóide diocleína:	37
3. OBJETIVOS	39
3.1 - Objetivo geral:	39
3.2 - Objetivos específicos:	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 - Modelos animais:	41
4.2 - Separação dos animais em grupos:	41
4.3 - Utilização do flavonóide diocleína:.....	42
4.4 - Amostras de sangue e sacrifício dos camundongos:.....	42
4.5 - Determinação dos níveis de colesterol total:	43

4.6 - Determinação dos níveis de triglicerídeos:	44
4.7 - Quantificação dos níveis de lipídeos hepáticos e colesterol hepático:	44
4.8 - Quantificação dos níveis de lipídeos cecais e colesterol cecal:	45
4.9 - Avaliação da atividade antioxidante do flavonóide diocleína através da mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):	45
4.10 - Dosagem da concentração de hidroperóxidos pelo ensaio da oxidação ferrosa do xilenol orange:	46
4.11 - Análise histopatológica e morfométrica das lesões ateroscleróticas presentes na raiz da aorta:	48
4.12 - Quantificação das lesões ateroscleróticas presentes na aorta torácica e abdominal:	49
4.13 - Avaliação da quantidade de células inflamatórias e colágeno presentes nas lesões ateroscleróticas:	49
4.14 - Análise estatística dos dados:	50
5. RESULTADOS	51
5.1 - Crescimento ponderal dos animais:	51
5.2 – Níveis de colesterol total e triglicerídeos de camundongos apoE^{-/-} tratados ou não com o flavonóide diocleína:	52
5.3 – Níveis de lipídeos e colesterol total hepático e cecal de camundongos apoE^{-/-} tratados ou não com o flavonóide diocleína:	54
5.3.1 - Lipídeos e colesterol total hepático:.....	54
5.3.2 – Lipídeos cecais e colesterol (3-alfa-hidróxi-esteróides) cecal:	54
5.4 – Peroxidação lipídica hepática e renal:	57
5.4.1 – Produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico:	57
5.4.2 – Avaliação da concentração de hidroperóxidos:.....	58
5.5 - Lesão aterosclerótica:	59
5.5.1 - Aorta torácica e abdominal:	59
5.5.2 - Válvula aórtica:	59
5.6 – Quantificação do infiltrado inflamatório nas lesões ateroscleróticas:	62
5.7 - Quantificação de colágeno nas lesões ateroscleróticas:	64
6. DISCUSSÃO:	65
7. CONCLUSÃO:	71

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....72

9. ANEXO:..... 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das lipoproteínas plasmáticas	20
Tabela 2 - Fatores de risco para Aterosclerose e seus respectivos processos patogênicos	23
Tabela 3 - Preparo das soluções necessárias para a dosagem de hidroperóxidos em amostras de fígado e rim	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Metabolismo de lipoproteínas.....	22
Figura 2 – Desenvolvimento de estria gordurosa	27
Figura 3 – Progressão da lesão aterosclerótica.....	27
Figura 4 – Composição celular da placa aterosclerótica	29
Figura 5 – Ativação da placa, ruptura e trombose	29
Figura 6 – Formação simplificada de espécies reativas a partir de oxigênio triplete.....	33
Figura 7 – Estrutura química da diocleína	38
Figura 8 – A: Flor da <i>Dioclea grandiflora</i> e B: Semente da <i>Dioclea grandiflora</i>	38
Figura 9 – Crescimento ponderal dos camundongos apoE ^{-/-} tratados ou não com diocleína	51
Figura 10 – Níveis plasmáticos e séricos de colesterol total de camundongos apoE ^{-/-} controles e tratados com diocleína	53
Figura 11 - Níveis plasmáticos e séricos de triglicerídeos de camundongos apoE ^{-/-} controles e tratados com diocleína	53
Figura 12 – Níveis de lipídeos totais hepáticos de camundongos apoE ^{-/-} controles e tratados com diocleína	55
Figura 13 – Níveis de colesterol total hepático de camundongos apoE ^{-/-} controles e tratados com diocleína	55
Figura 14 – Níveis de lipídeos totais cecais de camundongos apoE ^{-/-} controles e tratados com diocleína	56
Figura 15 – Níveis de 3-alfa-hidróxi-esteróides cecais de camundongos apoE ^{-/-} controles e tratados com diocleína.....	56
Figura 16 – Avaliação da presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em camundongos apoE ^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.....	57
Figura 17 A – Avaliação da concentração de hidroperóxidos no tecido hepático em camundongos apoE ^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.....	58
Figura 17B – Avaliação da concentração de hidroperóxidos no tecido renal em camundongos apoE ^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.....	58
Figura 18 – Porcentagem de deposição lipídica na aorta torácica e abdominal dos animais apoE ^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.....	60

Figura 19 – Aspecto morfológico da aorta torácica e abdominal de animais apoE ^{-/-}	60
Figura 20 – Área da lesão aterosclerótica na raiz aórtica dos animais apoE ^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.....	61
Figura 21 – Aspecto histológico (H&E) da raiz da aorta de animais apoE ^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.....	61
Figura 22 – Número de lesões na raiz aórtica dos animais apoE ^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.....	62
Figura 23 – Infiltrado inflamatório das lesões na raiz aórtica de animais apoE ^{-/-} controle e tratados com diocleína por seis semanas.....	63
Figura 24 – Aspecto histológico (H&E) do infiltrado inflamatório das lesões de animais apoE ^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.....	63
Figura 25 – Quantidade de colágeno das lesões na raiz aórtica de animais apoE ^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.....	64
Figura 26 – Aspecto histológico do conteúdo de colágeno de animais apoE ^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA - 1	Cassete de transporte -1 ligado a adenosina trifosfato
apoA-I	Apolipoproteína A-I
apoA-II	Apolipoproteína A-II
apoB	Apolipoproteína B
apoB-100	Apolipoproteína B-100
apoB-48	Apolipoproteína B-48
apoC-II	Apolipoproteína C-II
apoE	Apolipoproteína E
apoE ^{-/-}	Deficiência para apoE
BH2	Dihidrobiopterina
BH4	Tetrahidrobiopterina
BHT	Butil hidroxitolueno
CAT	Catalase
cDNA	DNA complementar
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CuSO4	Sulfato de Cobre
CETP	Proteína de transferência de éster de colesterol
DCV	Doenças cardiovasculares
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECs	Células endoteliais
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
E.L.I.S.A.	Ensaio imuno adsorvente ligado à enzima
eNOs	Óxido nítrico sintase endotelial
GSH	Glutationa
GSH-Px	Glutationa peroxidase
H&E	Hematoxilina e eosina
HCl	Ácido clorídrico

H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	Hidroximetil glutaril-CoA
HNO ₂	Ácido nitroso
ICAM-1	Molécula-1 de adesão intercelular
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IFN- γ	Interferon-gama
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLR	Receptor para LDL
Lp(a)	Lipoproteína a
LPL	Lipase lipoprotéica
MCP-1	Proteína-1 quimiotática para monócitos
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófago
MDA	Malonildialdeído
mmLDL	LDL minimamente modificada
MMPs	Metaloproteinases de matriz
mRNA	RNA mensageiro
nm	Nanômetro
N ₂ O ₃	Óxido nitroso
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NO [•]	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ^{-•}	Ânion superóxido
³ O ₂	Oxigênio triplete
OH [•]	Radical hidroxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
ox-LDL	LDL oxidada
PBS	Solução salina tamponada com fosfato

PGI ₂	Prostaciclina
QM	Quilomícrons
RLDL ^{-/-}	Deficiência para o receptor de LDL
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
SRA -1	Receptor <i>scavenger</i> -A I
SMCs	Células musculares lisas
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Triglicerídeos
Th1	Resposta celular do tipo 1
Th2	Resposta celular do tipo 2
TNF- α	Fator-alfa de necrose tumoral
TPP	Trifenilfosfina
VCAM-1	Molécula-1 de adesão da célula vascular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica e progressiva, caracterizada por distúrbios do metabolismo lipídico, com presença de células e elementos fibrosos nas grandes e médias artérias. A perda ou prejuízo das funções exercidas pelo endotélio vascular e o aumento na produção de radicais livres são fatores importantes para a doença aterosclerótica. Os flavonóides são compostos naturais polifenólicos com pronunciada atividade antioxidante sobre a LDL e conseqüente inibição das lesões ateroscleróticas, demonstrando perfil adequado para a terapia anti-aterogênica. Este trabalho tem por objetivo investigar o papel do tratamento crônico com a diocleína, um flavonóide extraído da planta *Dioclea grandiflora*, nos principais eventos que desencadeiam o processo aterosclerótico em camundongos apoE^{-/-}. Os animais apoE^{-/-} machos com idade inicial de aproximadamente oito semanas foram alimentados com dieta comercial e divididos em dois grupos experimentais: grupo tratado que recebeu injeções intraperitoniais de diocleína na dose de 4 mg/kg de peso corporal/dia durante seis semanas e o grupo controle que recebeu somente o veículo. Nossos resultados mostraram que o tratamento por seis semanas com o flavonóide diocleína não alterou o perfil lipídico dos animais, além de não ser eficiente contra a peroxidação lipídica no fígado e no rim. Em relação à aterogênese, os dois grupos experimentais mostraram similaridade no tamanho das lesões ateroscleróticas e quando avaliamos a instabilidade das lesões, através do conteúdo de colágeno e quantidade de células inflamatórias, também não observamos efeitos positivos nos animais que receberam a diocleína. Dessa forma, é possível concluir que nas condições experimentais que foram utilizadas neste trabalho a diocleína não apresentou atividade antioxidante suficiente para contrapor ao estresse oxidativo típico do camundongo apoE^{-/-} e, conseqüentemente, não foi eficiente em retardar o processo da aterogênese.

Palavras chaves: Aterosclerose; Flavonóides; *Dioclea grandiflora*; Polifenóis.

ABSTRACT

Atherosclerosis is a chronic inflammatory and progressive disease, characterized by the accumulation of lipid and migration of inflammatory cells to the intima of medium and large arteries. Oxidative stress and endothelium activation are also important factors in atherosclerotic diseases. Flavonoids are natural polyphenolic compounds which has antioxidant activity related to reduction of oxidative stress and, consequently, of atherogenesis. For this reason they are potential prophylactic and therapeutic agents in the treatment of atherosclerosis. In the present study we investigated the effect of chronic administration of dioclein, a flavonoid extracted from *Dioclea grandiflora*, in the main events related to atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice (apoE^{-/-}). Male mice with 8-week-old were fed on chow diet and received dioclein (4 mg/kg/daily *i.p.*) or vehicle during six weeks. The results showed that the treatment with flavonoid dioclein was not related to any alterations on lipidic profile as well as lipid peroxidation in liver and kidney. Regarding atherogenesis, dioclein treatment was not able to reduce lesion area in aortic valve, as well as improve plaque stability as suggested by the results of collagen staining and inflammatory cells in the lesions. In conclusion, our data did not support a positive effect of the flavonoid dioclein on oxidative stress as well as on atherosclerosis development in apoE^{-/-} mice.

Key-words: Atherosclerosis, *Dioclea grandiflora*, Polyphenols

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV), incluindo doenças arteriais coronarianas, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio e hipertensão arterial sistêmica, constituem, atualmente, importantes patologias que acometem grande parte da população. De acordo com estimativas recentes da organização mundial de saúde, em 2002, aproximadamente um terço de todas as mortes (16,7 milhões de pessoas) em torno do mundo resultaram das doenças cardiovasculares (WHO, 2006).

Durante os últimos 30 anos presenciou-se um declínio razoável da mortalidade por causas cardiovasculares em países desenvolvidos, enquanto que elevações relativamente rápidas e substanciais têm ocorrido em países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil é um dos representantes. Em 2010 é estimado que as DCV sejam as principais causas de morte nos países em desenvolvimento e caso medidas preventivas efetivas não sejam tomadas, prevê-se uma verdadeira epidemia de doença cardiovascular com conseqüências desastrosas para a saúde pública (WHO, 2006; III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemia, 2001).

O ônus econômico das doenças cardiovasculares tem crescido exponencialmente nas últimas décadas. Em 2000, as doenças cardiovasculares foram responsáveis pela principal alocação de recursos públicos em hospitalizações no Brasil, sendo a terceira causa de permanência hospitalar prolongada. No período entre 1991 e 2000, os custos hospitalares atribuídos às doenças cardiovasculares aumentaram 176%. Esse aumento nos custos na área de saúde é universal e diversos países estão buscando racionalizar os recursos disponíveis com o risco iminente de que parte da população não se beneficie pela falta de recursos ou distribuição e alocação inadequada (III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemia, 2001).

A maioria das doenças cardiovasculares é resultante de complicações da aterosclerose, a qual é caracterizada, essencialmente, pelo desenvolvimento de uma lesão na parede arterial. A aterosclerose desenvolve-se lentamente iniciando-se nos primeiros anos de vida e, podendo culminar, posteriormente, em graves complicações clínicas, como ulcerações e rupturas, que podem evoluir para oclusões agudas trombóticas, contribuindo com alta morbidade e mortalidade. Embora o processo aterosclerótico seja característico da

camada íntima das grandes e médias artérias, inúmeras alterações ocorrem também na microcirculação, primariamente decorrentes de alterações na função endotelial (Witzum e Steinberg, 1991; Shimokawa, 1999).

Um importante evento que inicia o processo aterosclerótico é o transporte de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), através do endotélio, para dentro da parede arterial. Uma vez presente na camada íntima da artéria, a LDL poderá ser oxidada e, posteriormente, captada por macrófagos, formando as *foam cells* (células espumosas), que são as unidades formadoras da aterosclerose (Mandamanchi *et al.*, 2005). A hipótese oxidativa da aterosclerose tem, cada vez mais, contribuído para o estudo de substâncias com atividade antioxidante, as quais poderiam agir na prevenção do estresse oxidativo, reduzindo assim a oxidação da LDL e, conseqüentemente, inibindo o desenvolvimento da aterosclerose (Fuhrman *et al.*, 2005.)

Os flavonóides são compostos naturais amplamente encontrados em frutas e vegetais. Por possuírem uma atividade antioxidante pronunciada sobre a LDL e conseqüente ação inibidora sobre a formação da placa ateromatosa, estas substâncias apresentam o perfil adequado para a terapia da doença aterosclerótica. Atualmente, os flavonóides aparecem como excelentes candidatos em pesquisa, uma vez que são capazes de atenuar o estresse oxidativo em doenças como o câncer, diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas, aterosclerose, entre outras (Schramm e German, 1998; Harborne e Willians, 2000; Middleton *et al.*, 2000).

A diocleína é um flavonóide extraído da planta *Dioclea grandiflora*, típica do nordeste brasileiro, popularmente conhecida como mucunã e olho de boi. A diocleína é bastante difundida na medicina popular, uma vez que a infusão das raízes da planta é utilizada para o tratamento de patologias renais e desordens da próstata e suas sementes são consumidas na dieta humana em regiões de caatinga brasileira. Dessa forma, parece especialmente útil o estudo deste flavonóide com o intuito de avaliar suas propriedades, principalmente no que diz respeito à capacidade antioxidante e no desenvolvimento da aterosclerose.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Metabolismo de lipídeos e lipoproteínas plasmáticas:

As espécies moleculares de lipídeos presentes no plasma, mais importantes do ponto de vista fisiológico e clínico, são os ácidos graxos, os triglicerídeos, os fosfolipídeos e o colesterol. Os ácidos graxos podem ser saturados, mono ou poliinsaturados, os triglicerídeos são as formas de armazenamento energético mais importante no organismo, os fosfolipídeos têm, entre outras funções, formar a bicamada lipídica que é a estrutura básica das membranas celulares e o colesterol é precursor dos hormônios esteróides, dos ácidos biliares e da vitamina D, além de ter importantes funções nas membranas celulares, influenciando a sua fluidez e o estado de ativação de enzimas ligadas a membranas.

As lipoproteínas plasmáticas são moléculas formadas de lipídeos (principalmente fosfolipídeos, colesterol livre, ésteres de colesterol e triglicerídeos) e proteínas específicas denominadas de apolipoproteínas. Estas partículas estão em constante estado de síntese, degradação e remoção no plasma, tendo uma grande importância biológica, não somente no transporte de lipídeos, mas também no envolvimento em processos diversos como reações imunes, coagulação sanguínea e reparo de tecidos (Ross, 1995).

De acordo com sua origem, composição, densidade e tamanho, as lipoproteínas podem ser classificadas em: quilomícrons (QM), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Rader e Wilson, 1995).

Outra lipoproteína muito estudada que não se encaixa na classificação acima é a lipoproteína (a). Esta lipoproteína é uma partícula semelhante à LDL que contém uma glicoproteína adicional, denominada apolipoproteína (a), acoplada à apoB através de ligações dissulfeto. Aparentemente, a lipoproteína (a) não tem nenhuma função no transporte de lipídeos e sua ausência não acarreta transtornos metabólicos. Entretanto, a presença da glicoproteína adicional confere a lipoproteína (a) propriedades pró-aterogênicas, representando assim um fator de risco independente para a aterosclerose (Klausen *et al.*, 1997). A tabela 1 mostra algumas características das lipoproteínas plasmáticas, como

origem, densidade, tamanho, concentrações de colesterol e triglicerídeos, bem como as principais apolipoproteínas.

Tabela 1: Características das lipoproteínas plasmáticas.

Lipoproteína	Origem	Densidade (g/ml)	Tamanho (nm)	Concentração Plasmática de Colesterol (mmol/L) ^a	Concentração Plasmática de Triglicerídeos (mmol/L) ^b	Apolipoproteínas
Quilomícron	Intestino	>0,95	100 - 1000	0,0	0,0	B-48
VLDL	Fígado	>1,006	40 - 50	0,1 - 0,4	0,2 - 1,2	B-100
IDL	VLDL	1,006 - 1,019	25 - 30	0,1 - 0,3	0,1 - 0,3	B-100, E
LDL	IDL	1,019 - 1,063	20 - 25	1,5 - 3,5	0,2 - 0,4	B-100
HDL	Tecidos	1,063 - 1,210	6 - 10	0,9 - 1,6	0,1 - 0,2	A-I
Lp (a)	Fígado	1,051 - 1,082	25			B-100, (a)

a = para ml/dL, multiplicar por 38,6, b = para ml/dL, multiplicar por 88,5

Fonte: Genest, 2003.

No metabolismo das lipoproteínas, mostrado na figura 1, os lipídeos provenientes da dieta, após sofrerem os processos de digestão e absorção, são transportados pelos quilomícrons, os quais são formados na mucosa intestinal e contém apoB-48, apoE e apoC-II como principais apolipoproteínas. Uma vez sintetizados, os QM são lançados na linfa intestinal atingindo a circulação sistêmica através do ducto torácico, sofrendo a ação da enzima lipase lipoprotéica (LPL) que se encontra aderida à membrana basal das células endoteliais dos capilares sanguíneos. Esta enzima é ativada pela presença da apoC-II nas partículas de QM e hidrolisa os triglicerídeos liberando ácidos graxos livres, que podem ser utilizados como fonte de energia para as células ou para nova síntese de triglicerídeos no tecido adiposo. Após sofrerem a ação da LPL, os quilomícrons resultantes, então chamados de remanescentes, são removidos da circulação pelo fígado por um processo que envolve a ligação da apoE com o seu receptor hepático (Alvarez-Leite e Peluzio, 2003; Rader e Wilson, 1995; Scartezini *et al.*, 1997).

O fígado “re-empacota” os lipídeos e os secreta diretamente no sangue na forma de VLDL, lipoproteínas ricas em triglicerídeos e cuja função é transportar este lipídeo aos tecidos periféricos. As VLDLs são liberadas pelo fígado como partículas nascentes contendo

apoB-100 como principal apolipoproteína, e da mesma forma que acontece com os quilomícrons, estas lipoproteínas sofrem a ação da enzima LPL, que hidrolisa os triglicerídeos originando um remanescente mais denso, a IDL. Esta contém quantidades iguais de triglicerídeos e colesterol e possui na sua superfície apoB-100 e apoE como principais apolipoproteínas. A IDL, uma vez formada, segue dois destinos: é captada da circulação pelo fígado, através da ligação das apolipoproteínas com receptores hepáticos ou pode ser processada pela lipase hepática transformando-se em LDL (Alvarez-Leite e Peluzio, 2003; Rader e Wilson, 1995). A LDL tem como principal função transportar o colesterol do fígado para os tecidos extra-hepáticos, cujas membranas apresentam os receptores B/E que reconhecem a apoB-100 presente na superfície da LDL. Além disso, quantidades significativas de LDL podem ser removidas da circulação pelo fígado, também pela interação do receptor B/E com apoB-100. Quando a demanda de colesterol pelas células é alta, os receptores B/E são ativados para aumentar a captação da LDL. Inversamente, quando a célula está repleta de colesterol, o mecanismo de regulação negativa do receptor protege-a contra os efeitos deletérios da acumulação deste lipídeo (Cobbe e Shepherd, 1993).

Não existe uma via de catabolismo de colesterol, sendo este eliminado pelo fígado como sais biliares que são secretados pela bile. O “transporte reverso de colesterol” consiste na remoção do excesso de colesterol livre dos tecidos periféricos e subsequente depósito no fígado para secreção. Este processo é mediado pela HDL que contém na sua superfície apoA-I e apoA-II como principais apolipoproteínas. O colesterol livre, em contato com HDL nascente, é substrato para a enzima plasmática lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT), resultando na formação de ésteres de colesterol e aumento do tamanho da partícula de HDL. Os ésteres de colesterol podem ser transferidos para as lipoproteínas que contêm apoB, como a LDL, pela proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) e em seguida retornar para o fígado via receptor de LDL. A HDL ainda pode liberar colesterol diretamente para o fígado (Alvarez-Leite e Peluzio, 2003; Rader e Wilson, 1995).

