

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Mariana Appel Hort

**DISSELENETO DE DIFENILA: UM COMPOSTO ORGÂNICO  
DE SELÊNIO COM PROPRIEDADES ANTIATEROGÊNICAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.  
Orientador: Profa. Dr.<sup>a</sup>. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau  
Co-orientador: Profa. Dr.<sup>a</sup>. Andreza Fabro de Bem

**Florianópolis**

**2011**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

H821d Hort, Mariana Appel

Disseleneto de difenila [tese] : um composto orgânico de selênio com propriedades antiaterogênicas/ Mariana Appel Hort ; orientadora, Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau. - Florianópolis, SC, 2011.

117 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Aterosclerose. 3. Composto orgânico. 4. Estresse Oxidativo. 5. Inflamação. I. Nicolau, Rosa Maria Ribeiro do Valle. II. Universidade Federal de Santa Catarina - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

Dedico este trabalho aos meus pais, Augusto e Ligia, minha fonte inspiradora, pelo amor e apoio incondicional.



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Augusto e Ligia, pelo amor, carinho, paciência, confiança e incentivo. Por me ensinarem que é preciso luta e dedicação para alcançar os objetivos.

Ao meu irmão Alexandre, por todo amor e carinho, e por sempre acreditar no meu potencial. A toda a minha família pelo incentivo durante estes anos.

A minha orientadora, Rosa Maria, pelos ensinamentos durante todos estes anos de convívio, desde a minha iniciação científica até o doutorado.

A minha co-orientadora Andreza, por toda a dedicação, auxílio, paciência e incentivo, pela troca de idéias e conhecimento durante a realização deste estudo.

Aos professores Marta Helena Krieger, Tatiana Emanuelli, Giles Alexander Rae, José Eduardo da Silva Santos e Jamil Assreuy, pela atenção dispensada na leitura da tese e pelas valiosas sugestões para o aprimoramento desta versão final.

Aos amigos e colegas que passaram pelo Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais: Silvia, Jarbas, Lara, Suelen, Mariana, Mabel, Eduardo, Tamirys, Marcela, Karin, Paulinho, Janice e Bia, pela amizade e agradável convívio, e especialmente a Andreza, Paula e Christiane, pela contribuição especial durante a realização deste estudo.

Aos colegas do Laboratório de Bioenergética de Estresse Oxidativo, especialmente ao Marcos e a Jade, pela amizade e auxílio durante a realização da parte experimental.

A professora Marta Helena Krieger da Unicamp, por ter nos fornecido as matrizes de camundongos LDLr  $-/-$ , e a sua aluna Amaryllis, por ter me ensinado a técnica para a análise da lesão aterosclerótica.

A Dra. Claudia Pinto Figueredo, pelos ensinamentos sobre a análise imunistoquímica.



Aos técnicos do LAMEB, Bibiana e Dênis, pela disponibilidade e auxílio na utilização do citômetro de fluxo e espectrofluorímetro.

A técnica Chirle do FluorBeg e a Elisângela, pelo auxílio na utilização do microscópio de fluorescência e captura de imagens.

Ao Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha da UFSM, pelo fornecimento do Disseleneto de Difenila.

Aos amigos da Farmacologia, especialmente a Rafaela, pela amizade sincera e por toda a ajuda e companheirismo durante estes últimos anos. Aos amigos “extra Farmacologia”, que tornaram minha vida mais alegre e divertida.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Farmacologia, responsáveis pela minha formação acadêmica.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia.

Ao CNPq e Capes pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.





## RESUMO

A aterosclerose é uma doença progressiva caracterizada pelo acúmulo de lipídios e elementos fibrosos nas artérias de médio e grande calibre. As doenças cardiovasculares decorrentes da aterosclerose, dentre elas o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular cerebral, são a principal causa de mortalidade e morbidade mundial. O estresse oxidativo e a deficiência da enzima glutatona peroxidase (GPx) possuem um importante papel no desenvolvimento da aterosclerose. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do disseleneto de difenila (DD), um composto orgânico de selênio, em modelos experimentais de aterosclerose, *in vivo* e *in vitro*. O tratamento com baixas doses de DD (0,1 e 1 mg/kg/dia, v.o.) por 30 dias reduziu a formação de lesões ateroscleróticas em camundongos com deleção gênica para o receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDLr  $-/-$ ) submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica. Esta redução foi acompanhada por melhora na vasodilatação dependente do endotélio, diminuição da expressão de 3-nitrotirosina e malondialdeído (marcadores de estresse oxidativo), redução da razão colesterol não-HDL/HDL, diminuição da infiltração de células inflamatórias na lesão e dos níveis sistêmicos de MCP-1. Em cultura de células endoteliais de aorta bovina (BAECs), o pré-tratamento por 24 horas com DD (0,5 e 1  $\mu$ M) atenuou a apoptose induzida por LDL humana isolada associada à diminuição da formação de EROs e o consumo de GSH, e restabelecer o aumento do potencial de membrana mitocondrial. Os estudos em macrófagos murinos da linhagem J774 expostos a oxLDL (100  $\mu$ g/mL), demonstraram que o DD (1  $\mu$ M) reduziu significativamente a formação de células espumosas, a produção de EROs e de mediadores inflamatórios (MCP-1 e TNF- $\alpha$ ). Este conjunto de resultados revela o potencial antiaterogênico do DD, tanto em modelos experimentais *in vivo* quanto *in vitro*. Os efeitos demonstrados pelo composto sugerem ser relacionados às suas propriedades antioxidante, mimética da GPx e anti-inflamatória.