A aterosclerose é caracterizada, essencialmente, pelo desenvolvimento de uma lesão na parede arterial, a qual é proveniente do acúmulo de lipídeos oxidados na camada íntima da artéria. Dessa forma, dependendo da composição e das propriedades fisiológicas desempenhadas pelas lipoproteínas, elas podem ser classificadas em aterogênica ou anti-aterogênica. Além do papel protetor que a HDL exerce sobre o “transporte reverso de colesterol”, esta lipoproteína atua também como antioxidante, contribuindo ainda mais para sua propriedade anti-aterogênica. Já a LDL é considerada uma lipoproteína aterogênica, uma

vez que funciona como fonte de colesterol para os tecidos periféricos. O sistema de liberação do colesterol pela LDL é controlado de forma a satisfazer as necessidades celulares, porém falhas nesta regulação podem contribuir para aumentar os níveis plasmáticos de LDL e assim, contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose.

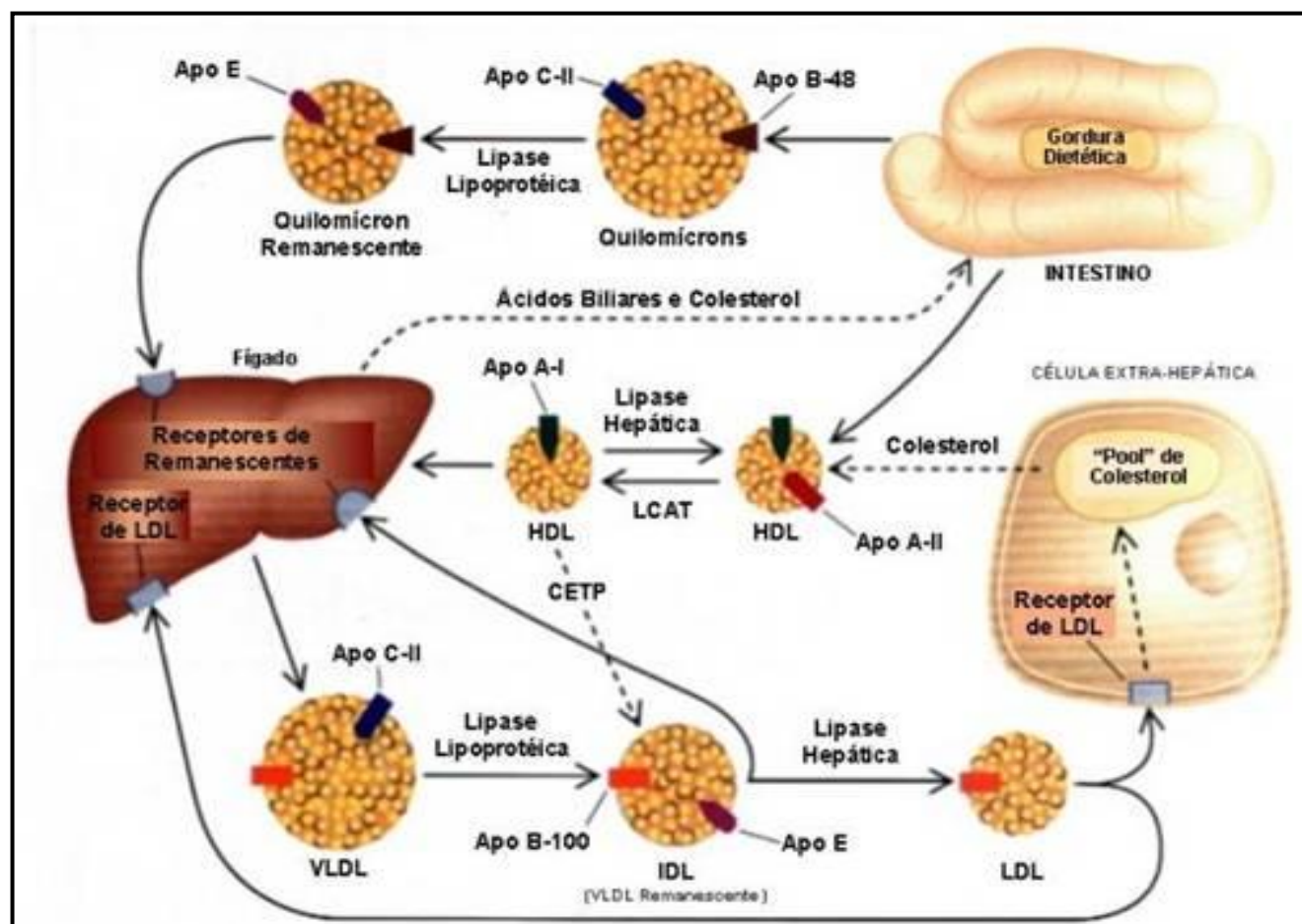


Figura 1: Metabolismo de lipoproteínas.

Os lipídeos da dieta são absorvidos pelo intestino e transportados pelos QMs que contém apoB-48. A lipase lipoprotéica (LPL), ativada pela apoC-II hidrolisa os QMs gerando partículas remanescentes que são captadas pelo fígado através da ligação da apoE com seu receptor hepático. O fígado secreta os lipídeos na forma de VLDL que contém apoB-100. A VLDL também é hidrolisada pela LPL com formação de IDL, a qual pode ser captada pelo fígado ou transformada em LDL pela ação da lipase hepática. O fígado e os tecidos periféricos removem a LDL da circulação pela interação da apoB-100 com seu receptor. A HDL age na remoção do excesso de colesterol das células periféricas para o fígado para a excreção na bile. O metabolismo das lipoproteínas está mostrado por linhas sólidas e o transporte de colesterol, quando não contido nas lipoproteínas, está indicado por linhas pontilhadas. VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; IDL: lipoproteína de densidade intermediária; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; LCAT: lecitina: colesterol acil:transferase; CETP: proteína de transferência de éster de colesterol; Apo B-100, Apo B-48, Apo E, Apo C-II, Apo A-I e Apo A-II: apolipoproteínas B-100, B-48, E, C-II, A-I e A-II, respectivamente.

Fonte: (Rader e Wilson, 1995).

2.2 - Aterosclerose:

A aterosclerose pode ser definida como um processo inflamatório crônico e degenerativo que acomete as grandes e médias artérias, sendo caracterizada pelo acúmulo, no espaço subendotelial da íntima, de lipídeos, células inflamatórias e elementos fibrosos. A aterosclerose pode se desenvolver em qualquer artéria, porém os vasos sanguíneos mais comumente afetados e de relevância clínica incluem a aorta e as artérias coronárias, carótidas e cerebrais (Lusis, 2000).

Diversos estudos epidemiológicos desenvolvidos ao longo dos anos passados revelaram uma importante associação entre os vários fatores genéticos e ambientais e a aterosclerose. Os principais fatores de riscos para aterosclerose estão descritos na tabela 2, os quais podem ser agrupados, em não modificáveis, modificáveis pelo estilo de vida, modificáveis pela ação de drogas e fatores de risco não-tradicionais (Scott J., 2004).

Tabela 2 - Fatores de risco para aterosclerose e seus respectivos processos patogênicos.

FATORES DE RISCO PARA ATEROSCLEROSE	
Fatores de risco	Processo patogênico
Não modificáveis	
Idade	
Etnia	
Gênero	
Genética	
Modificáveis pelo estilo de vida	
Alto consumo de gordura saturada e colesterol	Aumento sérico de colesterol
Baixo consumo de frutas, vegetais e fibras	Estresse Oxidativo
Obesidade	Síndrome metabólica
Cigarro	Estresse Oxidativo
Sedentarismo	Baixa perfusão / Alterações no perfil lipídico
Modificáveis pelo uso de drogas	
Dislipidemia	Estresse Oxidativo
Hipertensão	Estresse Oxidativo / Vasoconstrição
Não tradicionais	
Lipoproteína (a)	Trombogênese
Homocisteína	Estresse Oxidativo
Infecções	Inflamação
Lupus Eritematoso Sistêmico	Inflamação

2.2.1 - Patogênese da Aterosclerose:

O processo aterosclerótico localiza-se em pontos específicos da árvore vascular, ou seja, de acordo com diferenças na dinâmica do fluxo sanguíneo há regiões de preferência para a formação das lesões ateroscleróticas. A força de cisalhamento (*shear stress*) é definida como a força por unidade de área que age no endotélio como resultado do fluxo sanguíneo e tem um papel importante no desenvolvimento da disfunção endotelial e da aterosclerose. As regiões que apresentam *shear stress* reduzido, como as curvaturas das artérias coronárias, e as regiões que apresentam *shear stress* oscilatório e turbulento, como nas áreas de ramificações, apresentam um aumento no desenvolvimento da aterosclerose (Cheng *et al.*, 2006). As células endoteliais situadas em regiões tubulares, onde o fluxo sanguíneo permanece uniforme e laminar, apresentam formas elípticas e alinhadas na direção do fluxo, já as células situadas em regiões de bifurcação e curvatura, onde o fluxo é turbulento, apresentam formas poligonais e sem orientação, contribuindo para um aumento na permeabilidade à LDL, tornando-se, assim, locais de preferência para a formação das lesões ateroscleróticas (Lusis, 2000). Apesar das características hemodinâmicas terem um papel importante na localização das lesões, elas por si só não são suficientes para a gênese da aterosclerose (Vanderlaan *et al.*, 2004).

As grandes e médias artérias que constituem a árvore vascular são formadas por três camadas morfológicamente distintas, as quais podem ser definidas como:

- 1) *Camada Íntima*: Camada mais interna, constituída principalmente por proteoglicanos e colágeno. Apresenta no lado luminal uma monocamada de células endoteliais (ECs) e no lado periférico liga-se à lâmina interna elástica.
- 2) *Camada Média*: Camada intermediária, sendo constituída basicamente por células musculares lisas (SMCs).
- 3) *Camada Adventícia*: Camada mais externa, formada por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos responsáveis pela nutrição das demais camadas (Lusis, 2000).

O evento inicial da aterosclerose é o acúmulo de partículas de LDL na matriz subendotelial da camada íntima das artérias. Este acúmulo será maior quando os níveis de LDL circulante estiverem aumentados, e tanto o seu transporte através do endotélio como a sua retenção na íntima, será mais eficiente nos locais de maior suscetibilidade para formação da lesão (Lusis, 2000). Em contraste aos efeitos adversos de uma elevação de LDL, a

concentração de HDL correlaciona-se inversamente com o desenvolvimento com o desenvolvimento da aterosclerose (Barter, 2005).

A LDL presente na corrente sanguínea difunde-se passivamente por diapedese através das células endoteliais e sua retenção na parede do vaso parece envolver interações entre a apoB, que faz parte da sua constituição, e os proteoglicanos que estão presentes na camada íntima das artérias. Uma vez retida no espaço subendotelial, a LDL poderá ser quimicamente modificada contribuindo, assim, para o processo inflamatório. A modificação química mais significativa para o início da formação da lesão é a oxidação, com conseqüente formação da LDL oxidada (ox-LDL). A modificação oxidativa das partículas de LDL é resultado da ação de radicais livres e de certas enzimas, tais como mieloperoxidase, xantina oxidase, NADPH-oxidase, fosfolipases e outras lipases (Lusis, 2000). O estudo das propriedades específicas da LDL oxidada depende da extensão da sua modificação, a qual pode variar de uma modificação mínima (mmLDL), em que as partículas de LDL ainda são reconhecidas pelos receptores celulares de LDL, até uma oxidação extensa, na qual a apoB é fragmentada, e ao invés destas partículas serem reconhecidas pelos receptores de LDL, serão identificadas pelos receptores *scavenger* expressos pelos macrófagos (Glass *et al.*, 2001).

A ox-LDL estimula a camada de células endoteliais a produzir moléculas de adesão celular como VCAM-1 (molécula-1 de adesão da célula vascular), ICAM-1 (molécula-1 de adesão intercelular), fatores de crescimento, tal como M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófago) e proteínas quimiotáticas, como MCP-1 (proteína-1 quimiotática para monócitos), resultando na adesão e no recrutamento de monócitos e linfócitos circulantes para dentro da parede arterial (Lusis, 2000). Gu *et al.* (1998) e Boring *et al.* (1998), mostraram que camundongos deficientes em MCP-1 ou no seu receptor CCR2, o qual é expresso em monócitos, tiveram uma redução significativa nas lesões ateroscleróticas, sugerindo que a interação MCP-1 / CCR2 tem um papel fundamental no recrutamento de monócitos. Além da ox-LDL ser importante no tráfego de monócitos e linfócitos, ela pode ainda desempenhar outros efeitos, tais como a inibição da produção de NO[•] (óxido nítrico), um mediador químico como múltiplas propriedades anti-aterogênicas, incluindo relaxamento dos vasos sanguíneos (Lusis, 2000).

O primeiro passo para a adesão na superfície endotelial de monócitos e linfócitos é o rolamento dessas células, mediado por selectinas (P-selectina e E-selectina), com posterior recrutamento para a parede do vaso. Uma vez residentes na íntima arterial, os monócitos

adquirem as características morfológicas dos macrófagos, os quais captam as partículas de ox-LDL através de um grupo de receptores *scavenger* (SR-A e CD36), com conseqüente formação das *foam cells* (células espumosas). As *foam cells* apresentam como característica principal o acúmulo de lipídeos no seu interior e são as unidades formadoras da placa de ateroma, caracterizando assim as lesões iniciais do processo aterosclerótico.

Os macrófagos secretam várias citocinas, tais como TNF- α (fator-alfa de necrose tumoral) e IL-1 (interleucina-1) que também estimulam a expressão, pelas células endoteliais, das moléculas de adesão, favorecendo ainda mais o recrutamento dos monócitos e a produção ainda maior de *foam cells*. As citocinas como TNF- α e IFN- γ (interferon-gama), ainda são responsáveis por estimularem a expressão dos receptores *scavenger* presentes na superfície dos macrófagos (Barter, 2005; Lusis, 2000).

Uma vez que o conteúdo de colesterol internalizado pelos macrófagos não é controlado por *feedback* negativo, ocorre o acúmulo de células espumosas na camada íntima das artérias, o qual é denominado de estrias gordurosas. Em humanos, as estrias gordurosas são observadas já nas primeiras décadas de vida, porém não apresentam importância clínica significativa, mas são precursoras para a formação das lesões ateroscleróticas mais avançadas, conhecidas como placas fibrosas (Lusis, 2000).

A transição de estrias gordurosas relativamente simples até lesões ateroscleróticas mais complexas, é caracterizada pela apoptose das células espumosas e das SMCs, expondo o conteúdo rico em lipídeos, principalmente colesterol e seus ésteres, sendo este “centro necrótico” delimitado por uma capa fibrosa. Esta capa fibrosa é formada por matriz extracelular derivada das SMCs, as quais na presença de citocinas e fatores de crescimento secretados a partir da interação entre macrófagos e linfócitos T, migram a partir da camada média, proliferam e produzem matriz extracelular. As lesões fibrosas podem tornar-se altamente avançadas e complexas, com a presença de calcificação, erosão ou ulceração e hemorragia (Lusis, 2000). Nas figuras 2 e 3 é possível visualizar o desenvolvimento das estrias gordurosas e a evolução para lesões ateroscleróticas mais avançadas, respectivamente.

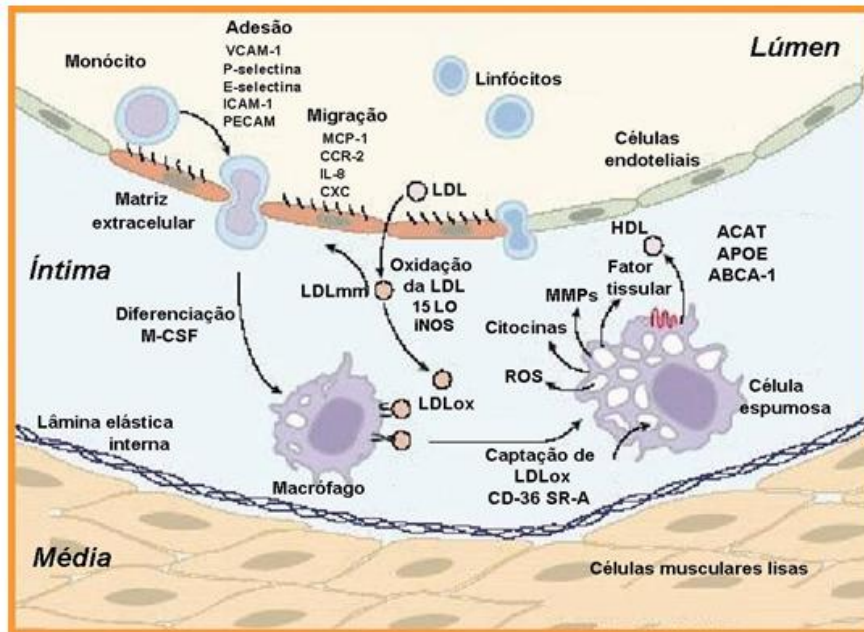


Figura 2: Desenvolvimento de estria gordurosa

A LDL é oxidada na íntima formando ox-LDL. As células endoteliais expressam moléculas de adesão, devido ao estímulo da ox-LDL e de citocinas inflamatórias. Os monócitos são recrutados para íntima e se diferenciam em macrófagos, que captam a ox-LDL via receptores *scavenger*, levando a formação das células espumosas. O colesterol presente na ox-LDL é sujeito a esterificação e é estocado em grânulos no interior dos macrófagos ou exportado a HDL extracelular, via transportadores, tais como ABC-A1. Fonte: (Glass *et al.*, 2001).

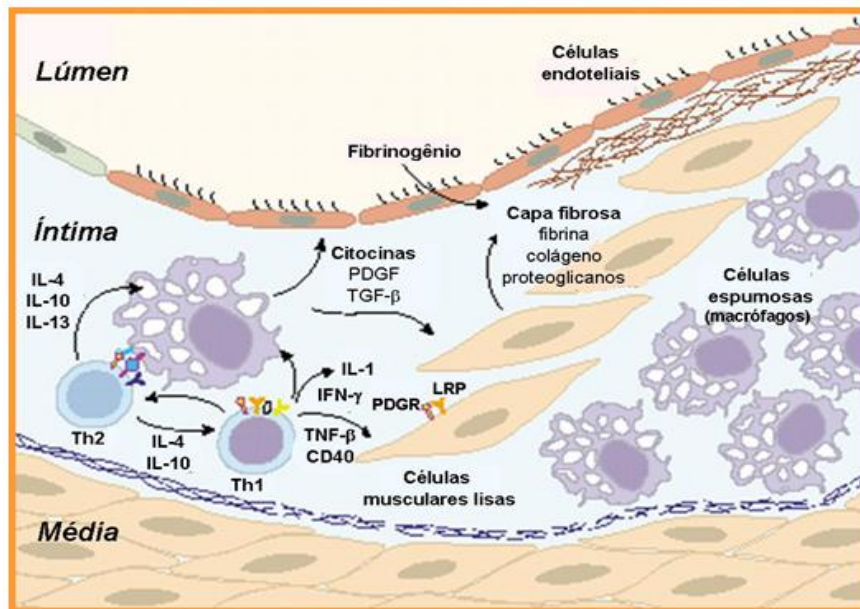


Figura 3: Progressão da lesão aterosclerótica.

A interação entre macrófagos e linfócitos T (Th1 e Th2) é responsável pela secreção de citocinas que exercem efeitos pró e anti-aterogênicos. As SMCs migram da camada média, proliferam e produzem matriz extracelular que formam a capa fibrosa. Fonte: (Glass *et al.*, 2001).

Embora as lesões ateroscleróticas avançadas possam tornar suficientemente grandes até o ponto de bloquear o fluxo sanguíneo, a complicação clínica mais significativa é o rompimento da capa fibrosa que recobre a lesão, com conseqüente formação de trombos ou coágulos, os quais poderão obstruir vasos de menor calibre resultando, por exemplo, em infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral ou acometimento dos membros inferiores. A ruptura da placa é uma complicação importante da aterosclerose e ocorre, principalmente, em lesões com presença de capa fibrosa fina, permitindo a exposição do seu conteúdo lipídico e do fator tecidual aos componentes do fluxo sanguíneo, promovendo então a cascata de coagulação, agregação plaquetária e trombose (Lusis, 2000).

O fator tecidual (FT) é uma glicoproteína transmembrana que inicia o processo de coagulação sanguínea, sendo um determinante crítico na formação do trombo. Em condições normais, as células endoteliais não expressam ou expressam quantidades mínimas de FT, entretanto em situações que ocorrem ativação ou disfunção endotelial a expressão do fator tecidual é aumentada significativamente, sendo associada com o desenvolvimento da aterosclerose (Yang, 2000). As MMPs (metaloproteinases de matriz) secretadas por macrófagos são detectadas nas regiões de rompimento das lesões e influenciam a estabilidade da placa, uma vez que promovem a degradação das proteínas presentes na matriz extracelular, contribuindo para o afinamento da capa fibrosa (Glass *et al.*, 2001).

Nas figuras 4 e 5 é possível visualizar a composição celular da placa aterosclerótica, bem como sua ativação, ruptura e formação do trombo.

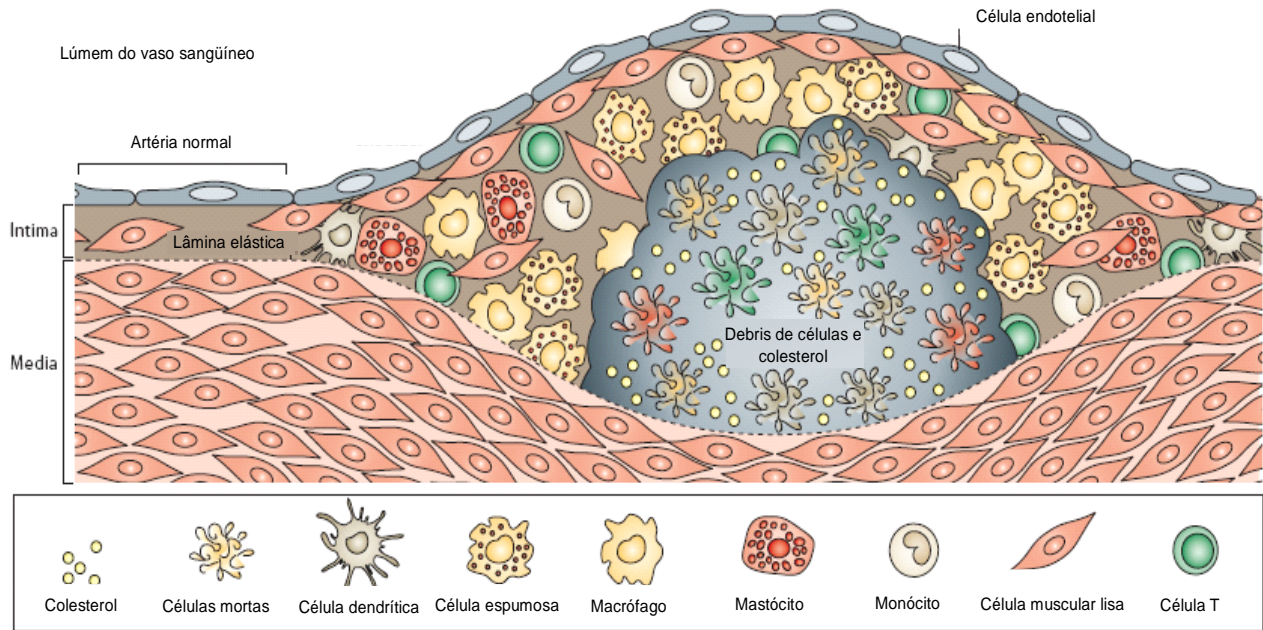


Figura 4: Composição celular da placa aterosclerótica.

Fonte: (Hansson e Libby, 2006).

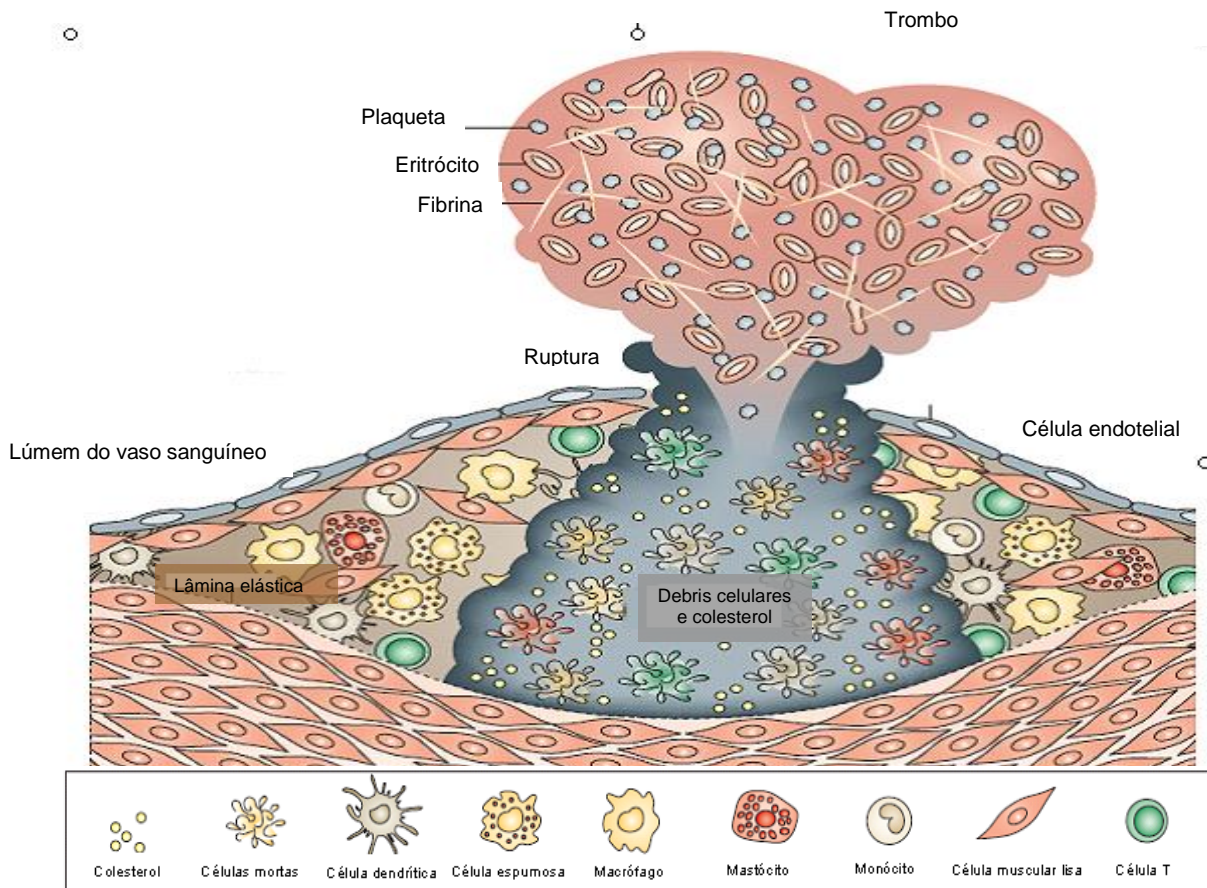


Figura 5: Ativação da placa, ruptura e trombose.

Fonte: (Hansson e Libby, 2006).

2.3 - Aterosclerose em modelos murinos:

Devido às grandes dificuldades em estudar os mecanismos patogênicos da aterosclerose em humanos, torna-se fundamental a presença de um modelo experimental bem caracterizado para tal patologia. Os camundongos selvagens são altamente resistentes ao desenvolvimento de aterosclerose. Em resposta a uma dieta com baixos níveis de lipídeos e colesterol, estes camundongos apresentam baixos níveis plasmáticos de colesterol em VLDL e LDL e a maioria do colesterol está na fração de HDL, explicando então a resistência desses animais ao desenvolvimento da aterosclerose. A HDL nos camundongos é responsável pelo transporte de mais de 85% do colesterol plasmático, enquanto que em humanos a principal lipoproteína transportadora de colesterol é a LDL (65-85%) (Hofker *et al.*, 1998; Breslow, 1996; Plump, *et al.*, 1992). Apesar destas diferenças, os camundongos possuem, com poucas exceções, o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo de lipoproteínas em seres humanos, e diante de facilidades como, rápida reprodução, conhecimento amplo da sua genética, formação relativamente rápida das lesões ateroscleróticas e pequeno tamanho dos animais, os camundongos emergiram, ao longo das décadas, como os melhores modelos experimentais para o estudo da aterosclerose (Vanderlaan *et al.*, 2004; Hofker *et al.*, 1998).

Os camundongos modificados geneticamente são gerados por modulação gênica, onde ocorre a deleção de um alelo específico responsável por codificar uma proteína com alto grau de especificidade. Esses animais são comumente referidos pelo termo coloquial de *Knockout*, sendo simbolizados por $-/-$. Os camundongos mais utilizados para o estudo da aterosclerose são gerados pela modulação genética da apoE (apolipoproteína E) e do LDLR (receptor para LDL), ambos fundamentais para o metabolismo lipídico (Daugherty, 2002).

2.3.1. Camundongos LDLR^{-/-}:

A deficiência dos receptores para a LDL em humanos leva a hipercolesterolemia familiar homocigótica, onde os níveis de LDL no plasma se aproximam de 1000 mg/dL, podendo causar um quadro de Infarto Agudo do Miocárdio durante a segunda década de vida (Fazio e Linton, 2001). Já em camundongos a deficiência para o receptor de LDL,

provoca apenas uma modesta hipercolesterolemia, com aumento dos níveis séricos das lipoproteínas aterogênicas LDL e IDL, não ocorrendo o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas quando alimentados com dieta comercial. Entretanto, quando os camundongos LDLR^{-/-} são alimentados com uma dieta aterogênica, com alto conteúdo de gordura saturada e colesterol, ocorre grande susceptibilidade à formação de lesões, as quais apresentam morfologia simples, consistindo predominantemente por macrófagos repletos de lipídeos. Algumas das características das lesões avançadas, como calcificação e núcleo necrótico, são vistas somente se esses camundongos forem alimentados com dieta aterogênica por um longo período (Daugherty, 2002).

2.3.2. Camundongos apoE^{-/-}:

A apoE é uma glicoproteína rica em arginina com peso molecular de 34 kdaltons, sintetizada principalmente no fígado e cérebro. Por ser um constituinte da superfície de lipoproteínas, principalmente VLDL, HDL e quilomícrons, a apoE desempenha um papel funcional no *clearance* das lipoproteínas plasmáticas (Davignon *et al.*, 1999).

A apoE também pode ser sintetizada por monócitos e macrófagos nos vasos sanguíneos, apresentando efeitos locais na homeostase do colesterol e nas reações inflamatórias que ocorrem nos vasos ateroscleróticos, devido ao seu papel na imunomodulação, que afeta a secreção de várias citocinas (Meir *et al.*, 2004). Além disso, a apoE inibe a agregação plaquetária, exerce efeitos antiproliferativos, contribui para o efluxo de colesterol das células nas lesões ateroscleróticas e possui propriedades antioxidantes (Davignon *et al.*, 1999). Em camundongos deficientes no gene que codifica a apolipoproteína E, ocorre o desenvolvimento prematuro e espontâneo de graves lesões ateroscleróticas. Quando esses animais são alimentados com dieta comercial normocolesterolêmica os níveis de colesterol total são maiores do que 500 mg/dL, constituindo principalmente de VLDL e frações de quilomícrons remanescentes, e na presença de dieta ocidental hipercolesterolêmica, essas frações são quadruplicadas. As lesões encontradas nesse modelo animal experimental apresentam um caráter bastante similar com as observadas em seres humanos. Com o uso de dieta comercial, a presença de células espumosas é vista com aproximadamente 10 semanas de idade, lesões intermediárias, contendo células espumosas e células musculares lisas, são observadas com 15 semanas e placas fibrosas

aparecem nos animais com 20 semanas de idade. O uso de dieta ocidental hipercolesterolêmica, promove a aceleração do processo aterosclerótico nos camundongos (Meir *et al.*, 2004).

2.4 - Endotélio vascular e aterosclerose:

Em condições fisiológicas, o endotélio contribui de forma significativa para a homeostase vascular, provocando alterações funcionais adaptativas através da liberação de várias substâncias com atividades pró e anticoagulantes, capazes de promover a adesão celular e com funções vasoativas (Bahia *et al.*, 2004). Sendo assim, acredita-se que o prejuízo na função endotelial é a manifestação inicial do processo aterogênico (Anderson *et al.*, 1995; Berliner *et al.*, 1995; Cascieri, 2002). Fatores relaxantes sintetizados e liberados pelo endotélio incluem o óxido nítrico (NO^{*}), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e as prostaciclina (PGI₂) (Rabelo *et al.*, 2003).

O NO^{*}, inicialmente descrito por Furchgott e Zawadzki em 1980, é sintetizado pelas células endoteliais a partir do aminoácido L-arginina em um processo catalisado pela óxido nítrico sintase (NOs). Já foram identificadas três isoformas distintas para NOs: NOs neuronal (nNOs ou tipo I), NOs indutível (iNOs ou tipo II) e NOs endotelial (eNOs ou tipo III) (Bahia *et al.*, 2004). Além de sua ação vasodilatadora, o NO^{*} inibe a adesão plaquetária, impede a proliferação das SMCs, limita o recrutamento vascular de leucócitos e inibe a produção do fator tecidual que é determinante crítico na geração do trombo (Bahia *et al.*, 2004).

A disfunção endotelial, caracterizada por diminuição da atividade biológica do NO^{*}, é uma etapa crítica da aterogênese e, sua avaliação é um marcador precoce do risco para aterosclerose. Vários fatores de risco associados com aterosclerose, tais como hiperlipidemia, diabetes, hipertensão arterial e tabagismo, estão relacionados com a disfunção endotelial (Kawashima e Yokoyama, 2004).

Radicais livres como os ânions superóxidos (O₂^{•-}) são produzidos durante a respiração celular e por uma variedade de enzimas, incluindo xantina oxidase, ciclooxigenase e NADPH oxidase, enzima que se encontra ligada à membrana das células, sendo a principal fonte de geração dos radicais superóxidos (Madamanchi, Vendrov e Runge, 2005). Em certas condições fisiológicas, por exemplo, na presença de substâncias em concentrações

reduzidas como a tetrahydrobiopterina (BH4), a enzima eNOs fica disfuncional e inicia a produção de ânions superóxido ao invés de NO[•]. A interação entre O₂^{•-} e NO[•] leva à formação de espécies reativas, tais como peroxinitrito (ONOO⁻), um potente oxidante capaz de oxidar rapidamente moléculas de BH4, transformando-as em sua forma inativa (BH2), e contribuindo ainda mais para o mau funcionamento da eNOs (Kawashima e Yokoyama, 2004). O peroxinitrito também tem a capacidade de oxidar partículas de LDL, causar disfunção endotelial e nitrificar os resíduos de tirosina de proteínas (Bahia *et al.*, 2004).

2.5 - Radicais livres e sistema antioxidante na aterosclerose:

Radical livre é qualquer espécie que possui um ou mais elétrons não-pareados em sua última camada eletrônica, tornando a espécie altamente reativa. Os elétrons tendem a ocorrer em pares e em rotação antiparalela, situação esta energeticamente favorável. O corpo humano produz naturalmente radicais livres durante seu metabolismo normal, como subprodutos da respiração e da síntese de moléculas mais complexas. Por exemplo, em torno de 85 a 90% do oxigênio que respiramos são utilizados pela mitocôndria, e o restante, por diversas enzimas, com formação de espécies altamente reativas (Araújo, 2001).

O oxigênio é uma molécula abundante em sistemas biológicos, sendo considerado um radical livre, pois apresenta dois elétrons não-pareados situados em orbitais diferentes e em rotação paralela (Madamanchi, Vendrov e Runge, 2005). Essencial ao processo de geração de energia, o oxigênio está presente na atmosfera em sua forma mais estável, sendo denominado oxigênio triplete (³O₂). Depois de inalado o oxigênio é gradualmente reduzido até que finalmente se transforme em água. Durante este processo, mostrado na figura 6, pequenas quantidades de intermediários reativos são formadas, tais como radical superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxil (OH[•]) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

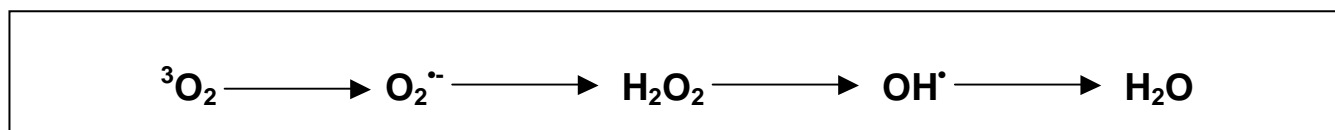


Figura 6: Formação simplificada de espécies reativas a partir do oxigênio triplete.

Fonte: (Araújo, 2001)

Especificamente, as espécies reativas de oxigênio (ROS) são um termo coletivo, que inclui tanto radicais de oxigênio, de nitrogênio, quanto certos não-radicaais, os quais são agentes oxidantes e facilmente convertidos em radicais. Exemplos de ROS são: HOCl, $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , $ONOO^-$, H_2O_2 . Já as espécies reativas de nitrogênio (RNS) designam um termo coletivo que inclui o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e os radicais de dióxido de nitrogênio, assim como os não-radicaais, ácido nitroso (HNO_2) e óxido nitroso (N_2O_3), entre outros. O peroxinitrito ($ONOO^-$) é, freqüentemente, incluído em ambas as categorias (Halliwell, 1996).

As células possuem mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos responsáveis pela proteção contra os efeitos tóxicos provocados pelas espécies reativas. Entretanto, sob diversas condições patofisiológicas a produção de ROS excede a capacidade protetora do organismo, resultando em estresse oxidativo, o qual poderá danificar membranas celulares, lipídeos, proteínas e DNA (Mandamanchi, Hakim e Runge, 2005). O sistema enzimático inclui diversas enzimas, tais como superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GSH-Px), as quais agem conjuntamente para manter as concentrações de ROS em níveis aceitáveis (Araújo, 2001).

A SOD são metaloproteínas que catalisam a redução do radical $O_2^{\cdot-}$ para H_2O_2 , através da seguinte reação: $2 O_2^{\cdot-} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. As células de mamífero possuem SOD tanto na mitocôndria, contendo manganês em seu sítio ativo (SODMn), quanto no citoplasma, contendo cobre e zinco em seu sítio ativo (SODCuZn) (Fridovich, 1986).

A CAT são hemoproteínas presentes nos peroxissomos da maioria das células de mamífero e contem ferro em seu sítio ativo. Estas enzimas previnem o acúmulo de H_2O_2 dentro das células, catalisando a reação: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$

A GSH-Px contém selênio em seu sítio ativo e utiliza como substrato H_2O_2 e hidroperóxidos, catalisando as seguintes reações: $H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$
 $ROOH + 2 GSH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$

Como suporte secundário ao mecanismo enzimático, a ingestão de substâncias com propriedades antioxidantes auxilia o mecanismo de defesa no controle dos danos causados pelos radicais livres. Dentre os diversos antioxidantes supridos pela dieta pode-se citar o α -tocoferol, ascorbato, carotenóides, glutathione e compostos polifenólicos (Araújo, 2001).

2.6 - Flavonóides:

Os flavonóides são compostos naturais polifenólicos de baixo peso molecular que possuem dois anéis benzeno unidos por uma cadeia linear formada por três átomos de carbono. Estes compostos são universalmente encontrados em uma grande variedade de frutas, vegetais e algumas bebidas, incluindo chá e vinho, e por isso, são largamente consumidos na dieta humana (Kim *et al.*, 2006; Hertog *et al.*, 1993).

Na maioria dos países, o consumo elevado de gorduras saturadas correlaciona-se fortemente com a mortalidade por doenças cardiovasculares, porém, em algumas regiões da França, este fenômeno não é observado. Essa singularidade deu origem ao termo "paradoxo francês", isto é, a aparente incompatibilidade entre o consumo de uma dieta rica em lipídeos e a baixa incidência de doenças cardiovasculares, podendo este fato ser atribuído ao consumo regular de vinho tinto, que apresenta na sua composição compostos fenólicos, em especial flavonóides, os quais inibem as reações de oxidação da LDL e, conseqüentemente, possuem ação inibidora sobre a formação da placa aterosclerótica (Renaud e de Lorgeril, 1992). Alguns estudos vêm evidenciando os efeitos benéficos de uma dieta rica em flavonóides e suportam a idéia de que as propriedades antioxidantes desses compostos podem reduzir as reações de peroxidação lipídica e retardar o processo de aterogênese. Hertog *et al.* (1993), através de um estudo epidemiológico holandês demonstrou que a incidência de doença coronariana em homens idosos é inversamente proporcional ao consumo de flavonóides, evidenciando então os benefícios de uma dieta rica em flavonóides.

Mais de 4000 flavonóides já foram identificados nas plantas e, baseados na sua estrutura química, eles são classificados da seguinte maneira: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas, flavanóis (catequinas) e procianidinas (Kris-Etherton *et al.*, 2004). As diferenças individuais dentro de cada grupo resultam da variação em número e arranjo dos grupos hidroxila, assim como da natureza e extensão da alquilação e/ou glicosilação desses grupos (Aherne e O'Brien, 2002).

A estrutura química dos flavonóides prediz sua atividade seqüestradora de radicais livres, podendo prevenir lesões causadas pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio através de vários mecanismos. Estes compostos agem quelando espécies reativas e estabilizando-as quimicamente. O mecanismo mais provável para esta ação seria a elevada

reatividade do grupo hidroxila presente na estrutura da maioria dos flavonóides (Hanasaki *et al.*, 1994).