**Palavras-chave:** aterosclerose, disseleneto de difenila, estresse oxidativo, inflamação.



## ABSTRACT

Atherosclerosis is a progressive disease characterized by the accumulation of lipid and fibrous elements in large and medium sized arteries. Cardiovascular diseases associated with atherosclerosis (e.g. myocardial infarction and stroke) are the major global causes of mortality and morbidity. Oxidative stress and glutathione peroxidase (GPx) deficiency has been implicated in the development of atherosclerotic lesions. The present study analyzed the potential of diphenyl diselenide (DD), a simple organoselenium compound, in reducing atherosclerotic indices *in vivo* and *in vitro* experimental models. Herein, we demonstrate that oral treatment with low doses of DD (0.1 and 1 mg/kg/day, o.p.) potently reduced the formation of atherosclerotic lesions in hypercholesterolemic LDL receptor knockout (LDLr *-/-*) mice. This reduction was accompanied by significant improvement of endothelium-dependent vasorelaxation, decreased ratio non-HDL/HDL, lowered 3-nitrotyrosine and MDA levels, decreased infiltration of the vessel wall by inflammatory cells and prevention of upregulation of the proatherogenic monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). In bovine aortic endothelial cells (BAECs), pre-treatment with DD (0.5 and 1  $\mu$ M) attenuated the oxLDL-induced apoptosis by decreasing ROS generation and GSH depletion and restoring the mitochondrial membrane potential. Studies in J774 macrophage-like cells showed that DD (1  $\mu$ M) significantly decreased oxLDL-induced formation of foam cells and the generation of ROS and inflammatory mediators (MCP-1 e TNF- $\alpha$ ). Our results reveal the antiatherogenic actions of DD in experimental models *in vivo* and *in vitro*. These effects could be related with antioxidant, GPx-mimetic and anti-inflammatory properties.

**Keywords:** atherosclerosis, diphenyl diselenide, oxidative stress, inflammation.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Recrutamento e ativação de macrófagos, e formação do ateroma.....	3
<b>Figura 2:</b>	Progressão do ateroma.....	4
<b>Figura 3:</b>	Fontes de espécies reativas e sistemas de defesa antioxidante em células vasculares.....	7
<b>Figura 4:</b>	Ciclo catalítico da glutatona peroxidase.....	8
<b>Figura 5:</b>	Estrutura química e mecanismo catalítico de organoselênios.....	11
<b>Figura 6:</b>	Efeito da dieta hipercolesterolêmica sobre a lesão aterosclerótica na aorta proximal ascendente de camundongos LDLr -/-.....	31
<b>Figura 7:</b>	Efeito do tratamento com DD sobre a lesão aterosclerótica induzida pela dieta hipercolesterolêmica em camundongos LDLr -/-.....	34
<b>Figura 8:</b>	Efeito do tratamento com DD sobre os marcadores de estresse oxidativo (3-nitrotirosina, NT e malondialdeído, MDA) em camundongos LDLr -/- submetidos à dieta hipercolesterolêmica.....	36
<b>Figura 9:</b>	Efeito do tratamento com DD sobre a resposta contrátil e vasodilatadora em anéis de aorta torácica isolada de camundongos LDLr -/- submetidos à dieta hipercolesterolêmica.....	38
<b>Figura 10:</b>	Efeito do tratamento com DD sobre a infiltração macrófagos e níveis plasmáticos de MCP-1 em camundongos LDLr -/- submetidos à dieta hipercolesterolêmica.....	40
<b>Figura 11:</b>	Efeito do DD (0,1 – 100 $\mu$ M) sobre a viabilidade celular em células endoteliais de aorta bovina (BAECs).....	41
<b>Figura 12:</b>	Efeito do DD sobre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) induzida por oxLDL em BAECs.....	43
<b>Figura 13:</b>	Efeito do DD sobre os níveis intracelulares de GSH em BAECs estimuladas com oxLDL.....	44
<b>Figura 14:</b>	Efeito do DD sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em BAECs estimuladas com oxLDL.....	45
<b>Figura 15:</b>	Efeito do DD sobre a apoptose induzida pela oxLDL em BAECs.....	47



<b>Figura 16:</b>	Efeito do DD sobre a formação de células espumosas em macrófagos murinos J774 expostos a oxLDL.....	49
<b>Figura 17:</b>	Efeito do DD sobre a produção EROs em macrófagos murinos J774 estimulados com oxLDL..	50
<b>Figura 18:</b>	Efeito do DD sobre a produção de TNF- $\alpha$ e MCP-1 em macrófagos murinos J774 estimulados com oxLDL.....	51
<b>Figura 19:</b>	Possíveis mecanismos de ação do disseleneto de difenila (DD) sobre a aterosclerose.....	66





## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Propriedades farmacológicas do disseleneto de difenila em diferentes modelos experimentais.....	12
<b>Tabela 2:</b>	Grupos experimentais.....	18
<b>Tabela 3:</b>	Efeito da dieta hipercolesterolêmica sobre a variação de peso (peso final–inicial) e lipídeos plasmáticos de camundongos LDLr -/-.....	30
<b>Tabela 4:</b>	Efeito da dieta hipercolesterolêmica sobre a resposta contrátil e vasorrelaxante em anéis de aorta torácica isolada em camundongos LDLr -/-.....	30
<b>Tabela 5:</b>	Efeito do tratamento com DD sobre a variação de peso (peso final – inicial) e lipídeos plasmáticos de camundongos LDLr -/- submetidos à dieta hipercolesterolêmica.....	33



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
$\cdot\text{NO}$	Óxido nítrico
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxil
apoB-100	Apolipoproteína B-100
apoE -/-	Camundongo nocaute para apolipoproteína E
ARE	Elementos de resposta antioxidante
BAECs	Células endoteliais de aorta bovina
bcl-2	Proteína anti-apoptótica descrita em célula B de linfoma 2
CCR-2	Receptor de quimiocina MCP-1
CD36	Receptor <i>scavenger</i> CD36
CT	Colesterol total
DAB	3,3´diaminobenzidina
DCFH-DA	2',7'- Diclorodiidrofluoresceína
DCV	Doença cardiovascular
DD	Disseleneto de difenila
DL50	Dose letal 50%
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC50	Concentração efetiva 50%
ELISA	Ensaio imunoenzimático
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fas	Receptor de morte da via extrínseca de apoptose
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa redutase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HC	Hipercolesterolêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG CoA	Hidroximetilglutaril coenzima A
HOCl	Ácido hipocloroso
IBA-1	Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1



IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IL-1	Interleucina-1
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
INF- $\gamma$	Interferon gama
JC-1	5,5',6,6'-tetracloro- 1,1',3,3'- tetraetilbenzimidazolilcarbocianina iodado
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLr -/-	Camundongo nocaute para o receptor de LDL
LOX-1	Receptor de LDL oxidada
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos - 1
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
MDA	Malondialdeído
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NADPH	Dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina reduzida
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear $\kappa$ B
NOS	Óxido nítrico sintase
Nrf-2	Fator nuclear eritróide 2
NT	3-nitrotirosina
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical ânion superóxido
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
oxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PBS	Salina tamponada com fosfato
Se-OH	Selenol
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
SRA	Receptor <i>scavenger A</i>
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral – alfa
TNFR	Receptor de fator de necrose tumoral
VCAM-1	Molécula de adesão vascular - 1
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Doenças cardiovasculares.....	1
1.2 Aterosclerose.....	1
1.2 Fração LDL do colesterol e aterosclerose.....	4
1.3 Estresse oxidativo e aterosclerose.....	5
1.5 Glutathiona peroxidase e aterosclerose.....	8
1.6 Compostos orgânicos de selênio.....	9
1.6.1 Disseleneto de difenila.....	10
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
2.1 Objetivo geral.....	14
2.1 Objetivos específicos.....	14
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1 Disseleneto de difenila.....	15
3.2 Ensaios <i>in vivo</i> .....	15
3.2.1 Animais.....	15
3.2.2 Validação do protocolo para avaliação da aterosclerose induzida pela dieta hipercolesterolêmica em camundongos LDLr -/-.....	16
3.2.2.1 Determinação de lipídios plasmáticos: colesterol total, lipoproteínas e triglicerídeos.....	16
3.2.2.2 Análise histológica da lesão aterosclerótica.....	16
3.2.2.3 Reatividade vascular em anéis de aorta torácica isolada.....	17
3.2.3 Avaliação do efeito do disseleneto de sobre a aterosclerose experimental em camundongos LDLr -/-.....	17
3.2.3.1 Medida da área da lesão aterosclerótica - análise histológica.....	18
3.2.3.2 Reatividade vascular em anéis de aorta torácica isolada.....	19
3.2.3.3 Imunoistoquímica.....	19
3.2.3.4 Determinação da proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1) no plasma.....	20
3.3 Ensaios <i>in vitro</i> .....	21
3.3.1 Isolamento da lipoproteína de baixa densidade (LDL) humana.....	21
3.3.2 Oxidação da LDL.....	21
3.3.3 Ensaios utilizando cultura primária de células endoteliais de aorta bovina (BAECs).....	21
3.3.3.1 Ensaio de citotoxicidade celular.....	22





3.3.3.2 Medida da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	23
3.3.3.3 Determinação da concentração intracelular de glutathiona reduzida (GSH).....	24
3.3.3.4 Medida do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).....	24
3.3.3.5 Avaliação da apoptose e necrose.....	25
3.3.4 Ensaio utilizando cultura de macrófagos murinos da linhagem J774.....	26
3.3.4.1 Ensaio de formação de células espumosas.....	26
3.3.4.2 Medida da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	27
3.3.4.3 Quantificação da produção de citocinas: fator de necrose tumoral- $\alpha$ e proteína quimiotática para monócitos-1.....	27
3.4 Drogas e reagentes.....	28
3.5 Análise estatística.....	28
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
4.1 Ensaio <i>in vivo</i> .....	29
4.1.1 Avaliação da aterosclerose induzida pela dieta hipercolesterolêmica em camundongos LDLr -/-.....	29
4.1.2 Efeito do disseleneto de difenila sobre a aterosclerose experimental induzida pela dieta hipercolesterolêmica em camundongos LDLr -/-.....	32
4.1.2.1 Efeito do disseleneto de difenila sobre o peso corporal e lipídios plasmáticos em camundongos LDLr -/- submetidos à dieta hipercolesterolêmica.....	32
4.1.2.2 Efeito do disseleneto de difenila sobre a área de lesão aterosclerótica induzida pela dieta hipercolesterolêmica em camundongos LDLr-/-.....	33
4.1.2.3 Efeito do disseleneto de difenila sobre os marcadores de estresse oxidativo na lesão aterosclerótica em camundongos LDLr -/- submetidos à dieta hipercolesterolêmica.....	35
4.1.2.4 Efeito do disseleneto de difenila sobre a reatividade vascular em aorta torácica isolada de camundongos LDLr -/- submetidos à dieta hipercolesterolêmica .....	37
4.1.2.5 Efeito do disseleneto de difenila sobre marcadores inflamatórios circulantes e na lesão aterosclerótica induzidos pela dieta hipercolesterolêmica em camundongos LDLr -/-.....	39
4.2 Ensaio <i>in vitro</i> utilizando cultura de células endoteliais de aorta bovina (BAECs).....	41



4.2.1 Avaliação da citotoxicidade do disseleneto de difenila sobre células endoteliais de aorta bovina (BAECs).....	41
4.2.2 Efeito do disseleneto de difenila sobre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em BAECs estimuladas com oxLDL.....	42
4.2.3 Efeito do disseleneto de difenila sobre a concentração intracelular de GSH em BAECs estimuladas com oxLDL.....	43
4.2.4 Efeito do disseleneto de difenila sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em BAECs estimuladas com oxLDL.....	44
4.2.5 Efeito do disseleneto de difenila sobre a apoptose induzida por oxLDL em BAECs.....	46
4.3 Ensaio <i>in vitro</i> utilizando cultura de macrófagos murinos J774.....	48
4.3.1 Efeito do disseleneto de difenila sobre a formação de células espumosas induzida pela oxLDL em macrófagos murinos J774.....	48
4.3.2. Efeito do disseleneto de difenila sobre a geração de EROs induzida pela oxLDL em macrófagos murinos J774.....	49
4.3.3. Efeito do disseleneto de difenila sobre a produção de citocinas inflamatórias em macrófagos J774 estimulados com oxLDL.....	50
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doenças cardiovasculares