Os flavonóides têm ganhado cada vez mais interesse devido ao seu largo espectro de atividades farmacológicas e ao seu potencial efeito benéfico para a saúde. Alguns efeitos relacionados a esses polifenóis são: anti-lipoperoxidante (Terao *et al.*, 1994; Belinky *et al.*, 1998), anti-tumoral (Deschner *et al.*, 1991; Elangovan *et al.*, 1994; Brown, 1980), anti-agregante plaquetário (Tzeng *et al.*, 1991; Sheu *et al.*, 2004; Swies *et al.*, 1984), anti-iscuêmico (Rump *et al.*, 1995), anti-viral (Weber *et al.*, 2003; Paredes *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2000), anti-bacteriano (Mabe *et al.*, 1999; Cowan, 1999), anti-alérgico e anti-inflamatório (Gil *et al.*, 1994; Ferrándiz e Alcaraz, 1991; Middleton e Kandaswami, 1992), estrogênico (Valachovicova *et al.*, 2004; Kinjo *et al.*, 2004), vasodilatador (Chung *et al.*, 1993), entre outros. Existem inúmeros relatos de flavonóides inibindo a atividade de diversas enzimas, incluindo lipooxigenases, ciclooxigenases, monooxigenases, xantina oxidase, glutathiona redutase, NADH-oxidase, fosfolipases A2 e proteínas cinases (Zhang *et al.*, 1997; Cotellet *et al.*, 1996; Siess *et al.*, 1995; Gil *et al.*, 1994; Hoult *et al.*, 1994; Elliot *et al.*, 1992; Cushman *et al.*, 1991; Jinsart *et al.*, 1991; Laughton *et al.*, 1991). Esses efeitos biológicos estão relacionados às propriedades antioxidantes desses compostos, incluindo a proteção contra reações de radicais livres induzidas pelo ferro (Middleton *et al.*, 2000; Rice-Evans *et al.*, 1996). Em contraste aos efeitos benéficos, alguns polifenóis demonstraram toxicidade ou atividade mutagênica *in vitro*, o que pode estar relacionado a uma atividade pró-oxidante do composto, visto que os compostos polifenólicos podem se comportar como anti ou pró-oxidantes, dependendo da concentração e fonte dos radicais livres (Cao *et al.*, 1997). Os flavonóides se auto-oxidam em meio aquoso e podem formar radicais OH[•] altamente reativos na presença de metais de transição (Ahmad *et al.*, 1992).

Apesar dos efeitos pró-oxidantes descritos *in vitro*, não se sabe qual a relevância dos mesmos *in vivo*. Nos organismos vivos, os íons metálicos são seqüestrados de forma a não ser possível sua reação com radicais livres e a quantidade de polifenóis presente na dieta parece não ser suficiente para gerar altos níveis de pró-oxidantes e produtos de alquilação (Halliwell, 1996). Sendo assim, os flavonóides aparecem como excelentes candidatos em pesquisa, uma vez que podem atenuar o estresse oxidativo em diversos processos patológicos, como o câncer, diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas, aterosclerose, entre outras.

2.7 - O Flavonóide diocleína:

A diocleína é um flavonóide extraído da *Dioclea grandiflora*, uma planta que cresce na costa litorânea do nordeste brasileiro. É bastante difundida na medicina popular, sendo que a infusão de suas raízes é utilizada para o tratamento de cálculos renais e desordens da próstata. As sementes da diocleína são consumidas na dieta humana em regiões de Caatinga brasileira (Correa, 1984; Lima, 1989).

Os efeitos já descritos da diocleína estão relacionados à capacidade vasodilatadora desse flavonóide em aorta, pequenas artérias mesentéricas e coronária de rato (Lemos *et al.*, 1999; Côrtes *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2002). Em aorta de rato, o principal mecanismo envolvido na ação vasodilatadora deste flavonóide envolve a participação do NO[•] (Lemos *et al.*, 1999). Sabe-se que, dentre as várias ações sobre a função vascular, o NO[•] inibe direta ou indiretamente a peroxidação da LDL, sendo assim um poderoso agente anti-aterogênico. Além disso, este radical também diminui a estenose decorrente da instalação do ateroma (Libby, 2002). Estes achados associados a diversos relatos na literatura que tratam da ação dos flavonóides na prevenção e no tratamento da doença aterosclerótica, corroboraram com a hipótese de que a diocleína poderia ter efeito protetor sobre os eventos que conduzem ao processo aterosclerótico (Fuhrman e Aviram, 2001).

Além desses efeitos descritos na literatura, a diocleína também apresentou uma potente atividade hipotensora em ratos acordados não anestesiados (Côrtes *et al.*, 2001) e o efeito analgésico desse flavonóide também já foi comprovado em experimentos com camundongos (Batista *et al.*, 1995).

Resultados recentes (Rabelo, 2004) sugerem que o tratamento crônico com diocleína por seis semanas (2 mg/kg em intervalos de 12 horas) diminui a disfunção endotelial característica de camundongos *knockout* para a apolipoproteína E (apoE^{-/-}). Esses experimentos resultaram em uma diminuição da peroxidação dos lipídeos plasmáticos, diminuição da quantidade de anticorpos para LDL oxidada, diminuição dos níveis de MCP-1 / CCR2 e TNF- α em aorta, diminuição do colesterol total circulante e aumento do mRNA para eNOS em aorta. Em experimentos *in vitro*, com LDL oxidada, a atividade antioxidante da diocleína foi observada através da inibição da formação de dienos conjugados e de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As figuras 7 e 8 ilustram a estrutura química da

diocleína, bem como a planta *Dioclea grandiflora* de onde este flavonóide é extraído, e sua semente, conhecida como olho de boi.

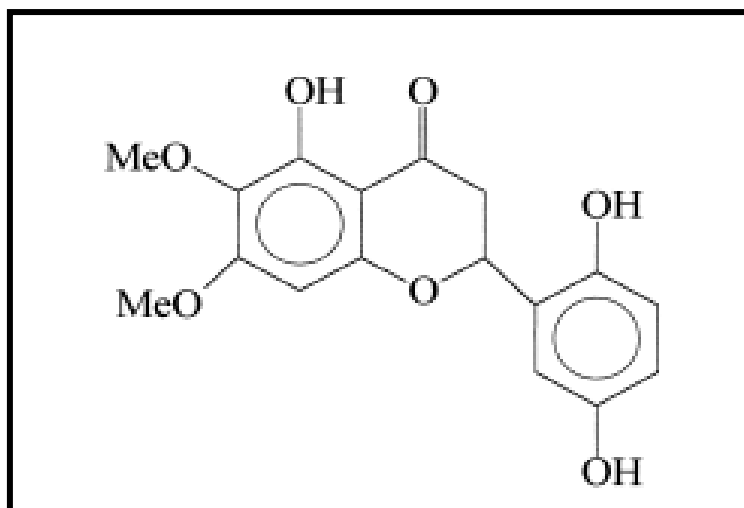


Figura 7: Estrutura química da diocleína (5, 2', 5'-trihydroxy-6-7-dimethoxyflavanone)

Fonte: (Lemos *et al.*, 1999)



Figura 8: A - Flor da *Dioclea grandiflora* e B - Semente da *Dioclea grandiflora*

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral:

Avaliar o efeito do tratamento crônico com o flavonóide diocleína no desenvolvimento da aterosclerose e nas alterações no estresse oxidativo em camundongos apoE *knockout*.

3.2 - Objetivos específicos:

- 1) Avaliar a evolução ponderal dos camundongos apoE *knockout* tratados ou não com o flavonóide diocleína;
- 2) Determinar os níveis sanguíneos de colesterol total e triglicérides dos camundongos no início do tratamento (T0), na terceira semana após o início do tratamento (T3) e no final do tratamento (T6), por meio da dosagem enzimática por kit;
- 3) Verificar os níveis hepáticos de lipídeos totais e de colesterol, após o tratamento crônico com o flavonóide diocleína;
- 4) Verificar os níveis de lipídeos totais e de colesterol presentes no conteúdo cecal dos camundongos apoE *knockout* após o tratamento de seis semanas com o flavonóide diocleína;
- 5) Avaliar se o tratamento com flavonóide diocleína é eficaz sobre a peroxidação lipídica no tecido hepático e renal dos camundongos, por meio da mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e dosagem de hidroperóxidos, utilizando-se o ensaio da oxidação ferrosa do xilenol orange;

- 6) Avaliar o efeito da diocleína sobre o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas, nas válvulas aórticas coradas com hematoxilina e eosina, por meio da análise morfométrica, bem como nas aortas torácicas e abdominais por meio da coloração com Sudan IV;

- 7) Verificar pela coloração com Tricômico de Gomori alterações na quantidade de colágeno das lesões ateroscleróticas presentes nas válvulas aórticas, após o tratamento com o flavonóide diocleína;

- 8) Quantificar o número de células inflamatórias presentes nas lesões ateroscleróticas das válvulas aórticas dos camundongos tratados ou não com o flavonóide diocleína.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Modelos animais:

Neste estudo foram utilizados camundongos machos apoE *knockout* com idade de aproximadamente oito semanas, os quais foram adquiridos e mantidos no biotério do Laboratório de Bioquímica Nutricional. Os animais receberam dieta comercial (CR1 Nuvital®, Brasil), tiveram livre acesso à água e foram mantidos em gaiolas coletivas, em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas (7:00 às 19:00 h) e com temperatura variando entre $25 \pm 2,0$ °C.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo número 107/05 (Anexo).

4.2 - Separação dos animais em grupos:

Após o desmame, os camundongos machos apoE *knockout* com aproximadamente oito semanas de idade, foram divididos em dois grupos experimentais de acordo com os níveis iniciais de colesterol sérico e peso corporal:

☞ **Grupo Diocleína:** Camundongos apoE^{-/-} que receberam o flavonóide diocleína.

☞ **Grupo Controle:** Camundongos apoE^{-/-} que receberam o veículo (salina fisiológica 0,9%).

Para a avaliação do crescimento ponderal dos animais durante todo o período experimental, o peso corporal individual e o consumo alimentar foram verificados semanalmente.

4.3 - Utilização do flavonóide diocleína:

O flavonóide diocleína foi gentilmente cedido pela professora Virgínia Soares Lemos (Laboratório de Hipertensão, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, UFMG), para a realização do tratamento, o qual foi feito de maneira crônica por um período de seis semanas.

Para calcular a dose de diocleína a ser administrada diariamente, utilizou-se o peso corporal dos camundongos, os quais receberam intraperitonealmente (i.p.) uma dose de 2mg/kg duas vezes ao dia, obedecendo a um intervalo de aproximadamente 10 horas. A diocleína foi cuidadosamente pesada em balança de precisão, posteriormente, acrescentou-se à quantidade pesada o equivalente a uma gota do agente utilizado para fazer a sua maceração (cremofor®; Sigma®), e por fim o volume final foi completado com salina fisiológica 0,9%, de maneira que cada animal recebesse intraperitonealmente o volume de 100 µL por aplicação. A solução contendo a diocleína foi envolvida em papel alumínio e armazenada no freezer até o momento do uso, com intuito de evitar a oxidação do flavonóide. Os animais do grupo controle receberam 100 µL por aplicação da solução contendo somente o veículo, ou seja, salina fisiológica 0,9% acrescida do agente utilizado para facilitar a maceração (cremofor®; Sigma®) sendo a proporção do cremofor® menor que 0,01% em relação ao volume final.

4.4 - Amostras de sangue e sacrifício dos camundongos:

Após um jejum de 8 a 10 horas, amostras de sangue de cada camundongo foram coletadas através da artéria caudal em tubos de plásticos previamente heparinizados. Esse procedimento foi realizado no início do experimento (tempo zero / T0) e após três semanas de experimento (tempo três / T3). O plasma foi separado por centrifugação a 6000 rpm durante 5 minutos, em centrífuga de mesa (Fanem Centrimicro 243) e em seguida foi realizada a dosagem de colesterol total e triglicerídeos.

Ao final do experimento (tempo seis / T6), após o mesmo período de jejum, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma solução feita de ketamina (130 mg/kg) e xilazina (0,3 mg/kg). O anestésico foi injetado na dose de 3 a 4 μ L/g de peso corporal e após a certificação de que os animais estavam anestesiados, o sangue foi retirado pela aorta abdominal e, posteriormente, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. O sangue foi coletado com a ajuda de pipetas Pasteur, transferido para *ependorfs* sem anticoagulante, e o soro foi separado por centrifugação a 6000 rpm por 5 minutos, em centrífuga de mesa (Fanem Centrimicro 243), armazenado à -70 °C, após ser borrifado com nitrogênio gasoso, para posteriores dosagens de colesterol total e triglicerídeos.

Além das amostras de sangue, foram retiradas após o sacrifício dos animais, a aorta, o coração, o fígado, o baço, o rim e as fezes do conteúdo cecal, os quais foram armazenados na temperatura de -70 °C até o momento das análises.

4.5 - Determinação dos níveis de colesterol total:

Os níveis de colesterol total foram medidos de acordo com o método da colesterol oxidase (Allain *et al.*, 1974), utilizando-se kit enzimático comercial. O método consiste na hidrólise dos ésteres de colesterol pela colesterol esterase, produzindo colesterol livre, o qual é oxidado a colest-4-em-3-ona com a produção simultânea de peróxido de hidrogênio. Este sofre ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina produzindo um composto róseo-avermelhado (quinonimina) com máximo de absorção em 500nm. Os níveis de colesterol total foram determinados por um ensaio em microplaca de 96 poços (Fazio *et al.*, 1997). Em resumo, as amostras de soro ou plasma provenientes dos camundongos apoE^{-/-} foram diluídas em 1:100, utilizando-se para isso água destilada. Dessa diluição retirou-se um volume de 100 μ L e adicionou-se mais 100 μ L do reagente de cor. Após o período de incubação de 10 minutos a 37 °C, a absorbância foi lida a 492 nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus). O mesmo procedimento foi feito com o padrão de colesterol para a determinação da curva de calibração. A concentração de colesterol total foi determinada considerando-se a concentração de 200 mg/dL de colesterol no padrão.

4.6 - Determinação dos níveis de triglicerídeos:

Os níveis de triglicerídeos também foram medidos utilizando-se kit enzimático comercial, de acordo com o método enzimático colorimétrico (Fossati e Precipe, 1982). No presente método, os triglicerídeos do soro ou plasma foram hidrolisados pela lipase lipoprotéica produzindo glicerol livre, que é fosforilado pela enzima glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase, a qual em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob a ação da peroxidase em presença de um reagente fenólico (p-clorofenol) e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado (quinona), com máximo de absorção a 492 nm. As dosagens e a curva padrão foram feitas em microplacas de 96 poços como descrito acima para o colesterol, porém, para a dosagem dos triglicerídeos a diluição utilizada foi de (1:25).

4.7 - Quantificação dos níveis de lipídeos hepáticos e colesterol hepático:

No sacrifício, o fígado dos animais foi removido, lavado em solução de salina fisiológica e seco em papel filtro. Uma parte do tecido hepático foi armazenada em *ependorf* e mantida a temperatura de -70°C para as análises de peroxidação lipídica, enquanto que a outra parte do tecido foi colocada em papel alumínio, mantida a -70°C para a quantificação dos níveis de lipídeos e colesterol hepático.

Os lipídeos totais hepáticos foram extraídos de acordo com o método de Folch *et al.* (1957). Em resumo, foram pesados 100 mg de fígado em tubos de plástico previamente identificados e posteriormente triturados com 1900 μL de solução contendo clorofórmio:metanol (2:1) usando-se homogeneizador LABO STIRRER LR 41 B por 3 minutos na velocidade 10. Após a adição de 400 μL de metanol, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm e o sobrenadante foi transferido para novos tubos de vidro com peso conhecido. Posteriormente, foram acrescentados 800 μL de clorofórmio, 640 μL de solução de NaCl a 0,73% e as amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm, sendo desprezada a fase superior. A parede interior de cada tubo foi

lavada três vezes com 600 μ l de solução de Folch (solução de 3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água destilada e 2% de NaCl a 0,29%) e os lipídeos assim extraídos foram secos em estufa *overnight* a 37 °C. Após verificar que os tubos estavam totalmente secos, eles foram pesados e a quantidade de lipídeos extraída foi dada pela diferença dos tubos de vidro antes e depois de secos. Posteriormente a pesagem dos tubos, os mesmos foram armazenados no freezer até a dosagem do colesterol hepático.

Para a dosagem do colesterol total hepático as amostras foram descongeladas e ressuspendidas em 500 μ L de isopropanol e homogeneizadas até a completa solubilização dos lipídeos. As dosagens e a curva padrão foram feitas em microplacas de 96 poços como descrito acima para o colesterol total sérico e plasmático.

4.8 - Quantificação dos níveis de lipídeos cecais e colesterol cecal:

Para a dosagem dos lipídeos e colesterol cecal utilizaram-se as fezes presentes no conteúdo cecal dos camundongos, as quais foram coletadas durante o sacrifício. A quantificação dos lipídeos cecais foi realizada pelo método de Folch *et al.* (1957) e os níveis de colesterol e derivados foram determinados da mesma forma como descritos anteriormente para amostras de fígado.

4.9 - Avaliação da atividade antioxidante do flavonóide diocleína através da mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):

A formação de radicais livres e a peroxidação lipídica são reações extremamente rápidas, que são, geralmente, mensuradas pelos seus produtos, principalmente as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), entre as quais o malonildialdeído é o principal. Dessa forma, a formação de malonildialdeído, pela quebra de ácidos graxos poliinsaturados, é um método conveniente para se determinar o grau de peroxidação lipídica, sendo assim uma excelente ferramenta para o monitoramento das propriedades

antioxidantes de qualquer substância. A mensuração destes metabólitos foi realizada no fígado e no rim dos animais utilizando-se o método descrito por Wallin *et al.* (1993).

Em resumo, 100 mg de fígado ou 100 mg de rim foram homogenizados em 1000 μ L de PBS 1X utilizando-se homogenizador (Euro Turraz T20b, IKA labortechnik). Os homogenatos de fígado e rim foram mantidos no gelo enquanto as soluções para o ensaio foram preparadas. Foram transferidos 500 μ L do homogenato de cada amostra para tubos de ensaio e adicionaram-se 1000 μ L da solução TBARS, que foi preparada com ácido tricloroacético (TCA, 15%), ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,375%) e HCl 0,25 N. Os tubos foram cobertos com papel alumínio e mantidos em banho maria fervente por 15 minutos e então colocados sob água corrente até esfriarem. Posteriormente, foram adicionados 1500 μ L de butanol às amostras, as quais foram vagarosamente agitadas. Após uma centrifugação a 3000 rpm, por 10 minutos, o sobrenadante foi recolhido, plaqueado em duplicata e a leitura da absorbância foi feita a 535 nm. Uma curva-padrão de malonildialdeído (MDA) foi feita com as seguintes concentrações: 0; 2,5; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0 μ M. Foi realizada ainda a dosagem de proteínas segundo o método de Lowry *et al.* (1951) e os resultados foram expressos em μ mol de MDA/quantidade de proteínas das amostras.

4.10 - Dosagem da concentração de hidroperóxidos pelo ensaio da oxidação ferrosa do xilenol orange:

A oxidação dos lipídeos insaturados envolve retirada de hidrogênio, inserção de oxigênio molecular e conseqüente redução dos radicais hidroperoxil a hidroperóxidos. Dessa forma, a dosagem da concentração de hidroperóxidos, que é mais uma técnica utilizada para estimar a peroxidação lipídica, foi realizada no tecido hepático e renal dos camundongos segundo o método descrito por Nourooz-Zadeh *et al.* (1994).

O princípio da técnica consiste basicamente na oxidação de íons ferroso (Fe^{2+}) a íons férricos (Fe^{3+}) sob condições ácidas, pelos hidroperóxidos. O indicador utilizado é o xilenol orange, que se liga aos íons férricos produzindo um cromóforo azul-arroxeadado. A concentração de hidroperóxidos pode ser estimada uma vez que o seu coeficiente de

extinção é de $4,3 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 560 nm. Este método é bem sensível podendo detectar concentrações de hidroperóxidos inferiores a $1 \mu\text{M}$.

Em resumo, 100 mg de fígado ou 100 mg de rim foram homogenizados em 1000 μL de PBS 1X utilizando-se homogenizador (Euro Turraz T20b, IKA labortechnik), da mesma forma que foram preparados para a análise de TBARS. Os homogenatos foram mantidos no gelo enquanto as soluções para o ensaio foram preparadas, as quais estão descritas na tabela 3.

Tabela 3: Preparo das soluções necessárias para a dosagem de hidroperóxidos em amostras de fígado e rim.

Preparação do H_2SO_4 250mM (100mL)	
H_2SO_4 (97%;d=1,84kg/L; PM=98,08)	1373 μL
H_2O	q.s.p 1000 mL
Preparação do FOX-2 (30mL)	
Xilenol Orange	22,8 mg
Sulfato ferroso amoniacal	29,4 mg
H_2SO_4 250mM	q.s.p 30 mL
Preparação do BHT 4.4mM em metanol (25mL)	
BHT	24,25 mg
Metanol	q.s.p 25 mL

Em um *ependorf* foram colocados 50 μL do homogenato e 450 μL do reagente FOX-2, o qual foi preparado com a solução FOX-2 e BHT, na diluição de 1:10. Para o preparo do branco utilizou-se 50 μL de água MilliQ e 450 μL do reagente FOX-2. As amostras foram cobertas com papel alumínio e mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos. Passado o tempo de incubação foi realizada uma centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi plaqueado em duplicatas de 200 μL na microplaca de 96 poços e a leitura da absorbância foi feita a 560nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus).

Feita esta primeira parte, foi realizado um segundo ensaio, no qual foi medida a redução do peróxido de hidrogênio com trifenilfosfina (TPP), a qual é utilizada como eficiente ferramenta para distinção entre peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos (não- H_2O_2). Assim a oxidação da TPP, com conseqüente formação de TPP óxido, indica presença de H_2O_2 na amostra (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1994). Em resumo, no momento do ensaio foi feito uma solução de TPP na concentração de 10 mM, a qual foi diluída em metanol. Em um *ependorf*

foram colocados 45 μL do homogenato de fígado e rim preparado anteriormente e 5,0 μL da solução de TPP a 10 mM. O branco foi preparado em substituição do homogenato pela água MilliQ. As amostras foram homogeneizadas, cobertas com papel alumínio e mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos. Logo após foram acrescentados aos *ependorfs* 450 μL do reagente para FOX-2, e novamente, as amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi plaqueado em duplicatas de 200 μL na microplaca de 96 poços e a absorbância foi lida a 560nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus).

Para a quantificação dos teores de hidroperóxidos presentes nas amostras, basta fazer a subtração entre as dosagens do ensaio sem TPP e as dosagens do ensaio com TPP, ou seja, amostras sem TPP – amostras com TPP, que nada mais é do que, a quantidade de hidroperóxidos totais – a quantidade de H_2O_2 , podendo esses valores ser expressos em absorbância ou em mmolar.

4.11 - Análise histopatológica e morfométrica das lesões ateroscleróticas presentes na raiz da aorta:

Após o sacrifício dos camundongos, todos os corações foram retirados em bloco com a raiz da aorta, perfundidos com PBS 1X, separados da aorta torácica e abdominal e então fixados em formol tamponado 10%. Os corações já fixados foram cortados transversalmente sob visão estereoscópica, ao nível da borda atrial inferior direita, de modo a obter um fragmento contendo a porção proximal do coração e a raiz da aorta. Este fragmento foi processado conforme rotina para inclusão em parafina, de forma orientada, de modo a obterem-se cortes histológicos de 10 μm de espessura na região da válvula aórtica. As lâminas foram enumeradas em série e coradas em hematoxilina e eosina.

O tamanho da lesão aterosclerótica foi avaliado em dez cortes, tomando sempre como referência a presença da válvula aórtica. Localizada a formação da válvula aórtica, a cada 30 μm um corte era selecionado para a medida. Assim, foi percorrida uma extensão média de 300 μm , com cortes analisados intercalados por outros 2 cortes consecutivos, segundo técnica modificada de Paigen *et al.* (1987), (Portugal *et al.*, 2004). As áreas foram medidas por meio da análise morfométrica, pelo programa Image Pro Plus. O cálculo do tamanho da

lesão de cada animal foi feito pela soma das áreas dos dez cortes e valor médio por grupo foi utilizado para comparações estatísticas.

4.12 - Quantificação das lesões ateroscleróticas presentes na aorta torácica e abdominal:

As deposições de lipídeos na aorta torácica e abdominal foram detectadas utilizando a análise *en face* pela coloração com o corante Sudan IV (Palinski *et al.*, 1994). A aorta foi dissecada removendo-se cuidadosamente toda a adventícia a partir da válvula aórtica até a bifurcação ilíaca. A árvore aórtica foi aberta longitudinalmente e fixadas *overnight* com solução de formol-sacarose (4% paraformaldeído, 5% de sacarose, 20 $\mu\text{mol/L}$ de BHT, e 2 $\mu\text{mol/L}$ EDTA, pH 7,4) a 4°C. Depois de fixadas, as aortas foram submetidas a uma solução de 70% de etanol durante 5 minutos, posteriormente, foram coradas por 10 minutos sob agitação numa solução filtrada contendo 0,5% de Sudan IV, 35% de etanol, e 50% de acetona e descoradas por 5 minutos em solução de 80% de etanol. As imagens das aortas coradas com Sudan IV foram capturadas por *scanner* e as imagens foram congeladas utilizando-se um computador. O programa utilizado para analisar as imagens e obter as medidas das lesões foi o *software* Image Pro Plus.

Os cálculos das lesões das aortas foram feitos como porcentagem da lesão em relação à área total da aorta. O valor médio por grupo foi utilizado para comparações estatísticas.

4.13 - Avaliação da quantidade de células inflamatórias e colágeno presentes nas lesões ateroscleróticas:

A celularidade das lesões foi determinada pela contagem do número de células inflamatórias por campo. A área de cada campo foi determinada aleatoriamente, no total de quatro campos/corte. Foram analisados três cortes não consecutivos/animal, totalizando

análise de 12 campos/animal. O número de células foi determinado automaticamente pelo software Image Pro Plus por intensidade de cor.

O colágeno extracelular presente nas lesões ateroscleróticas foi visualizado utilizando-se o corante Tricrômio de Gomori, o qual apresenta coloração esverdeada, e contracolorados com hematoxilina. Foram analisados quatro cortes não consecutivos/animal (Gupta *et al.*, 1997; Daugherty e Rateri, 1994) e os resultados foram expressos como porcentagem de colágeno/área de lesão.

4.14 - Análise estatística dos dados:

Os dados foram inicialmente analisados usando o teste Komogorov-Smirnov para verificar sua simetria. Como todos os dados apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste T de *Student*, calculado pelo programa Sigma Plot (Scientific Graphing Software, Jandel Corporation) para comparar os grupos controle e tratado com o flavonóide diocleína. Foi considerado um nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 - Crescimento ponderal dos animais:

Como pode ser visto na figura 9, o tratamento por seis semanas com o flavonóide diocleína não influenciou o crescimento ponderal dos animais, uma vez que os dois grupos experimentais apresentaram similaridade em relação à curva de crescimento.

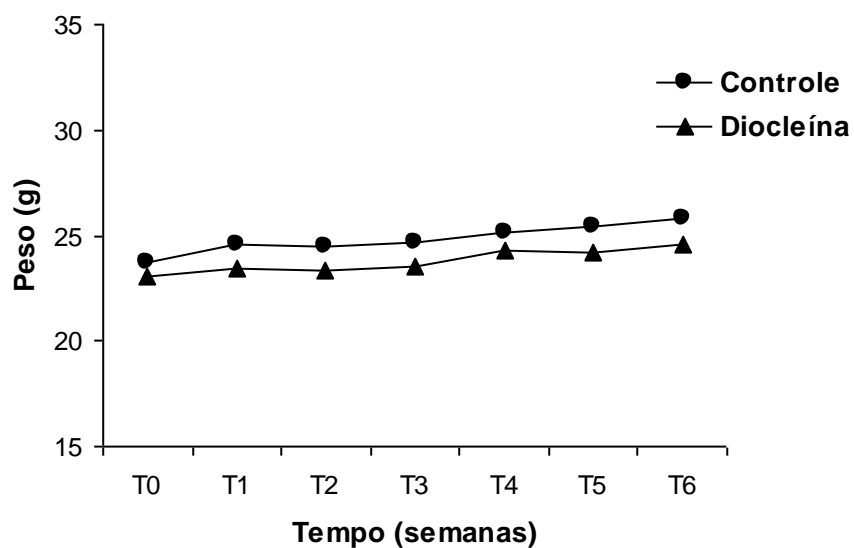


Figura 9 – Crescimento ponderal dos camundongos apoE^{-/-} tratados ou não com diocleína. Os resultados foram expressos como média do peso em gramas dos animais apoE^{-/-} do grupo controle (n=8) e do grupo tratado com diocleína (n=9).

5.2 – Níveis de colesterol total e triglicerídeos de camundongos apoE^{-/-} tratados ou não com o flavonóide diocleína:

Com o intuito de avaliar o efeito da administração do flavonóide diocleína por seis semanas no metabolismo lipídico, foram realizadas as dosagens de colesterol total e triglicerídeos.

Na Figura 10 são mostrados os valores de colesterol total plasmático no início do tratamento e no final de três semanas, bem como os valores séricos de colesterol total no final de seis semanas de tratamento. No início do experimento os animais apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína tinham níveis similares de colesterol total plasmático ($298 \pm 36,9$ e $284 \pm 24,9$, respectivamente, $p=0,76$). No final de três semanas de tratamento os níveis plasmáticos de colesterol total se mantiveram semelhantes entre os dois grupos ($282 \pm 38,7$ e $307 \pm 32,3$, respectivamente, $p=0,63$). Após seis semanas de experimento, os níveis séricos de colesterol total também não foram diferentes entre os animais controle e tratados com diocleína ($310 \pm 20,4$ e $271 \pm 29,9$, respectivamente, $p=0,31$).

Na Figura 11 são apresentados os níveis plasmáticos de triglicerídeos no início do tratamento e no final de três semanas, bem como os níveis séricos de triglicerídeos no final do experimento. Da mesma forma como observado para os níveis de colesterol total, as concentrações de triglicerídeos não foram diferentes entre os animais apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína em nenhum dos tempos analisados (Tempo inicial: $59 \pm 6,8$ e $51 \pm 11,1$, respectivamente, $p=0,31$; Tempo 3: $56 \pm 9,7$ e $55 \pm 7,8$, respectivamente, $p=0,63$ e Tempo final: $109 \pm 9,7$ e $74 \pm 7,8$, respectivamente, $p=0,11$).

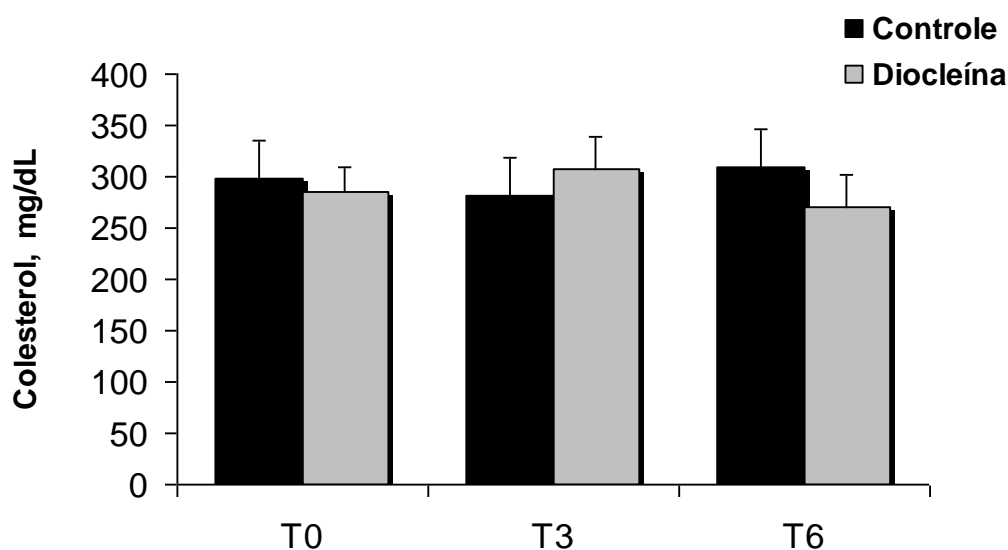


Figura 10 – Níveis plasmáticos e séricos de colesterol total de camundongos apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína.

Níveis de colesterol total (mg/dL) de animais apoE^{-/-} controles (barras pretas, n=8) e tratados com diocleína (barras cinzas, n=9) nos tempos iniciais (T0), ao final de três semanas (T3) e ao final do experimento (T6). As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente. p=0,76 para T0, p=0,63 para T3 e p=0,31 para T6.

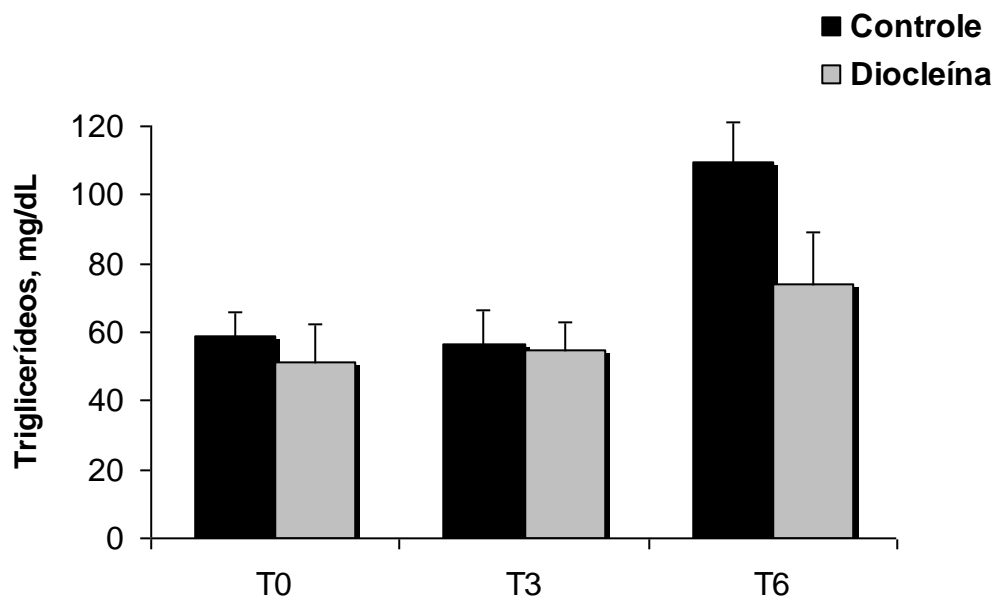


Figura 11 – Níveis plasmáticos e séricos de triglicerídeos de camundongos apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína.

Níveis de triglicerídeos (mg/dL) de animais apoE^{-/-} controles (barras pretas, n=7) e tratados com diocleína (barras cinzas, n=8) nos tempos iniciais (T0), ao final de três semanas (T3) e ao final do experimento (T6). As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente. p=0,31 para T0, p=0,63 para T3 e p=0,11 para T6.

5.3 – Níveis de lipídeos e colesterol total hepático e cecal de camundongos apoE^{-/-} tratados ou não com o flavonóide diocleína:

5.3.1 - Lipídeos e colesterol total hepático:

Como é mostrado na Figura 12, a quantidade de lipídeos totais que foram extraídos do fígado foi semelhante entre os animais apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína ($116,47 \pm 9,59$ e $102,70 \pm 9,82$, respectivamente, $p=0,37$). Os níveis hepáticos de colesterol total também não foram diferentes entre os dois grupos experimentais (controle = $5,13 \pm 0,45$ e diocleína = $4,74 \pm 0,42$, $p=0,54$, Figura 13).

5.3.2 – Lipídeos cecais e colesterol (3-alfa-hidróxi-esteróides) cecal:

Os animais apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína apresentaram níveis semelhantes de lipídeos cecais ($78,89 \pm 11,46$ e $105,18 \pm 31,58$, respectivamente, $p=0,47$, Figura 14). Em relação aos níveis de 3-alfa-hidróxi-esteróides também não foi observada diferença entre os animais apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína ($6,73 \pm 0,90$ e $6,99 \pm 0,33$, respectivamente, $p=0,79$, Figura 15).

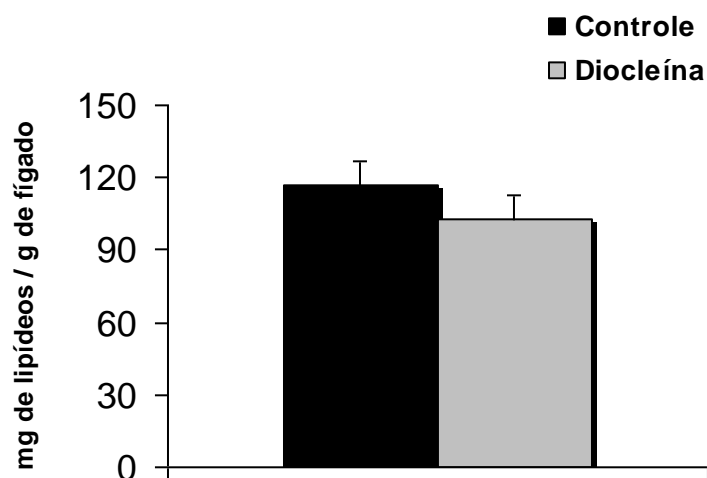


Figura 12 – Níveis de lipídeos totais hepáticos de camundongos apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína.

Níveis de lipídeos totais hepáticos de animais apoE^{-/-} controles (barras pretas, n=7) e tratados com diocleína (barras cinzas, n=8) no final experimento. As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente. p=0,37.

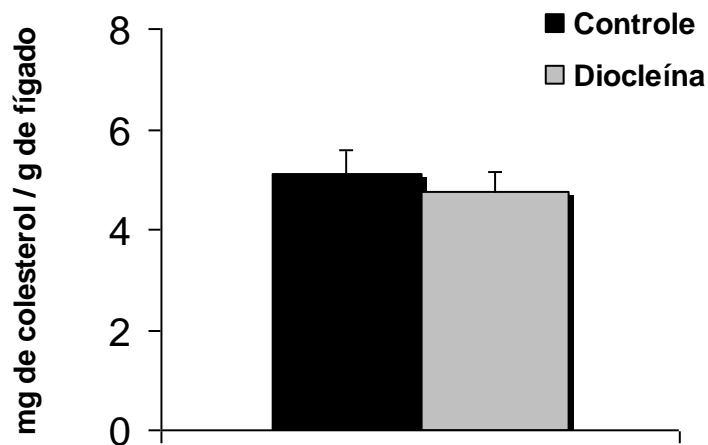


Figura 13 – Níveis de colesterol total hepático de camundongos apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína.

Níveis de colesterol total hepático de animais apoE^{-/-} controles (barras pretas, n=8) e tratados com diocleína (barras cinzas, n=9) ao final do experimento. As barras e linhas verticais representam a média e erro padrão de cada grupo, respectivamente. p=0,54.

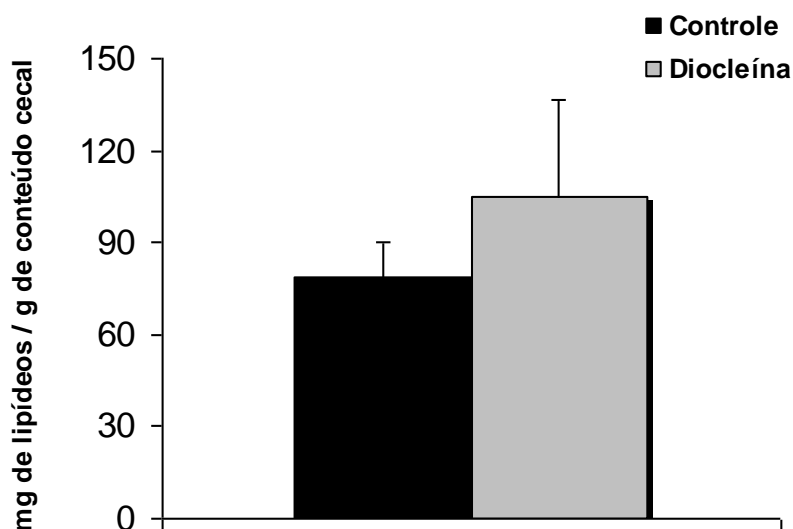


Figura 14 – Níveis de lipídeos totais cecais de camundongos apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína. Níveis de lipídeos totais cecais de animais apoE^{-/-} controles (barras pretas, n=7) e tratados com diocleína (barras cinzas, n=8) no final experimento. As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente. p=0,47.

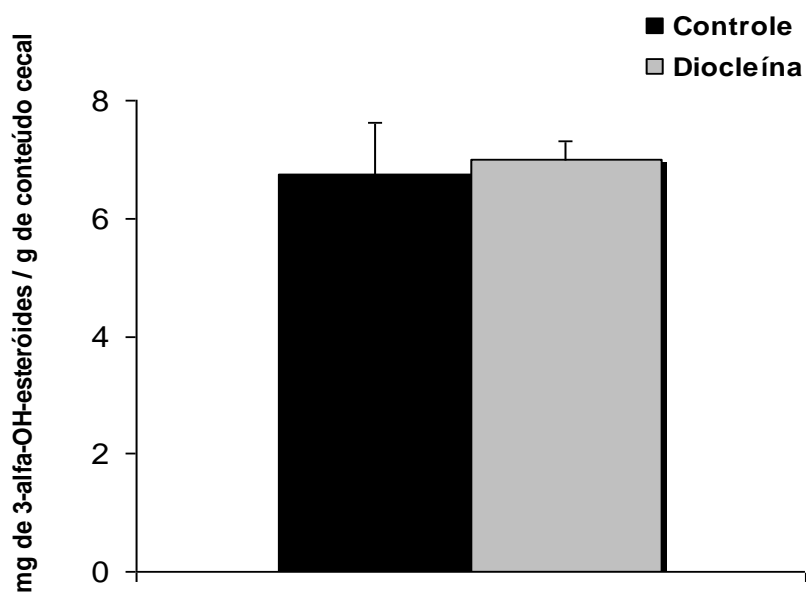


Figura 15 – Níveis de 3-alfa-hidróxi-esteróides cecais de camundongos apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína.

Níveis de 3-alfa-hidróxi-esteróides cecais de animais apoE^{-/-} controles (barras pretas, n=8) e tratados com diocleína (barras cinzas, n=8) ao final do experimento. As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente. p=0,79.

5.4 – Peroxidação lipídica hepática e renal:

5.4.1 – Produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico:

A peroxidação lipídica foi avaliada no tecido hepático e renal através da mensuração dos seus produtos, principalmente as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), dentre as quais se destaca o malonildialdeído (MDA). Conforme demonstrado nas Figuras 16 A e 16 B os níveis de MDA nos tecidos hepático e renal foram semelhantes entre os animais apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas (Fígado = 0,005 ± 0,001 e 0,004 ± 0,001, respectivamente, p=0,64) e (Rim = 0,013 ± 0,001 e 0,013 ± 0,001, respectivamente, p=0,94).