Atualmente, as doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no mundo. Estima-se que 17,1 milhões de pessoas morrem anualmente de DCV, representando 29% do total de mortes. Deste número, aproximadamente 7,2 milhões são devido à doença arterial coronariana e 5,7 milhões ao infarto do miocárdio (WHO, 2004). Segundo a Associação Americana de Cardiologia, no ano de 2006, uma a cada 2,9 mortes nos Estados Unidos foi decorrente de DCV (Lloyd-Jones et al., 2010). Nos últimos anos, presenciamos um declínio razoável da mortalidade por DCV em países desenvolvidos, enquanto elevações relativamente rápidas e substanciais desses índices têm ocorrido em países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil (Sposito et al., 2007). De acordo com as projeções da Organização Mundial de Saúde, esta tendência de elevação tende a persistir, agravando ainda mais o quadro de morbidade e mortalidade alto nestes países (WHO, 2004).

A aterosclerose é a principal causa da maioria das DCVs que incluem a doença arterial coronariana, arteriopatas periféricas, aneurisma abdominal, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (Hansson et al., 2006).

## 1.2 Aterosclerose

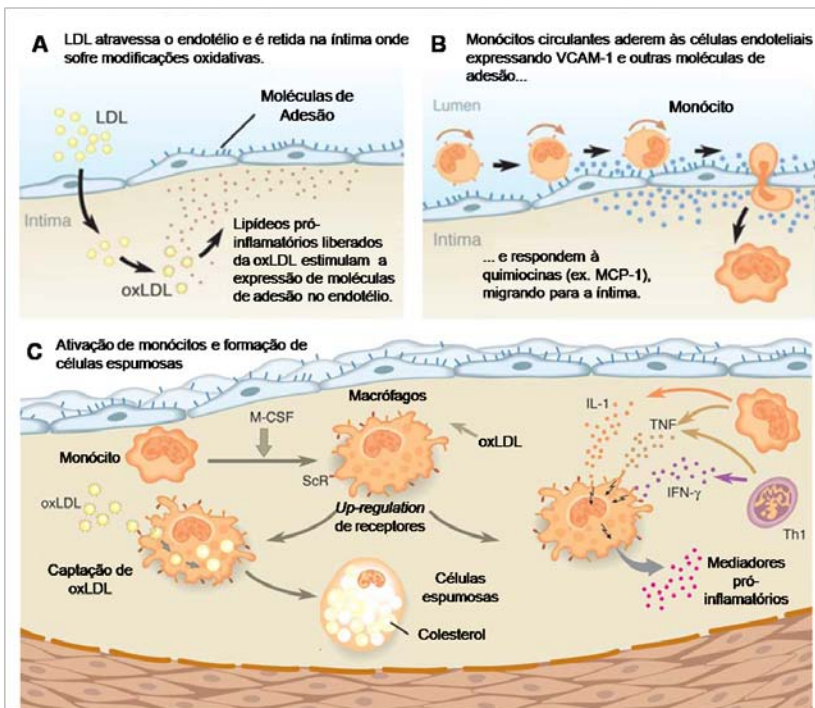
A aterosclerose é uma doença progressiva caracterizada pelo acúmulo de lipídios no interior dos macrófagos, nas artérias de grande e médio calibre. Essa deposição leva à proliferação de certos tipos celulares no interior da parede arterial, que gradualmente invadem o lúmen vascular e comprometem o fluxo sanguíneo (Stocker e Keaney, 2004).

A relação entre lipídios e a aterosclerose dominou os estudos acerca desta patologia até meados de 1970. Fortes evidências experimentais e clínicas apontavam para uma estreita ligação entre a hipercolesterolemia e o ateroma (Libby, 2002). Entretanto, na década de 90 a aterosclerose foi reconhecida como uma doença inflamatória crônica que pode ter componentes infecciosos ou autoimunes (Ross, 1999; Hansson e Libby, 2006).

As lesões iniciais ocorrem especialmente nas bifurcações e curvaturas das artérias, locais onde o fluxo sanguíneo ocorre de maneira

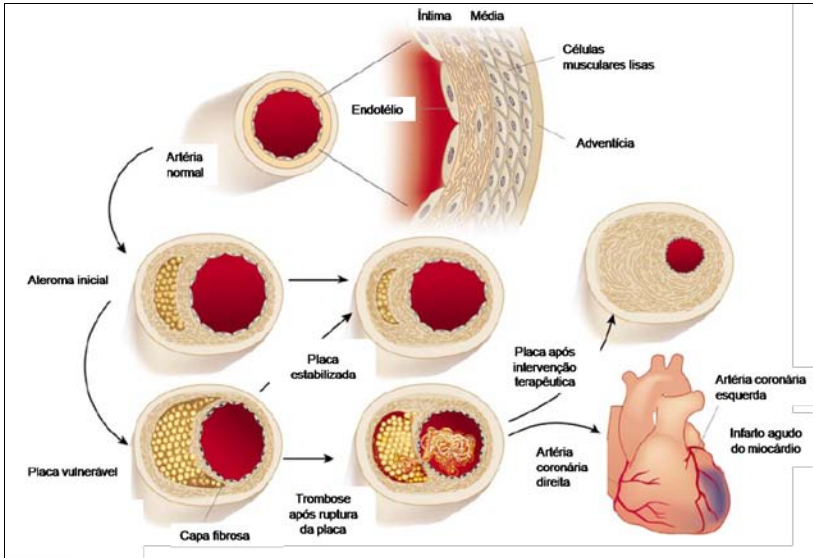
turbilhonada e desorientada (Ross, 1999; Lusis, 2000). O processo aterosclerótico se inicia com uma disfunção endotelial, favorecendo o surgimento de uma resposta inflamatória que resulta em aumento da permeabilidade vascular aos leucócitos, lipídios e plaquetas circulantes (Kadar e Glasz, 2001). As principais causas da disfunção endotelial incluem múltiplos mecanismos: níveis elevados de lipoproteínas de baixa densidade (LDL); espécies reativas geradas pelo tabagismo, hipertensão e diabetes; concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína e alguns tipos de microrganismos, como o vírus da herpes e *Chlamydia pneumoniae*; além de combinações destes fatores (Ross, 1999; Lusis, 2000).

O primeiro estágio da aterosclerose é o aparecimento de estrias gordurosas, as quais originam ao ateroma (Stary, 1990). Este processo inicia-se com a passagem da LDL pela camada endotelial (Ross, 1999). Na íntima do vaso, as LDLs sofrem modificações oxidativas através de ação enzimática ou não enzimática, levando à liberação de fosfolipídios bioativos que podem ativar as células endoteliais. As células endoteliais ativadas expressam vários tipos de moléculas de adesão para leucócitos (principalmente molécula de adesão vascular – 1, VCAM-1), que promovem o rolamento e adesão destas células na superfície vascular. Após a adesão à camada endotelial, os leucócitos transmigram para a íntima em resposta a estímulos quimioatraentes, incluindo quimiocinas, dentre elas a MCP-1 (proteína quimiotática para monócitos-1), que recruta monócitos circulantes para o local da lesão (Hansson et al., 2006). Na íntima, os monócitos se diferenciam em macrófagos e iniciam a captação das lipoproteínas oxidadas através dos receptores *scavenger* levando à formação das células espumosas (Brown e Goldstein, 1983; Ross, 1999) (Figura 1). As células espumosas produzem fatores de crescimento que induzem a migração de células musculares lisas da camada média para a íntima e sua subsequente proliferação, convertendo a estria gordurosa em ateroma. As células musculares lisas podem ainda produzir matriz extracelular, que leva à formação da capa fibrosa (Glass e Witztum, 2001). Em estágios posteriores da doença podem ocorrer calcificação e continuação da fibrose. A capa fibrosa formada cerca o centro do ateroma, rico em lipídios e que também pode conter células mortas ou em apoptose (núcleo necrótico da lesão) (Libby et al., 1996).



**Figura 1: Recrutamento e ativação de macrófagos, e formação do ateroma.** INF- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ); IL-1 (Interleucina-1); MCP-1 (Proteína quimiotática para monócitos-1); M-CSF (Fator estimulador de colônia de macrófagos); oxLDL (LDL oxidada); ScR (Receptores *scavenger*); Th1 (Linfócito T helper 1); TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral- $\alpha$ ) e VCAM-1 (Molécula de adesão vascular-1) (Adaptado de Hansson et al., 2006).

Quanto à classificação, as placas ateroscleróticas podem ser divididas em estáveis ou vulneráveis à ruptura. As placas estáveis possuem um pequeno núcleo lipídico, uma densa camada fibrosa e poucas células inflamatórias; enquanto as placas vulneráveis apresentam uma fina capa fibrosa e número elevado de células inflamatórias (Lusis, 2000; Stocker e Keane, 2004). A ruptura desta capa fibrosa expõe o material lipídico altamente trombogênico, levando à formação de um trombo sobrejacente. Este processo é conhecido por aterotrombose, e é um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose (Libby, 2002) (Figura 2).



**Figura 2: Progressão do ateroma.** No ateroma inicial, o recrutamento de células inflamatórias e o acúmulo de lipídios promovem uma expansão da parede arterial em direção ao lúmen do vaso. Se as condições inflamatórias e os fatores de risco, tais como a dislipidemia, persistirem, o núcleo lipídico aumenta e a capa fibrosa torna-se menos espessa, formando uma lesão vulnerável e susceptível à ruptura. Quando esta ruptura acontece, o sangue entra em contato com o conteúdo da lesão promovendo a formação de um trombo, que pode por sua vez obstruir o vaso de maneira persistente e resultar em infarto agudo do miocárdio (Adaptado de Libby, 2002).

### 1.3 Fração LDL do colesterol e aterosclerose

As lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) são as lipoproteínas plasmáticas que transportam o colesterol e estão entre os agentes causadores da aterosclerose (Lusis, 2000). As LDLs são constituídas por uma porção lipídica, composta principalmente por colesterol e uma única proteína - a apolipoproteína B-100 (apo B-100), e são responsáveis pelo fornecimento de colesterol para os tecidos periféricos. As células captam as LDLs através de receptores B/E que reconhecem a parte protéica da lipoproteína (Champe e Harvey, 1997). A expressão destes receptores no fígado é a principal responsável pelos níveis de colesterol no sangue e depende da atividade da enzima hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, que é a enzima chave para a síntese do colesterol hepático (Sposito et al., 2007).



A associação entre o colesterol LDL e a aterosclerose foi estabelecida, em parte, com base em estudos sobre a hipercolesterolemia familiar, uma doença autossômica dominante que afeta uma em cada 500 pessoas da população geral. No ano de 1985, os pesquisadores americanos Michael Brown e Joseph Goldstein conquistaram o prêmio Nobel de Medicina por caracterizarem o receptor de LDL e atribuírem à deficiência genética deste receptor a causa da hipercolesterolemia familiar. Heterozigotos para esta doença manifestam uma elevação de duas a cinco vezes nos níveis plasmáticos de LDL, em função de um prejuízo funcional do receptor de LDL, resultando em uma deficiência na depuração sanguínea desta lipoproteína. Os indivíduos homozigotos apresentam um aumento de quatro a seis vezes no colesterol plasmático e desenvolvem aterosclerose precocemente (Gotto e Grundy, 1999, Steinberg, 2002).

Atualmente, os fármacos utilizados para o tratamento da aterosclerose objetivam a redução da hipercolesterolemia. A principal classe de medicamentos utilizados para este fim são as estatinas (inibidores da HMG-CoA redutase), que podem ser administradas em associação à ezetimiba, colestiramina e eventualmente aos fibratos ou ácido nicotínico (Sposito et al., 2007). Os efeitos benéficos das estatinas são mediados em parte por sua ação hipolipemiante. Entretanto, evidências suportam a existência de outros mecanismos de ação, como aumento do número e atividade dos receptores de LDL nos hepatócitos, aumento da estabilidade da placa, redução da formação de trombo e diminuição do processo inflamatório (Galkina e Ley, 2009).