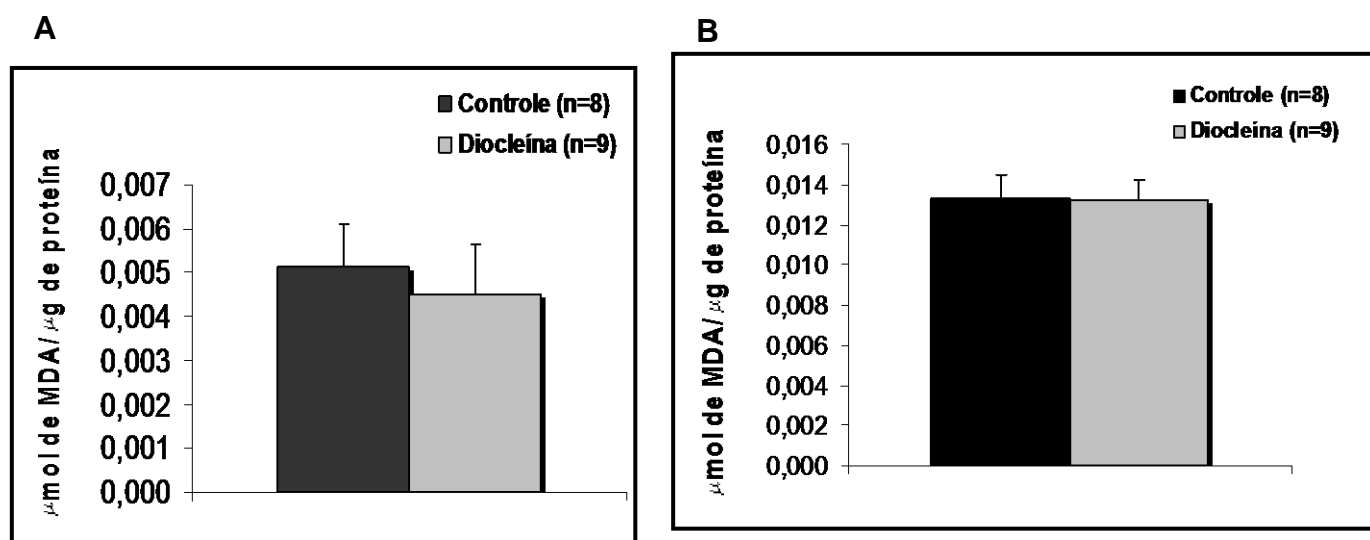


Figura 16 – Avaliação da presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em camundongos apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.

A - Níveis de MDA (μmol / μg de proteína) no tecido hepático de animais apoE^{-/-} controles (barras pretas, n=8) e tratados com diocleína (barras cinzas, n=9) ao final do experimento. p= 0,64.

B - Níveis de MDA (μmol / μg de proteína) no tecido renal de animais apoE^{-/-} controles (barras pretas, n=8) e tratados com diocleína (barras cinzas, n=9) ao final do experimento. p= 0,94. As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente.

5.4.2 – Avaliação da concentração de hidroperóxidos:

A peroxidação lipídica também foi avaliada pela mensuração da concentração dos hidroperóxidos. Como mostrado nas Figuras 17 A e 17 B, as concentrações de hidroperóxidos nos tecidos hepático e renal foram semelhantes entre os animais apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas, (Fígado = 102 ± 11,95 e 138 ± 32,24, respectivamente, p=0,29) e (Rim = 61 ± 4,43 e 39 ± 1,76, respectivamente, p=0,10).

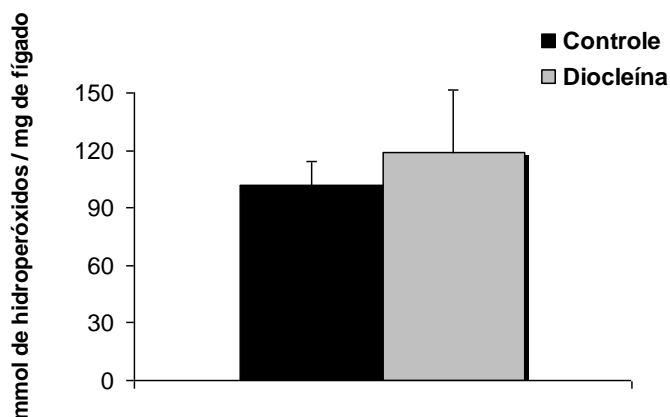


Figura 17 A – Avaliação da concentração de hidroperóxidos no tecido hepático em camundongos apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.

Concentração de hidroperóxidos no tecido hepático de animais apoE^{-/-} controles (barras pretas, n=8) e tratados com diocleína (barras cinzas, n=7) ao final do experimento. As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente. p=0,29.

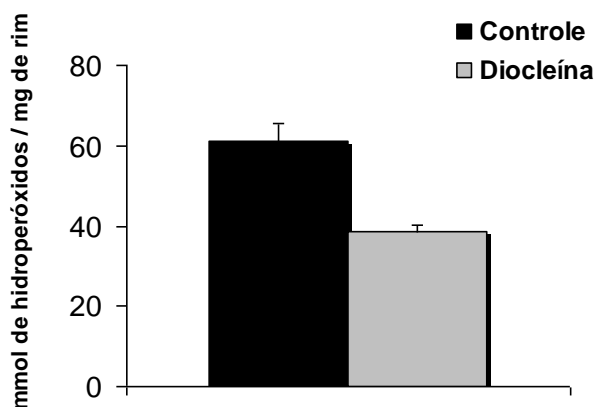


Figura 17 B – Avaliação da concentração de hidroperóxidos no tecido renal em camundongos apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.

Concentração de hidroperóxidos no tecido renal de animais apoE^{-/-} controles (barras pretas, n=8) e tratados com diocleína (barras cinzas, n=9) ao final do experimento. As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente. p=0,10.

5.5 - Lesão aterosclerótica:

5.5.1 - Aorta torácica e abdominal:

Um dos locais utilizados para medir as lesões ateroscleróticas foi a aorta torácica e abdominal. A análise do acúmulo de lipídeos mostrou que tanto o grupo controle quanto o grupo tratado com diocleína apresentaram a mesma quantidade de lipídeos depositados na aorta torácica e abdominal ao final das seis semanas de tratamento (controle = $6,24 \pm 1,70$ e diocleína = $3,42 \pm 0,52$, % lesão / área total da aorta torácica e abdominal, $p=0,14$, Figura 18)

Nas Figuras 19 A e B está apresentado o aspecto morfológico da aorta torácica e abdominal pelo método *en face* de animais apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.

5.5.2 - Válvula aórtica:

A válvula ou raiz aórtica é outro local para a avaliação do desenvolvimento das lesões ateroscleróticas. Nesta região, a área das lesões nos animais controle e tratados com diocleína não mostraram diferenças ($602.609 \pm 133.370 \mu\text{m}^2$ e $467.389 \pm 86041 \mu\text{m}^2$, respectivamente, $p=0,41$, Figura 20). As Figuras 21 A e B representam os aspectos histológicos das lesões de animais apoE^{-/-} controles e tratados com o flavonóide diocleína por seis semanas.

Em relação ao número de lesões na raiz da aorta, os animais apoE^{-/-} tratados com diocleína não apresentaram diferença quando comparados aos animais apoE^{-/-} controles (controle = $5,4 \pm 0,5$ e tratados com diocleína = $5,0 \pm 0,5$, $p=0,54$, Figura 22).

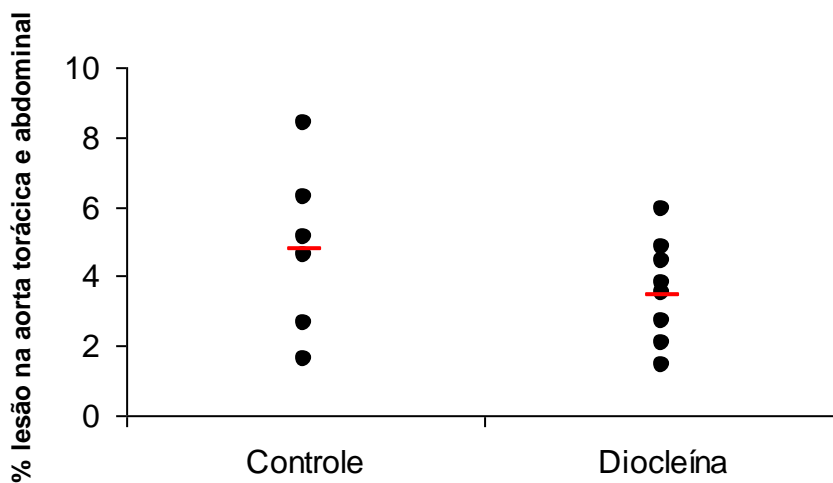


Figura 18 - Porcentagem de deposição lipídica na aorta torácica e abdominal dos animais apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.

Resultados expressos como média da porcentagem de lesão pela área total da aorta dos animais controle (n=6) e tratados com diocleína (n=8) no final de seis semanas. Linhas horizontais representam a média de cada grupo. p=0,14.

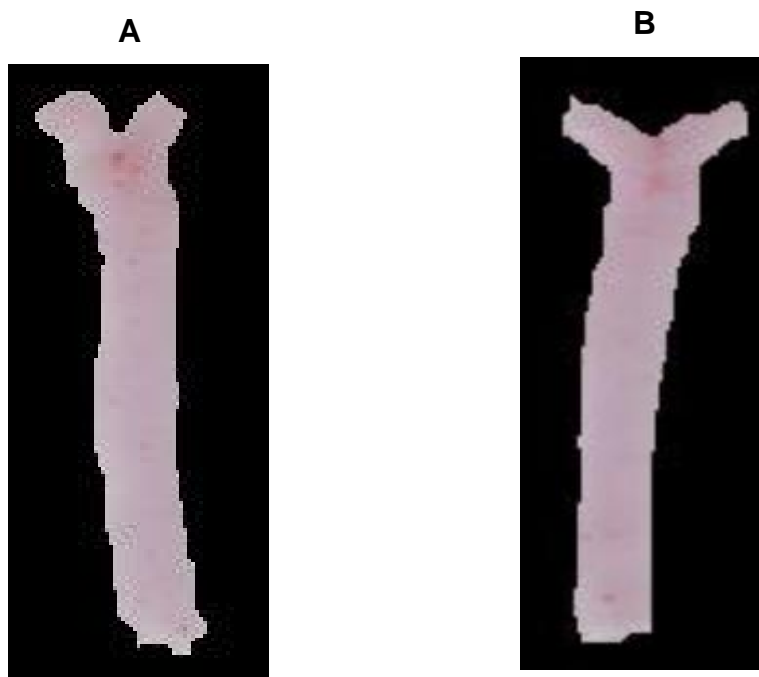


Figura 19 - Aspecto morfológico da aorta torácica e abdominal de animais apoE^{-/-}.

A - Aorta de animais apoE^{-/-} controle.

B - Aorta de animais apoE^{-/-} tratados com diocleína por seis semanas.

As aortas foram coradas por Sudan IV e as lesões ateroscleróticas estão representadas em vermelho.

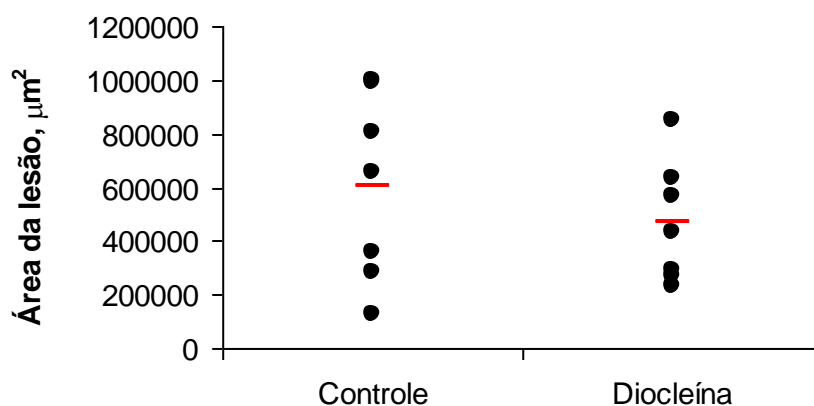


Figura 20 - Área da lesão aterosclerótica na raiz aórtica dos animais dos animais apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.

Resultado representa o valor de cada animal do grupo controle (n=7) e tratado com diocleína (n=7) expresso em μm^2 da aorta, ao final de seis semanas de tratamento. Linhas horizontais representam a média de cada grupo. $p=0,41$.

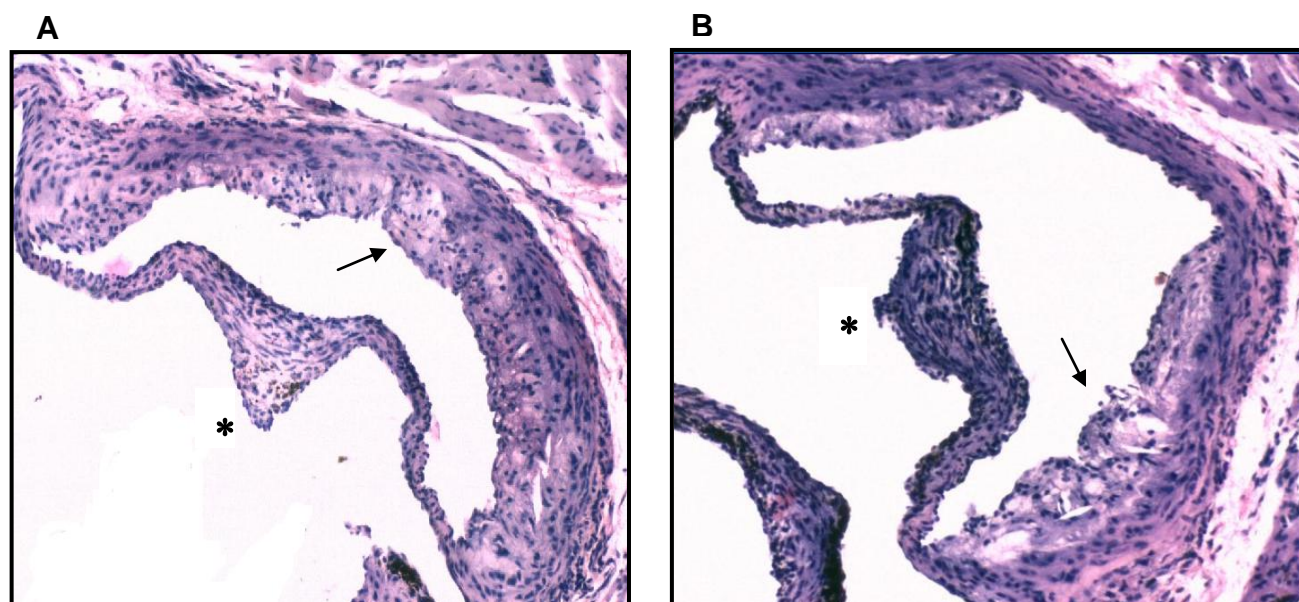


Figura 21 - Aspecto histológico (H&E) da raiz da aorta de animais apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.

A – Animais apoE^{-/-} controles e B – Animais tratados com diocleína por seis semanas. Em ambos os grupos, a lesão aterosclerótica está em um estágio mais avançado, sendo caracterizada como intermediária, onde é possível identificar a presença de células espumosas e células musculares lisas. A lesão está representada pela seta e a referência anatômica da válvula está identificada pelo asterisco. Os cortes histológicos foram corados com H&E, aumento de 100X.

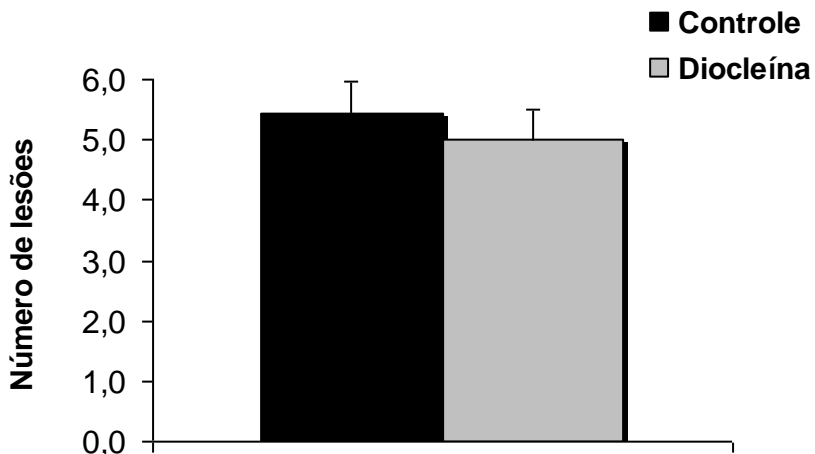


Figura 22 - Número de lesões na raiz aórtica dos animais apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.

Número de lesões ateroscleróticas de animais apoE^{-/-} controles (barra preta, n=7) e apoE^{-/-} tratados com diocleína (barra cinza, n=7). As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente. p= 54.

5.6 – Quantificação do infiltrado inflamatório nas lesões ateroscleróticas:

Quantitativamente, camundongos apoE^{-/-} tratados por seis semanas com o flavonóide diocleína não apresentaram diferença no infiltrado inflamatório das lesões ateroscleróticas presentes na raiz aórtica em relação aos camundongos apoE^{-/-} controles (controle= 2793 ± 153 e tratados com diocleína = 2186 ± 358 células inflamatórias/mm², p= 0,14, Figura 23).

As Figuras 24 A e B representam os cortes histológicos com presença de células inflamatórias nas lesões ateroscleróticas de animais apoE^{-/-} controles e tratados com o diocleína.

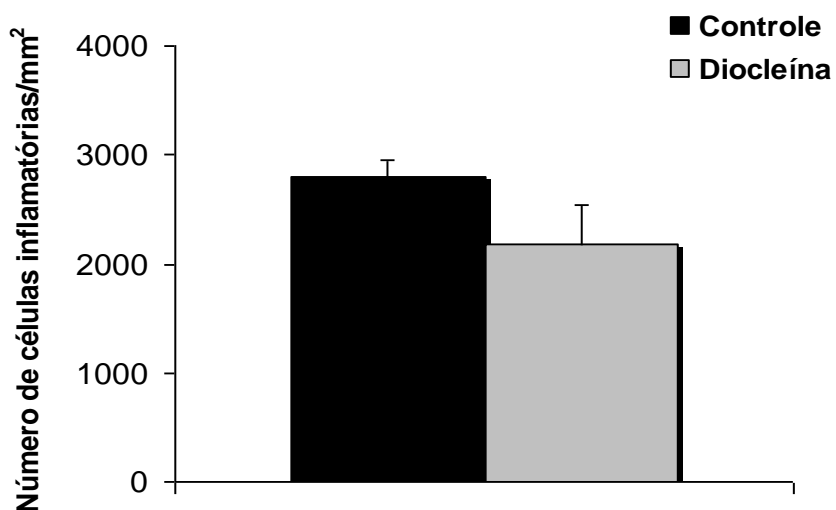


Figura 23 - Infiltrado inflamatório das lesões na raiz aórtica de animais apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.

Resultados expressos como média do número de células inflamatórias/mm² dos animais apoE^{-/-} controles (barra preta, n=7) e apoE^{-/-} tratados com diocleína (barra cinza, n=7) ao final de seis semanas. As barras representam as médias e linhas verticais representam o erro padrão de cada grupo. p=0,14.

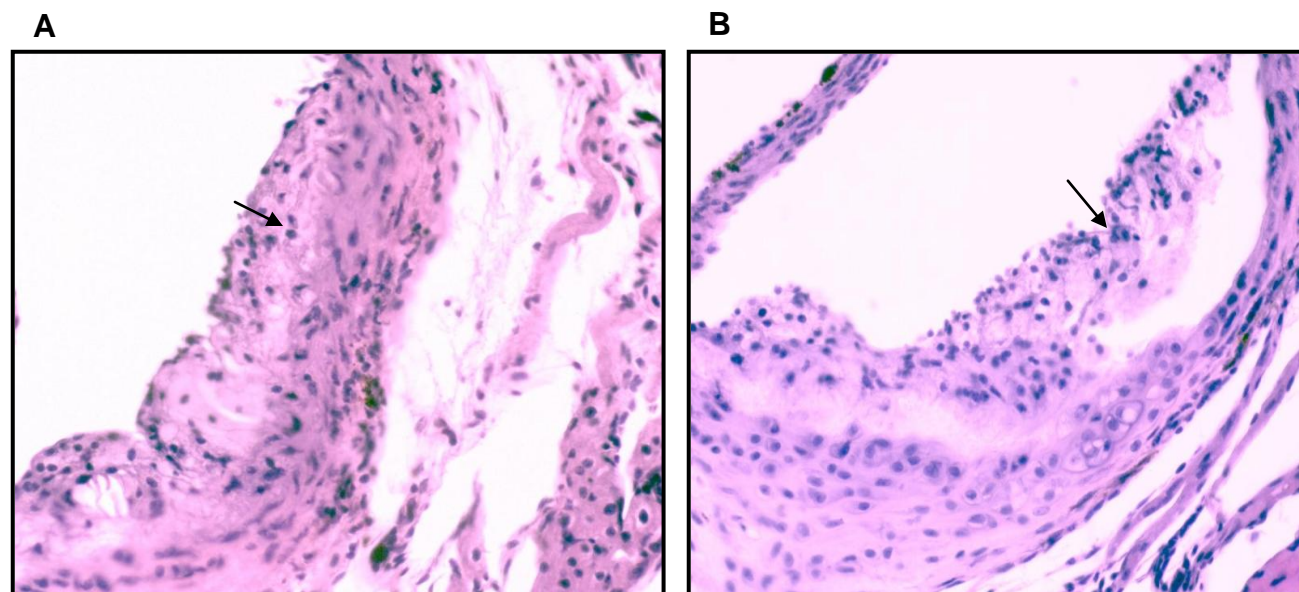


Figura 24 - Aspecto histológico (H&E) do infiltrado inflamatório das lesões ateroscleróticas de animais apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.

A e B – Aumento de 100X mostrando o infiltrado inflamatório de animais apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína, respectivamente. As setas indicam, nas lesões, a presença de células inflamatórias, as quais são identificadas pelo núcleo arredondado corado em roxo.

5.7 - Quantificação de colágeno nas lesões ateroscleróticas:

O conteúdo de colágeno foi quantificado e utilizado como parâmetro para avaliar a estabilidade das lesões ateroscleróticas presentes na raiz aórtica. Não foi observada diferença na quantidade de colágeno das lesões entre os animais apoE^{-/-} controles e tratados com o flavonóide diocleína por seis semanas (controle = 37 ± 4,3 e tratados com diocleína = 40 ± 4,8, p=0,64, Figura 25). Na Figura 26 A e B está representado o aspecto histológico dos cortes da raiz aorta. O colágeno foi corado em verde pelo Tricômio de Gomori e percebe-se a similaridade entre os dois grupos.

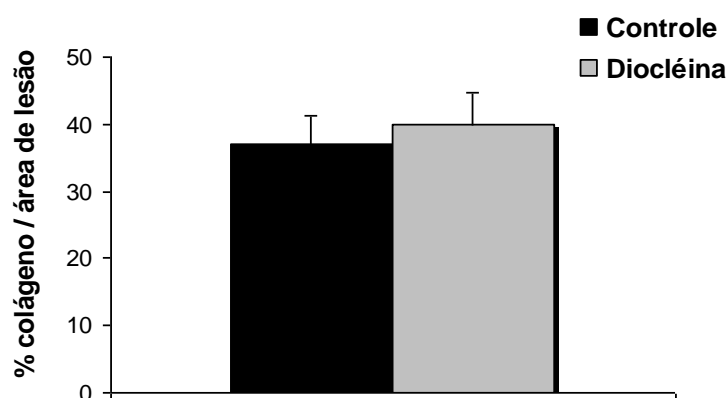


Figura 25 – Quantidade de colágeno das lesões na raiz aórtica de animais apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.

Resultados expressos como média da porcentagem de colágeno da área total da lesão aterosclerótica de animais apoE^{-/-} controles (barra preta, n=7) e tratados com diocleína (barra cinza, n=7) ao final de seis semanas. As barras e linhas verticais representam a média e erro padrão de cada grupo, respectivamente.

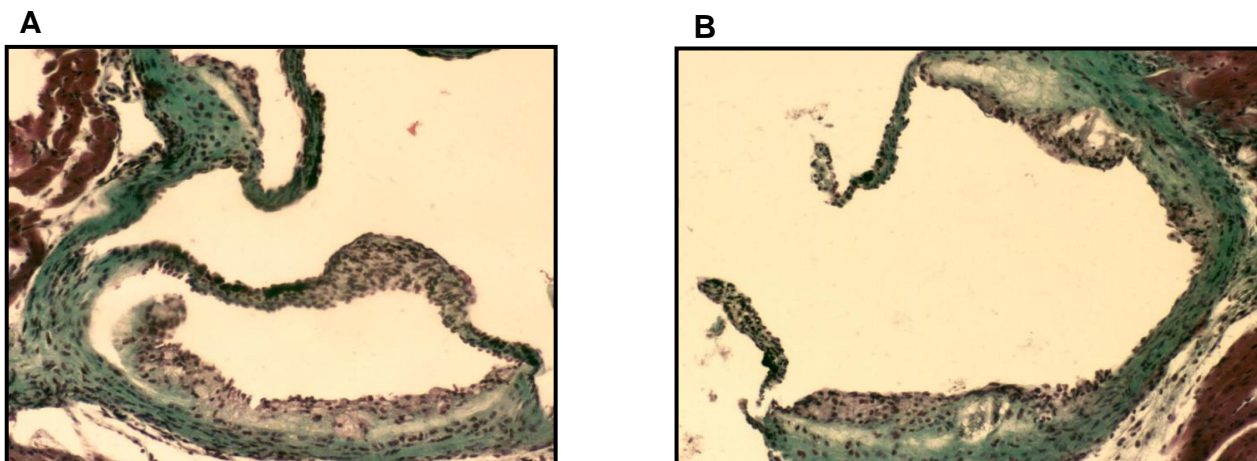


Figura 26 – Aspecto Histológico do conteúdo de colágeno de animais apoE^{-/-} controles e tratados com diocleína por seis semanas.

A – Animais controle e B – Animais tratados com diocleína. O colágeno é corado em verde com o corante Tricômio de Gomori. Aumento 100X.

6. DISCUSSÃO:

A aterosclerose é uma doença de etiologia multifatorial e os mecanismos implicados em sua gênese ainda não são completamente esclarecidos, tornando, dessa forma, a sua terapêutica bastante complexa. Diversos estudos mostram que a disfunção endotelial antecede a formação da placa aterosclerótica, assim, a intervenção farmacológica nos processos iniciais que desencadeiam este evento pode resultar na prevenção da aterosclerose, considerada a etiologia das síndromes coronarianas e a principal causa de mortes nos países ocidentais (Lusis, 2000).

Atualmente, os principais fármacos utilizados no tratamento da hiperlipidemia são as estatinas. Estes agentes são inibidores competitivos da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), enzima que catalisa, de forma precoce e limitante, a síntese de colesterol hepático (Steinberg, 1997; Brown e Goldstein, 1998). Os efeitos benéficos destas drogas correlacionam-se com a capacidade em melhorar o perfil lipídico, sobretudo em reduzir os níveis de LDL-colesterol. Além do efeito hipolipidêmico, têm-se demonstrado outras ações destes fármacos, as quais justificam sua utilização em indivíduos portadores de aterosclerose, como por exemplo: melhora na função endotelial e na motricidade vascular, menor resposta inflamatória, manutenção da estrutura da capa fibrosa, diminuição do remodelamento da placa por meio da inibição da proliferação de células musculares lisas, diminuição da agregação plaquetária e da resposta trombogênica em placas instáveis, como também um aumento da atividade fibrinolítica (Cascieri, 2002; Steinberg, 2004).

Os flavonóides são compostos naturais polifenólicos de baixo peso molecular universalmente presentes em vegetais e que são consumidos amplamente na nossa dieta diária. Por possuírem um largo espectro de ação farmacológica, como atividade antioxidante pronunciada sobre a LDL, atividade antitrombótica e conseqüente ação inibidora sobre a formação da placa ateromatosa, estas substâncias apresentam o perfil adequado para a terapia da doença aterosclerótica (Schramm e German, 1998; Harborne e Willians, 2000; Middleton *et al.*, 2000). O consumo de compostos polifenólicos correlaciona-se negativamente com a incidência das doenças cardiovasculares, portanto, cada vez mais estudos estão sendo realizados com o objetivo de se avaliar o efeito da ingestão de flavonóides no desenvolvimento da aterosclerose. Fuhrman, *et al.* (2005), mostrou que o consumo de uma preparação em pó feita de uvas frescas reduz a aterogênese em

camundongos apoE^{-/-}. As uvas são ricas em flavonóides, sendo o resveratrol o principal representante, e o consumo destes compostos polifenólicos explicam o famoso paradoxo francês, isto é, a baixa incidência das doenças cardiovasculares no sul da França, apesar da ingestão de uma dieta rica em gordura saturada, é atribuída ao consumo moderado e regular de vinho tinto pela população. O estudo feito por Fuhrman, *et al.*, 2005, mostrou que a ingestão do pó de uvas por 10 semanas reduz em 41% as lesões ateroscleróticas no arco aórtico de camundongos apoE^{-/-}, efeito este que poderia estar relacionado a capacidade antioxidante dos polifenóis presentes nas uvas. Paralelamente aos efeitos inibitórios marcantes na aterogênese houve uma diminuição na captação de ox-LDL pelos macrófagos e redução no estresse oxidativo nos macrófagos peritoniais e no soro dos animais. Além dos flavonóides encontrados no vinho tinto, os componentes polifenólicos presentes no chá verde também são capazes de prevenir a progressão da aterosclerose em modelos animais, ou seja, retardam a progressão das lesões ateroscleróticas iniciais a placas avançadas, as quais são propensas à ruptura e formação de trombos (Vinson *et al.*, 2004; Miura *et al.*, 2001).

Vários estudos em humanos também mostram uma correlação negativa entre consumo de flavonóides e incidência de aterosclerose. Hertog *et al.*, 1993, avaliou a ingestão de flavonóides em 805 homens com idade entre 65-84 anos por um período de cinco anos e observou que a ingestão diária de flavonóides foi significativamente inversa à mortalidade por doenças cardíacas coronarianas ($p=0,015$) e à ocorrência de infarto agudo do miocárdio ($p=0,08$).

Diante de todas as evidências mostradas pela literatura de que os flavonóides possuem propriedades específicas que poderiam beneficiar a saúde dos homens, principalmente no que diz respeito às doenças cardiovasculares, o nosso trabalho consistiu na avaliação de uma intervenção farmacológica alternativa com o flavonóide diocleína sobre o estresse oxidativo e o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas em camundongos apoE^{-/-}. O camundongo apoE^{-/-} é um modelo de aterosclerose e hiperlipidemia amplamente citado na literatura (Portugal *et al.*, 2004; Peluzio *et al.*, 2003; Peluzio *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2001). Associado aos altos níveis de VLDL circulantes e a formação da placa ateromatosa, este animal apresenta uma disfunção endotelial inata, apresentando um estresse oxidativo elevado e por isso, surge como um modelo interessante para o estudo da relação entre aterosclerose e substâncias com potencial antioxidante, como por exemplo, o flavonóide diocleína (Laursen *et al.*, 2001; Crauwels *et al.*, 2003).

Como os camundongos apoE^{-/-} apresentam alterações no metabolismo lipídico devido a ausência da apoE, que possui m papel chave no *clearance* das lipoproteínas plasmáticas (Davignon *et al.*, 1999), avaliamos primeiramente os parâmetros lipídicos dos animais que foram submetidos ou não ao tratamento com a diocleína. A administração por seis semanas do flavonóide diocleína não foi eficiente para alterar as concentrações plasmáticas de triglicerídeos e de colesterol total nos camundongos em nenhum dos tempos avaliados. Ao contrário do nosso estudo, Rabelo (2004), desenvolveu experimentos com a diocleína com a utilização do mesmo protocolo de tratamento utilizado no nosso estudo, ou seja, administração intraperitoneal de diocleína (4 mg/kg/dia) em camundongos apoE^{-/-} por 6 semanas e observou uma redução na concentração plasmática de colesterol total na última semana de tratamento, o que não foi observado nas semanas anteriores. Apesar dos nossos resultados não estarem de acordo com os de Rabelo (2004), é importante ressaltar que a concentração plasmática de colesterol total pode ser afetada por diversos fatores, como por exemplo, variações na composição da dieta, no que diz respeito à fonte protéica, a qual pode ser derivada da soja ou miúdos de animais e o próprio teor de lipídeos da dieta, que dependendo do produto, também pode ser diferente. Dessa forma, o efeito de um antioxidante, como por exemplo, os flavonóides, pode depender da concentração de outros fatores anti ou proaterogênicos na dieta o que levaria a resultados aparentemente conflitantes como estes encontrados pelo nosso grupo em relação aos camundongos apoE^{-/-}.

Como já é bem mostrada na literatura, a aterogênese também está estreitamente correlacionada com o aumento nos níveis de peroxidação lipídica. Em condições de homeostase, a oxidação da LDL é provavelmente mínima, devido tanto à presença de muitos antioxidantes dietéticos distribuídos no plasma e agregados a esta lipoproteína, como também pela remoção eficiente da LDL através do seu reconhecimento por receptores presentes abundantemente nas células hepáticas (Witztum, 1994; Libby, 2002). Contudo, essa situação pode ser modificada quando há aumento de espécies reativas, sejam de oxigênio ou nitrogênio, estabelecendo um quadro de estresse oxidativo. Uma vez que a modificação oxidativa da LDL nativa, decorrente deste balanço oxidativo, é um ponto chave na gênese da aterosclerose, a proteção desta lipoproteína contra a oxidação pode ser uma estratégia eficaz na prevenção e/ou progressão dos eventos implicados na formação do ateroma (Kita *et al.*, 2001; Rice-Evans *et al.*, 1996; Abuja *et al.*, 1997; Vaya *et al.*, 1997). Sendo assim, a mensuração de marcadores de peroxidação lipídica, figura como uma

excelente ferramenta na caracterização de substâncias que agem como protetores tissulares e plasmáticos dos eventos oxidativos (Esterbauer, 1989; Cascieri, 2002).

No estudo feito por Rabelo (2004), após o período de tratamento com a diocleína, o sangue dos animais foi centrifugado e o plasma foi submetido à oxidação pelo Cu^{2+} , sendo a peroxidação lipídica plasmática avaliada através da produção de dienos conjugados. Nos animais tratados cronicamente com a diocleína, observou-se um prolongamento da fase *Lag* na cinética de oxidação, ou seja, o plasma dos animais tratados com a diocleína foi mais resistente à oxidação pelos íons Cu^{2+} , sugerindo uma possível atividade antioxidante deste flavonóide.

Como Rabelo (2004), verificou um efeito antioxidante da diocleína no plasma dos camundongos, resolvemos avaliar no nosso estudo a peroxidação lipídica a nível hepático e renal, através da mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da dosagem de hidroperóxidos. O princípio da técnica de TBARS é a reação do malonildialdéido, que é formado pela quebra dos ácidos graxos poliinsaturados, com o ácido tiobarbitúrico, e apesar de ser um método amplamente utilizado para se determinar o grau de peroxidação lipídica em tecidos, é muito criticado por ser insensível e pouco específico, uma vez que além do malonildialdéido, outras substâncias como açúcares e aldeídos podem reagir com o ácido tiobarbitúrico comprometendo os resultados. A mensuração da concentração de hidroperóxidos é mais uma técnica utilizada para estimar a peroxidação lipídica e tem sido muito utilizada na literatura por ser um método simples e mais sensível que a técnica de TBARS (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1994). Esta técnica consiste basicamente na oxidação de íons ferroso (Fe^{2+}) a íons férricos (Fe^{3+}), sob condições ácidas, pelos hidroperóxidos. Com os resultados encontrados em nosso estudo não foi possível evidenciar nenhuma proteção contra peroxidação lipídica nos animais apoE^{-/-} que receberam injeções intraperitoniais da diocleína em relação aos animais do grupo controle, sugerindo que apesar de Rabelo (2004), ter encontrado um efeito antioxidante da diocleína no plasma dos camundongos, o mesmo resultado não foi observado quando amostras hepáticas e renais foram analisadas.

Os flavonóides são compostos que apresentam diferentes capacidades antioxidantes, podendo proteger as partículas de LDL da oxidação e, conseqüentemente, inibir o desenvolvimento da ateroscleose. Entretanto, a literatura mostra vários estudos clínicos envolvendo diversos compostos polifenólicos, os quais são muitas vezes inconsistentes. Princen *et al.* (1998), estudaram o efeito do consumo de chá verde e preto nos lipídeos

plasmáticos, nos níveis antioxidantes e na oxidação da LDL em indivíduos fumantes e não observou alterações nos níveis plasmáticos de colesterol total, triglicerídeos, HDL, LDL e nos níveis de vitaminas antioxidantes. Além de não alterar os níveis plasmáticos dos lipídeos, o consumo de chá preto e verde não foi eficiente para alterar os parâmetros de oxidação da LDL.

Como a redução das lesões ateroscleróticas pela ingestão de flavonóides não é necessariamente relacionada por modificações no estresse oxidativo (Waddington *et al.*, 2004) e parâmetros lipídicos, outros possíveis mecanismos como ações antiinflamatórias e vasodilatadoras podem estar envolvidos na inibição do processo aterosclerótico. Apesar de no nosso estudo não termos encontrado evidências de que o tratamento com o flavonóide diocleína altere o perfil lipídico e modifique o estresse oxidativo dos animais, mas baseado em estudos prévios, os quais mostraram que a diocleína apresentou propriedades vasodilatadoras em aorta de ratos (Lemos *et al.*, 1999) e uma possível atividade antioxidante que foi capaz de proteger o plasma de camundongos apoE^{-/-} contra a peroxidação lipídica (Rabelo, 2004), resolvemos estudar o efeito deste flavonóide no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas, as quais foram medidas na raiz aórtica, na aorta abdominal e torácica dos camundongos ao final do experimento.

Com aproximadamente 10 semanas de idade, camundongos apoE^{-/-} alimentados com dieta comercial desenvolvem estrias gordurosas, lesões caracterizadas fundamentalmente por macrófagos repletos de lipídeos, os quais são chamados de *foam cells*. Estas lesões iniciais rapidamente progridem para um estágio intermediário com presença de *foam cells* e células musculares lisas, podendo ser visualizado quando os animais possuem em torno de 15 semanas de idade. Já as lesões avançadas com presença de capa fibrosa e centro necrótico aparecem normalmente por volta de 20 semanas de idade (Meir *et al.*, 2004).

Ao iniciar o nosso estudo os camundongos apoE^{-/-} possuíam aproximadamente oito semanas de idade e conseqüentemente foram sacrificados ao final do experimento com 14 semanas de idade. Ao analisar as lesões ateroscleróticas presentes na válvula aórtica, verificamos que tanto no grupo controle quanto no grupo que foi submetido ao tratamento crônico com a diocleína as lesões caracterizavam-se, na sua maioria, pela presença de estrias gordurosas e células musculares lisas que migraram da camada média da artéria, e assim sendo definidas como lesões ateroscleróticas intermediárias.

Apesar da caracterização das lesões ateroscleróticas estarem de acordo com a literatura, os resultados obtidos no nosso estudo, ao contrário do que seria esperado,

demonstraram que o tratamento por seis semanas com a diocleína na dose de 4 mg/kg/dia não foi suficiente para retardar o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas nos camundongos apoE^{-/-}. O mesmo resultado encontrado na válvula aórtica dos animais, também foi visto após analisar a aorta torácica e abdominal, sugerindo que o flavonóide diocleína não possui nenhum efeito positivo no desenvolvimento das placas ateroscleróticas de camundongos apoE^{-/-} alimentados com dieta comercial. Este fato poderia ser explicado pelo tempo experimental, visto que muitas vezes os efeitos benéficos apresentados por muitos antioxidantes aparecem somente no início do desenvolvimento da lesão aterosclerótica e tornam-se menos pronunciados ao longo do tempo, ou ainda, como os camundongos foram alimentados com dieta comercial e não com dieta aterogênica, a duração do tratamento pode ter sido insuficiente para observarmos qualquer efeito positivo da diocleína na redução da aterogênese.

Embora não tenhamos visto diminuição da aterogênese com a administração da diocleína, o próximo passo no nosso estudo foi avaliar se o tratamento por seis semanas com este flavonóide foi suficiente para modificar os fatores qualitativos que interferem na instabilidade das placas ateroscleróticas, como por exemplo, a quantidade de células inflamatórias e o teor de colágeno. Tanto a quantificação do infiltrado inflamatório como o conteúdo de colágeno presente nas lesões não foram alterados pelo tratamento por seis semanas com a diocleína, confirmando o fato de que o tempo experimental utilizado no nosso estudo não foi eficiente para afetar os parâmetros de instabilidade das lesões ateroscleróticas.

7. CONCLUSÃO:

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, é possível concluir que a administração intraperitoneal do flavonóide diocleína por seis semanas em camundongos deficientes no gene que codifica a apolipoproteína E, não foi eficiente em alterar o perfil lipídico destes animais, além de não apresentar atividade antioxidante no tecido hepático e renal. Além da diocleína não provocar alterações no estresse oxidativo dos camundongos apoE^{-/-}, o nosso estudo também demonstrou que o tratamento crônico com este flavonóide não mostrou nenhum efeito benéfico em diminuir o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas, sugerindo que nas condições experimentais que foram utilizadas neste trabalho a diocleína não apresentou atividade antioxidante suficiente para contrapor ao estresse oxidativo típico do camundongo apoE^{-/-}, e conseqüentemente não foi eficiente em retardar o processo da aterogênese.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABUJA, P.M.; LIEBMANN, P.; HAYN, M.; SCHAUENSTEIN, K.; ESTERBAUER, H. Antioxidant role of melatonin in lipid peroxidation of human LDL. *FEBS Letters*, v.413, p.289-293, 1997.
- AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, v.18, p.75-81, 2002.
- AHMAD, M.S.; FAZAL, F.; RAHMAN, A.; Parish, J.H. Activities of flavonoids for the cleavage of DNA in the presence of Cu(II): Correlation with generation of active oxygen species. *Carcinogenesis*, v.13, p.605-608, 1992.
- ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemical*, v.20, p.470-475, 1974.
- ALMEIDA, A.P.; CORTES, S.F.; FERREIRA, A.L.; LEMOS, V.S. Increase on the coronary flow induced by dioclein in isolated rat heart. *Life Sciences*, v. 70, p.1121-1128, 2002.
- ALVAREZ-LEITE, J.I.; PELUZIO, M.C.G. Lípidos. In. NETO, F. (Ed.). *Nutrição clínica*. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p.7-19, 2003.
- ANDERSON, T.J.; GERHARD, M.D.; MEREDITH, I.T. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *American Journal of Cardiology*, v.75, p.71B - 74B, 1995.
- ARAUJO, J.M.A. *Química de Alimentos: Teoria e Prática*. Viçosa: UFV, 2001. 416p.
- BAHIA, L.; AGUIAR, L.G.K.; VILLELA, N.R.; BOTTINO, D.; BOUSKELA. E. Endotélio e aterosclerose. *Revista da SOCERJ*, v.17, p.26-32, 2004.