#### **1.4 Estresse oxidativo e aterosclerose**

Um grande número de evidências em modelos animais tem demonstrado que fatores de risco comuns para a aterosclerose aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) nas células endoteliais, musculares lisas e da camada adventícia (Harrison et al., 2003).

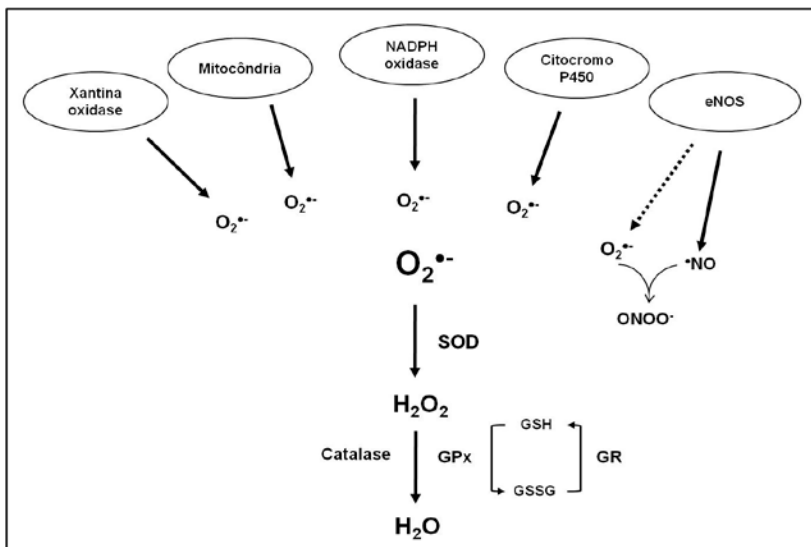
As EROs mais relevantes e deletérias originadas nos sistemas biológicos incluem o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxil ( $^{\bullet}OH$ ), o óxido nítrico ( $^{\bullet}NO$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) e o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) (Halliwell e Gutteridge, 1999). Vários sistemas enzimáticos são importantes na geração destas EROs, tais como a xantina oxidase, NADPH oxidases, citocromo P450, fontes mitocondriais (cadeia transportadora de

elétrons) e a óxido nítrico sintase (NOS) (Harrison et al., 2003) (Figura 3).

O estresse oxidativo pode ser definido como um distúrbio entre o balanço pró-oxidante/antioxidante em favor da situação pró-oxidante, levando a um dano oxidativo que compromete a resposta redox celular. Esta situação pode ser resultado de uma diminuição dos sistemas antioxidantes ou aumento da produção de EROs (Halliwell e Gutteridge, 1999).

As EROs/ERNs possuem um duplo papel na vasculatura: em concentrações fisiológicas funcionam como moléculas sinalizadoras, enquanto que em altas concentrações causam efeitos nocivos (Lum e Roebuck, 2001). Em situações de estresse oxidativo, a produção aumentada de EROs pode levar a muitos eventos celulares, dentre eles a inativação do  $\bullet\text{NO}$ ; modificações oxidativas do DNA e proteínas; oxidação de lipídios; aumento da mitogenicidade e apoptose de células vasculares; e aumento da expressão e ativação de genes redox-sensíveis, tais como os que codificam os receptores para oxLDL, moléculas de adesão, fatores quimiotáticos, citocinas pró-inflamatórias, reguladores do ciclo celular e metaloproteínas de matriz (Wassmann et al., 2004).

No ambiente vascular, as EROs são responsáveis pela indução das modificações oxidativas das LDLs, convertendo estas lipoproteínas em partículas mais aterogênicas (Rizzo et al., 2009). A oxidação da LDL, mediada por EROs, envolve a peroxidação de ácidos graxos e modificação covalente da apo B-100 por produtos da peroxidação lipídica. Assim, a LDL oxidada é rapidamente captada pelos macrófagos através dos receptores *scavenger* que, ao contrário do receptor que reconhece a LDL nativa, não apresenta hiporregulação em resposta ao excesso de colesterol celular, dando origem às células espumosas (Steinberg, 1997). A oxLDL também pode induzir estresse oxidativo, levando à geração de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  nas células endoteliais e musculares lisas. O  $\text{O}_2^{\bullet-}$  formado causa disfunção endotelial, bem como proliferação, hipertrofia e apoptose das células vasculares (Williams e Fisher, 2005; Galle et al., 2006).



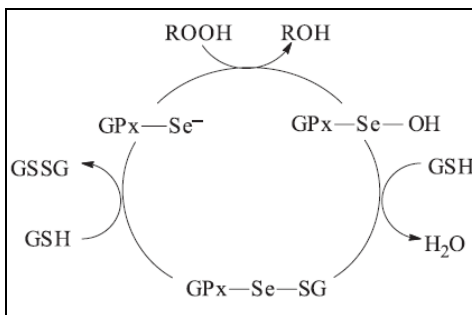
**Figura 3: Fontes de espécies reativas e sistemas de defesa antioxidante em células vasculares.**  $\bullet NO$  (Óxido nítrico); eNOS (Óxido nítrico sintase endotelial);  $H_2O_2$  (Peróxido de hidrogênio); GPx (Glutationa peroxidase); GR (Glutationa redutase); GSH (Glutationa reduzida); GSSG (Glutationa oxidada);  $O_2^{\bullet-}$  (Radical ânion superóxido);  $ONOO^{\bullet}$  (Peroxinitrito) e SOD (Superóxido dismutase) (Adaptado de Li e Shah, 2004).

Além do processo de oxidação da LDL, as EROs desempenham um importante papel na disfunção endotelial que ocorre durante a aterogênese (Cai e Harrison, 2000). O  $\bullet NO$  produzido por células endoteliais protege a vasculatura do desenvolvimento da aterosclerose através de suas propriedades vasodilatadoras, da inibição dos processos de expressão de moléculas de adesão, agregação plaquetária, proliferação de células musculares lisas e oxidação da LDL (Gaut e Heinecke, 2001). A produção intensa de  $O_2^{\bullet-}$  pode favorecer a reação deste radical com o  $\bullet NO$  promovendo dano celular, por reduzir a biodisponibilidade do  $\bullet NO$ . Além disso, o produto formado pela reação entre o  $\bullet NO$  e  $O_2^{\bullet-}$ , o peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ), atua como um potente agente oxidante e nitrante apresentando propriedades pró-aterogênicas. O  $O_2^{\bullet-}$  ainda é capaz de ativar genes sensíveis ao estado redox, aumentando, assim a expressão de moléculas de adesão vasculares e de proteínas quimioatraentes (Yokoyama, 2004).

Como mecanismo de proteção ao estresse oxidativo e aos danos promovidos por este na vasculatura, as células possuem sistemas de defesa antioxidantes, tais como as enzimas superóxido dismutase (SOD), enzimas que sintetizam glutatona reduzida (GSH), glutatona peroxidase (GPx), glutatona transferase (GST) e catalase, entre outras (Kondo et al., 2009) (Figura 3). Distúrbios nestes sistemas de defesa podem levar ao acúmulo de EROs e acelerar o desenvolvimento da aterosclerose (Hill e Singal, 1996). Por outro lado, a expressão aumentada de enzimas como a SOD e a catalase pode retardar o aparecimento de lesões em modelos animais de aterosclerose (Yang et al., 2004; 2009).

### 1.5 Glutaciona peroxidase e aterosclerose

A glutaciona peroxidase (GPx) é uma enzima chave em muitos tipos celulares e consome glutatona reduzida para converter  $H_2O_2$  em água, e peróxidos lipídicos em seus respectivos alcoóis (Stocker e Keaney, 2004) (Figura 4). Além disso, a GPx também atua como peroxinitrito redutase (Sies, 1999). Em mamíferos, existem quatro principais classes de GPx (GPx- 1-4), que diferem entre si na distribuição tecidual e localização celular. São selenoproteínas que contém em seu sítio ativo o selênio, essencial para sua reação catalítica, conforme demonstrado na figura 4 (Margis et al., 2008).



**Figura 4: Ciclo catalítico da glutatona peroxidase.** O grupamento selenolato da enzima ( $GPx-Se^-$ ) reage com peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos, formando um ácido selenínico ( $GPx-Se-OH$ ). Este  $Se-OH$  reage com uma molécula de glutatona (GSH) formando selenopersulfato ( $GPx-Se-SG$ ), que por sua vez é atacado pela segunda molécula de GSH, regenerando o selenolato no sítio ativo da enzima e liberando glutatona oxidada (GSSG) (Adaptado de Nogueira e Rocha, 2010).

Estudos clínicos recentes têm demonstrado que a diminuição da atividade da enzima GPx-1 eritrocitária está associada ao risco aumentado de eventos cardiovasculares (Blankenberg et al., 2003; Espinola-Klein et al., 2007). Além disso, a atividade da GPx-1 está diminuída ou ausente em placas ateroscleróticas humanas e está associada ao desenvolvimento de lesões mais severas (Lapenna et al., 1998). Em camundongos, a deficiência de GPx-1 causa disfunção endotelial, acompanhada de aumento do estresse oxidativo, anormalidades funcionais e estruturais do sistema cardiovascular (Forgione et al., 2002), além de acelerar a progressão da lesão aterosclerótica em camundongos deficientes em apolipoproteína E (apoE -/-) (Torzewski et al., 2007). Por outro lado, a superexpressão da GPx-4, diminui a lesão aterosclerótica em camundongos apoE -/- (Guo et al., 2008).

Considerando que a GPx é uma enzima chave na proteção de vasos sanguíneos contra o estresse oxidativo e aterogênese, surgiu a hipótese de que compostos com atividade mimética desta enzima poderiam atuar benéficamente sobre o desenvolvimento da aterosclerose. Além disso, numerosos estudos têm verificado que a utilização de substâncias antioxidantes está relacionada à prevenção das doenças cardiovasculares (Glass e Witztum, 2001; Brigelius-Flohe et al., 2005; Sposito et al., 2007).

## 1.6 Compostos orgânicos de selênio

Diferentes classes de compostos orgânicos de selênio exibem atividade mimética da GPx e decompõem peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos utilizando glutatona reduzida (GSH) ou outros tióis como doadores de hidrogênio (Wilson et al., 1989; Nogueira et al., 2004). A partir dos anos 80, o interesse em bioquímica, farmacologia e toxicologia de organoselênios aumentou de maneira significativa devido à variedade de atividades biológicas desempenhadas por esta classe de compostos.

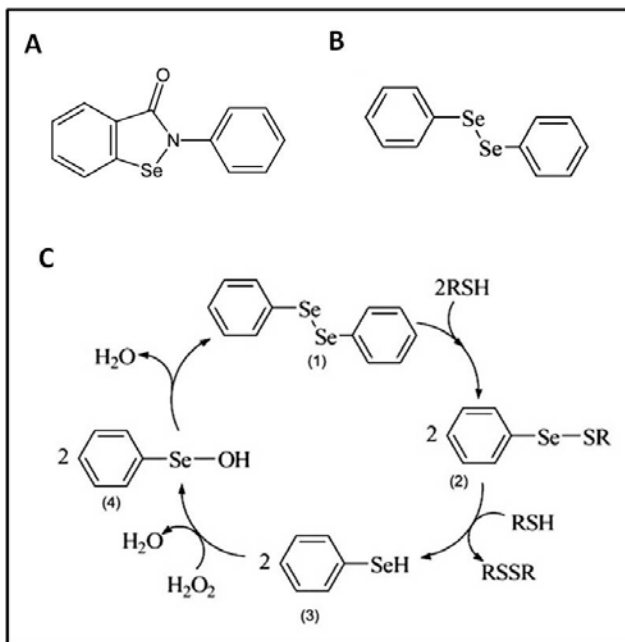
O primeiro exemplo desta classe de compostos foi o ebselen (Figura 5A) (Parnham e Kindt, 1984), o qual tem sido extensivamente estudado devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Cotgreave et al., 1989; Schewe, 1995; Haddad et al., 2002). Este composto de baixa toxicidade (Fischer et al., 1988), demonstrou ações anti-inflamatória e antioxidante em diversos modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (Schewe, 1995; Takasago et al., 1997; Porciuncula et al.,

2003; Brodsky et al., 2004). Além disso, foi empregado com sucesso em estudos clínicos em pacientes com aneurisma hemorrágico e isquemia aguda (para revisão ver Parnham e Sies, 2000).

Recentemente, um estudo utilizando camundongos apoE <sup>-/-</sup> mostrou o efeito antiaterogênico do ebselen na aterosclerose associada à hiperglicemia (Chew et al., 2009; 2010). Outros trabalhos verificaram que o ebselen restaura a função endotelial em ratos diabéticos (Brodsky et al., 2004) e diminui as lesões ateroscleróticas em camundongos transgênicos com expressão aumentada da NADPH oxidase (Khatri et al., 2004). As atividades farmacológicas do ebselen podem ser explicadas em parte por sua capacidade de neutralizar eficientemente hidroperóxidos orgânicos e ONOO<sup>-</sup>, mimetizando a enzima glutathione peroxidase (GPx) (Muller et al., 1984; Masumoto e Sies, 1996).

### **1.6.1 Disseleneto de difenila**

O disseleneto de difenila (Figura 5B), assim como o ebselen, é um composto orgânico de selênio que reage eficientemente com hidroperóxidos e peróxidos orgânicos, através de reação similar a catalisada pela GPx (Figura 5C). Todavia, o disseleneto de difenila demonstrou ser mais ativo como mimético da GPx (Wilson et al., 1989) e menos tóxico em roedores que o ebselen (Nogueira et al., 2003a; Meotti et al., 2003).



**Figura 5: Estrutura química e mecanismo catalítico de organoselênios.** Estrutura química do ebselen (A) e do disseleneto de difenila (DD) (B). (C) Mecanismo catalítico do DD para a detoxificação de peróxido de hidrogênio. O DD reage com um grupamento tiol (ex. GSH) originando um selenopersulfato, o qual reage com um segundo equivalente de GSH formando um selenol (Se-H). Finalmente, este selenol reduz o peróxido de hidrogênio ou peróxidos lipídicos liberando uma molécula de água, originando um ácido selenínico (Se-OH). Este Se-OH, por sua vez, libera uma molécula de água, fechando assim o ciclo catalítico (Adaptado de Nogueira et al., 2004).

Uma das primeiras evidências das propriedades farmacológicas do DD ocorreu em 2003, quando Nogueira e colaboradores demonstraram as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva deste composto em roedores (Nogueira et al., 2003b). Desde então, estudos têm relatado o importante papel protetor deste composto em uma variedade de modelos experimentais associados à produção exacerbada de radicais livres (Ghisleni et al., 2003; Burger et al., 2004; Meotti et al., 2004 Borges et al., 2005), além de diversas outras propriedades farmacológicas, demonstradas na Tabela 1. Recentemente, de Bem e colaboradores (2009) verificaram que o tratamento sub-crônico por via oral com DD reduz a hipercolesterolemia e o estresse oxidativo em

coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol. Em outro estudo, foi demonstrado que o DD inibe a oxidação da LDL humana *in vitro* e este efeito foi relacionado com a sua atividade tiol-peroxidase (de Bem et al., 2008). Cabe ainda ressaltar, a baixa toxicidade apresentada por este composto em doses com potencialidades farmacológicas em roedores e não roedores (Nogueira et al., 2003a; Meotti et al., 2003; de Bem et al., 2006; 2007; Stralioetto et al., 2010).

**Tabela 1: Propriedades farmacológicas do disseleneto de difenila em diferentes modelos experimentais.**

Efeito	Dose e via de administração	Tratamento	Espécie animal	Referência
Anti-hepatotóxico	100 µmol/kg (i.p.)	agudo	rato	Borges et al., 2005; 2006
Anti-úlceras	0,1 – 10 mg/kg (v.o.)	agudo	rato	Ineu et al., 2008
Anti-inflamatório	10 – 100 mg/kg (i.p.)	agudo	rato	Nogueira et al., 2003b
Antinociceptivo	10 – 100 mg/kg (i.p.)	agudo	camundongo	Nogueira et al., 2003b
Redução do dano pulmonar	10 – 20 mg/kg (i.p.)	agudo	camundongo/rato	Luchese et al., 2007
Hipoglicemiante	1 mg/kg (s.c.)	crônico	rato	Barbosa et al., 2006
Anticâncer	1 ppm (v.o.)	crônico	rato	Barbosa et al., 2008
Redução da falência renal	7,4 mg/kg (v.o.)	agudo	rato	Brandao et al., 2009
Ansiolítico	50 – 100 mg/kg (v.o.)	agudo	camundongo	Savagnago et al., 2008
Antidepressivo	0,1 mg/kg (v.o.)	agudo	camundongo/rato	Ghisleni et al., 2008; Savagnago et al., 2008; Acker et al., 2009
Melhora da performance cognitiva	0,1 – 25 µmol/kg (i.p.)	agudo	camundongo	Rosa et al., 2003
Melhora da memória espacial	2,5 – 5 mg/kg (s.c.)	sub-crônico	rato	Stangherlin et al., 2008
Hipocolesterolêmico	10 ppm (v.o.)	sub-crônico	coelho	de Bem et al., 2009
Hipolipemiante	10 mg/kg (v.o.)	agudo	camundongo	da Rocha et al., 2009

i.p., via intraperitoneal; v.o., via oral.; s.c., via subcutânea. Fonte: Nogueira e Rocha, 2010.

Diversas evidências, obtidas por estudos em modelos animais e intervenções controladas em humanos, comprovam o envolvimento do estresse oxidativo na aterogênese, e sugerem que o consumo de



antioxidantes tenha um importante efeito no tratamento e prevenção das doenças cardiovasculares (para revisão ver