- BARTER, P. The inflammation: Lipoprotein cycle. *Atherosclerosis Supplements*, v.6, p.15-20, 2005.
- BATISTA, J.S.; ALMEIDA, R.N.; BHATTACHARYYA, J. Analgesic effect of *Dioclea grandiflora* constituents in rodents. *Journal. Ethnopharmacology*, v.45, p.207-210, 1995.
- BELINKY, P.A.; AVIRAM, M.; MAHMOOD, S.; VAYA, J. Structural aspects of the inhibitory effect of glabridin on LDL oxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, v.9, p.1419-1429, 1988.
- BERLINER, J.A.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A.M.; FRANK, J.S.; DEMER, L.L.; EDWARDS, P.A.; WATSON, A.D.; LUSIS, A.J. Atherosclerosis: basic mechanisms - oxidation, inflammation and genetics. *Circulation*, v. 91, p. 2488 – 2496, 1995.
- BORING, L.;GOSLING, J.; CLEARY, M.; CHARO, I.F. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role of chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*, v.394, p.894-897, 1998.
- BRESLOW, J.L. Mouse models of atherosclerosis. *Science*, v.272, p.685-688, 1996.
- BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, v.232, p.34-47, 1986.
- BROWN, J. A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutation Research*, v.75, p.243-277, 1980.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, v.5, p.749-760, 1997.
- CASCIERI, M.A. The potential for anti-inflammatory therapies for coronary artery disease. *Nature Reviews*, v.1, p.122 -130, 2002.

- CHENG, C.; TEMPEL, D.; HAPEREN, R.V.; BAAN, A., GROSVELD, F.; DAEMEN, M.J.A.P.; KRAMS, R.; CROM, R. Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress. *Circulation*, v.113, p.2744-2753, 2006.
- CHENG, H. Y.; LIN, C. C.; LIN, T. C. Antiviral properties of prodelphinidin B-2 3'-O-gallate from green tea leaf. *Antiviral Chemical Chemotherapy*, v.13, p. 223-9, 2002.
- CHUNG, M.I.; GAN, K.H.; LIN, C.N.; KO, F.N.; TENG, C.M. Antiplatelet effects and vasorelaxing action of some constituents of Formosan plants. *Journal of Natural Products*, v.56, p.929-934, 1993.
- COBBE, S.M.; SHEPHERD, J. Cholesterol reduction in the prevention of coronary heart disease: therapeutic rationale and guidelines. The British Hyperlipidemia Association. *British Heart Journal*, v.69, p.S63-69, 1993.
- CORREA, M.P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas* (Vol. II, III e V). Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.
- CÔRTEZ, S.F., REZENDE, B.A., CORRIU, C., MEDEIROS, I.A., TEIXEIRA, M.M.; LOPES, M.J. Pharmacological evidence for the activation of potassium channels as the mechanism involved in the hypotensive and vasorelaxant effect of dioclein in rat small resistance arteries. *British Journal Pharmacology*, v. 133, p.849-58, 2001.
- COTELLE, N.; BERNIER, J. L.; CATTEAU, J. P.; PORNEMERY, J.; WALLET, J. C.; GAYDOU, E. M. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine*, v.20, p.36-43, 1996.
- COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, p.564-582, 1999.
- CRAUWELS, H.M., VAN HOVE, C.E., HOLVOET, P., HERMAN, A.G.; BULT, H. Plaque-associated endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice on a regular diet. Effect of human apolipoprotein AI. *Cardiovascular Research*, v.59, p.189-199, 2003.

CUSHMAN, M.; NAGARATHNAM, D.; BURG, D. L.; GEAHLEN, R. L. Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activities of flavonoid analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.34, p.798-806, 1991.

DAUGHERTY, A. Mouse models of atherosclerosis. *American Journal of the Medical Sciences*, v. 323, p.3-10, 2002.

DAUGHERTY, A.; RATERI, D.L. Presence of LDL receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptors in macrophages of atherosclerotic lesions from cholesterol-fed New Zealand and heterozygous Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, v.14, p.2017-2024, 1994.

DAVIGNON, J.; COHN, J.S.; MABILE, L.; BERNIER, L. Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. *Clinica Chimica Acta*, v.286, p. 115-143, 1999.

DESCHNER, E.E.; RUPERTO, J.; WONG, G.; NEWMARK, H.L. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*, v.12, p.1193-1196, 1991.

III DIRETRIZES BRASILEIRAS SOBRE DISLIPIDEMIAS E DIRETRIZ DE PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE DO DEPARTAMENTO DE ATEROSCLEROSE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v.77, suplemento III, 2001.

ELANGOVAN, V.; SEKAR, N.; GOVINDASAMY, S. Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene induced tumorigenesis. *Cancer Letters*, v.87, p. 107-113, 1994.

ELLIOTT, A. J.; SCHEIBER, S. A.; THOMAS, C.; PARDINI, R. S. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. A structure-activity study. *Biochemical Pharmacology*, v.44, p.1603-1608, 1992.

- ESTERBAUER, H.; STRIEGL, G.; PUHL, H.; ROTHENEDER, M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Research Communications*, v.6, p.67-75, 1989.
- FAZIO, S.; BABAEV, V.R.; MURRAY, A.B; HASTY, A.H.; CARTER, K.J.; GLEAVES, L.A.; ATKINSON, J.B.; LINTON, M.F. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. *Proceedings of the Natl Academy of Sciences USA*, v.94, p.4647-4652, 1997.
- FAZIO, S.; LINTON, M.F. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Front Biosci.* v.6, p.D515-525, 2001.
- FERRÁNDIZ, M.L.; ALCARAZ, M.J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions*, v.32, p.283-288, 1991.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, v.226, p.497-509, 1957.
- FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical Chemical*, v.28, p.2077-2080, 1992.
- FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. *Methods Enzymol.*, v.58, p.61-97, 1986.
- FUHRMAN, B.; VOLKOVA, N.; COLEMAN, R.; AVIRAM, M. Grape powder polyphenols attenuate atherosclerosis development in apolipoprotein E deficient (E⁰) mice and reduce macrophage atherogenicity. *Journal of Nutrition*, v.135, p.722-728, 2005.
- FUHRMAN, B.; AVIRAM, M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, v.12, p. 41-48, 2001.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v.288, p.373-76, 1980.

- GENEST, J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. *J Inherit Metab Dis.*, v.26, p.267-287, 2003.
- GIL, B.; SANZ, M.J.; TERCENIO, M.C.; FERRÁNDIZ, M.L.; BUSTOS, G.; PAYÁ, M. Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipases A2 and inflammatory responses in mice. *Life Sciences*, v.53, p.333-338, 1994.
- GLASS, K.C.; WITZTUM, L.J. Atherosclerosis: The road ahead review, v.104, p.503 -516, 2001.
- GU, L. *et al.* Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein-deficient mice. *Molecular Cell*, v.2, p.275-281, 1998.
- GUPTA, S., PABLO, A.M., JIANG, X., WANG, N., TALL, A.R., SCHINDLER, C. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *Journal of Clinical Investigation*, v.99, p.2752-2761, 1997.
- HALLIWELL, B. Antioxidants in Human Health and Disease. *Annual. Review of Nutrition*, v.16, p.33-50, 1996.
- HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, v.16, p.845-850, 1994.
- HANSON, G.K.; LIBBY, P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, v.6, p.508-519, 2006.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, p. 481-504, 2000.
- HERTOG, M.; HOLLMAN, P.; KATAN, M.; KROMHOUT, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutrition and Cancer*, v.20, p.21-29, 1993.

- HOFKER, M.H.; VAN VLIJMEN, B.J.; HAVEKES, L.M. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v.137, p.1-11, 1998.
- HOULT, J.S.; MORONEY, M.A.; PAYÁ, M. Action of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase. *Methods Enzymol.*,v.234, p.443-455, 1994.
- JINSART, W.; TERNAI, B.; POLYA, G.M. Inhibition of wheat embryo calcium-dependent protein kinase and avian myosin light chain kinase by flavonoids and related compounds. *Biological Chemistry Hoppe Seyler*, v.372, p.819-827, 1991.
- KAWASHIMA, S.; YOKOYAMA, M. Dysfunction endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v.24, p.998-1005, 2004.
- KIM, J.D.; LIU, L.; GUO, W.; MEYDANI, M. Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.17, p.165-176, 2006.
- KINJO, J.; TSUCHIHASHI, R.; MORITO, K.; HIROSE, T.; AOMORI, T.; NAGAO, T. Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alfa and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.24, p.185-188, 2004.
- KITA, T.; KUME, N.; MINAMI, M.; HAYASHIDA, K.; MURAYAMA, T.; SANO, H.; MORIWAKI, H.; KATAOKA, H.; NISHI, E.; HORIUCHI, H.; ARAI, H.; YOKODE, M. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.947, p.199-206, 2001.
- KLAUSEN, I.C.; SJOL, A.; HANSEN, O.S. Apolipoprotein (a) isoforms and coronary heart disease in men. A nested case-control study. *Atherosclerosis*, v.132, p.77-84, 1997.

- KRIS-ETHERTON, P.M.; LEFEVRE, M.; BEECHER, G.R.; GROSS, M.D.; KEEN, C.L.;
ETHERTON, T.D. Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies
for establishing biological function: The antioxidant and anti-inflammatory effects of
flavonoids on atherosclerosis. *Annual Review of Nutrition*, v.24, p.511-38, 2004.
- LAUGHTON, M.J.; EVANS, P.J.; MORONEY, M.A.; HOULT, J.C.; HALLIWELL, B. Inhibition
of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary
additives: Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochemical
Pharmacology*, v.42, p.1673-1681, 1991.
- LAURSEN, J.B.; SOMERS, M.; KURZ, S.; MCCANN, L.; WORNHOLTZ, A.; FREEMAN, B.
A.; TARPEY, M.; FUKAI, T.; HARRISON, D.G. Endothelial regulation of vasomotion in
apoE-deficient mice: Implications for interactions between peroxynitrite and
tetrahydrobiopterin. *Circulation*, v.103, p.1282-1288, 2001.
- LEMOS, V.S.; FREITAS, M.R.; MULLER, B.; LINO, Y.D.; QUEIROGA, C.E.; CORTES, S.F.
Dioclein, a new nitric oxide- and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. *European
Journal of Pharmacology*, v.386, p.41-46, 1999.
- LI, B.Q.; FU, T.; DONGYAN, Y.; MIKOVITS, J.A.; RUSCETTI, F.W.; WANG, J.M. Flavonoid
baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochemical and Biophysical
Research Communications*, v.276, p.534-8, 2000.
- LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature Reviews*, v. 420, p.868-74, 2002.
- LIMA, A.D. *Plantas da Caatinga*. 1st. ed.. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências,
1989.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with
the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265-275, 1951.
- LUSIS, A.J. Atherosclerosis. *Nature Reviews*, v.407, p.233-241, 2000.

- MABE, K.; YAMADA, M.; OGUNI, I.; TAKAHASHI, T. In vitro and in vivo activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, p.788-1791, 1999.
- MADAMANCHI, N.R.; VENDROV, A.; RUNGE, M.S. Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v.25, p.1-11, 2005.
- MEIR, K.; LEITERSDORF, E. Atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse: a decade of progress. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* v.24, p.1006-1014, 2004.
- MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, v.52, p.673 -751, 2000.
- MIDDLETON, E. J.; KANDASWAMI, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacology*, v.43, p.1167-1179, 1992.
- MIURA, Y.; TOMITA, C.T. et al. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Nutrition*, v.131, p.27-32, 2001.
- NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S.P. Measuremet of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylene orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Analytical Biochemistry*, v.220, p.403-409, 1994.
- OLIVEIRA, D.R.; PORTUGAL, L.R.; CARA, D.C.; VIEIRA, E.C.; ALVAREZ-LEITE, J.I. Gelatin intake increases the atheroma formation in apoE knock out mice. *Atherosclerosis*, v.154, p.71-77, 2001.
- PAIGEN, B.; MORROW, A.; BRANDON, C. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*, v.57, p.65-73, 1985.

- PALINSKI, W.; ORD, V.; PLUMP, A.S; BRESLOW, J.L.; STEINBREG, D.; WITZUM, J.L. Apo E-deficient mice are model of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodis to malondialdehyde-lysine in serum. *Arteriosclerosis and Trombosis*, v.14, p. 605-616, 1994.
- PAREDES, A.; ALZURU, M.; MENDEZ, J.; RODRIGUEZ-ORTEGA, M. Anti-sindbis activity of flavanones hesperetin and naringenin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.26, p.108-9, 2003.
- PELUZIO, M.C.; MIGUEL, E.J.; DRUMOND, T.C.; CESAR, G.C.; SANTIAGO, H.C.; TEIXEIRA, M.M.; VIEIRA, E.C.; ARANTES, R.M.; ALVAREZ-LEITE, J.I. Monocyte chemoattractant protein-1 involvement in the α -tocopherol-induced reduction of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *British Journal of Nutrition*, v.90, p.3-11, 2003.
- PELUZIO, M.C.; HOMEM, A.P.; CESAR, G.C.; AZEVEDO, G.S.; AMORIM, R.; CARA, D.C.; SALIBA, H.; VIEIRA, E.C.; ARANTES, R.E.; ALVAREZ-LEITE, J. Influences of alpha-tocopherol on cholesterol metabolism na fatty streak development in apolipoprotein E-deficient mice fed an atherogenic diet. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.34, p.1539-1545, 2001.
- PLUMP, A.S.; SMITH, J.D.; HAYEK, T.; AALTO-SETALA, K.; WALSH, A.; VERSTUYFT, J.G.; RUBIN, E.M.; BRESLOW, J.L. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, v.71, p.343-353, 1992.
- PORTUGAL, L. R.; FERNANDES, L.R.; CESAR, G.C.; SANTIAGO, H.C.; OLIVEIRA, D.R.; SILVA, N.M.; SILVA, A.A.; LANNES-VIEIRA, J.; ARANTES, R.M.; GAZZINELLI, R.T.; ALVAREZ-LEITE, J.I. Infection with *Toxoplasma gondii* increases atherosclerotic lesion in ApoE-deficient mice. *Infect. Immun.*, v.72, p.3571-6, 2004.

- PRINCEN, H.M.G.; DUYVENVOORDE, W.V.; BUYTENHEK, R.; BLONK, C.; TIJBURG, L.B.M., LANGIUS, J.A.E.; MEINDERS, A.E.; PIJL, H. No Effect of Consumption of Green and Black Tea on Plasma Lipid and Antioxidant Levels and on LDL Oxidation in Smokers. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v.18, p.833-841, 1998.
- RABELO, LUIZA ANTAS. Disfunção endotelial na aterosclerose: papel do peróxido de hidrogênio e tratamento preventivo com o flavonóide diocleína. 2004. 147 f. Tese (Doutorado em Fisiologia e Biofísica) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.
- RABELO, L.R.; CORTES, S.F.; ALVAREZ-LEITE, J.I.; LEMOS, V.S.; Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H₂O₂. *British Journal of Pharmacology*, v.138, p.1215-1220, 2003.
- RADER, D.J.; WILSON, J.M. Gene therapy for lipid disorders. In: HARBER, E. (Ed.). *Molecular cardiovascular medicine*. New York: Scientific american, p.97-114, 1995.
- RENAUD, S.; De LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, v.339, p.1523-1526, 1992.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, v.20, p.933-956, 1996.
- ROSS, R. Atherosclerosis, an overview. In: HABER, E. (Ed.). *Molecular cardiovascular medicine*. New York: Scientific American, p.11-30, 1995.
- RUMP, A.F.; SCHUSSLER, M.; ACAR, D.; CORDES, A.; RATKE, R.; THEISOHN, M.; ROSEN, R.; KLAUS, W.; FRIECKE, U. Effects of different inotropes with antioxidant properties on acute regional myocardial ischemia in isolated rabbit hearts. *Gen. Pharmacology*, v.26, p.603-611, 1995.

- SCARTEZINI, M.; LOPES, L.M.; IHARA, S.S.M.; PICHETH, G.; LOPES, I.E.L.; MARTINEZ, T.L.R. Metabolismo de lípidos e lipoproteínas. In: MARTINEZ, T. (Ed.). *Conduitas clínicas nas dislipidemias*. Belo Horizonte: Health, p.25-40,1997.
- SCHRAMM, D.D.; GERMAN, J.B. Pontential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v.9, p.560-566, 1998.
- SCOTT, J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Current Opinion in Genetics and Development*, v.14, p.271-279, 2004.
- SHEU, J.R.; HSIAO, G.; CHOU, P.H.; CHEN, M.Y.; CHON, D.S. Mechanisms Involved in the Antiplatelet Activity of Rutin, a Glycoside of the Flavonol Quercetin, in Human Platelets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p. 4414-4418, 2004.
- SIESS, M.H.; LECLERC, J.; CANIVENC-LAVIER, M.C.; RAT, P.; SUSCHETET, M. Heterogenous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.130, p.73-78, 1995.
- STEINBERG, D. An interpreted history of the cholesterol controversy. *The Journal of Lipid Research*, v. (online), 2004
- STEINBERG D.; LEWIS A. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*, v.95, p.1062-71, 1997.
- SWIES, J.; ROBAK, J.; DABROWSKI, L.; DUNIEC, Z.; MICHALSKA, Z.; GRYGLEWSKI, R.J. Antiaggregatory effects of flavonoids in vivo and their influence on lipoxygenase and cyclooxygenase in vitro. *Polish Journal of Pharmacology*, v.36, p.455-463, 1984.
- TERAO, J.; PISKULA, M.; YAO, Q. Protective effect of epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.308, p.278-284, 1994.

- TZENG, S.H.; KO, F.N.; TENG, C.M. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thrombosis Research*, v.64, p.91-100, 1991.
- VALACHOVICOVA, T.; SLIVOVA, V.; SLIVA, D. Cellular and physiological effects of soy flavonoids. *Mini Review of Medicinal and Chemistry*, v.4, p.881-7, 2004.
- VANDERLAAN, A.P.; REARDON, A.C.; GETZ, S.G. Site specificity of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v.24, p.12-22, 2004.
- VAYA, J.; BELINKY, P.A.; AVIRAM, M. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, v.23, p.302-13, 1997.
- VISON, J.A.; TEUFEL, K.; WU, N. Green and black teas inhibit atherosclerosis by lipid, antioxidant, and fibrinolytic mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p.3661-3665, 2004.
- ZHANG, K.; YANG, E.B.; TANG, W.Y.; WONG, K.P.; MACK, P. Inhibition of glutathione reductase by plant polyphenols. *Biochemistry Pharmacology*, v.54, p.1047-53, 1997.
- WADDINGTON, E.; PUDDEY, I.B.; CROFT, K.D. Red wine polyphenolic compounds inhibit atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice independently of effects on lipid peroxidation. *American Journal Clinical Nutrition*, v.79, p.54-61, 2004.
- WALLIN, B.; ROSENGREN, B.; SHERTZER, H.G.; CAMEJO, G. Lipoprotein oxidation and measurements of thiobarbituric acid reacting substances formation in single micrititer plate: its use of evaluation of antioxidants. *Analytical Biochemistry*, v.208, p.10-15, 1993.
- WEBER, J.M.; RUZINDANA-UMUNYANA, A.; IMBEAULT, L.; SIRCAR, S. Inhibition of adenovirus infection and adenain by green tea catechins. *Antiviral Research*, v.58, p.167-73, 2003.

WHO, World Health Organization. Cardiovascular diseases. www.who.int/cardiovascular diseases, em 10/10/2006.

WITZTUM, J.L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet*, v.344, p.793-795, 1994.

WITZTUM, J.L.; STEINBERG, D. Role of oxidized low protein in atherosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, v.88, p.1785-1792, 1991.

YANG, Y.; LOSCALZO, J. Regulation of Tissue Factor Expression in Human Microvascular Endothelial Cells by Nitric Oxid. *Circulation*, v.101, p.2144-148, 2000.

9. ANEXO:

ANEXO A – Certificado de aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em experimentação Animal – CETEA


UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 107/2005**, relativo ao projeto intitulado: "*Papel do flavonóide diocleína no desenvolvimento de aterosclerose em camundongos deficientes no gene que codifica a apolipoproteína E*", que tem como responsável **Jacqueline Isaura Alvarez Leite**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo *Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)*, tendo sido aprovado na reunião de **4 / 10 / 2006**.

Este certificado expira-se em **4 / 10 / 2011**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 107/2005**, related to the project entitled "*The role of the flavonoid dioclein on atherosclerosis development in apoE Knockout mice*", under the supervision of **Jacqueline Isaura Alvarez Leite**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the *Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)*, and was approved in **October 4, 2006**.

This certificate expires in **October 4, 2011**.

Belo Horizonte, 27 de Outubro de 2006.



Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 8827 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4510 – Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/etica/cetea - cetea@ppg.ufmg.br

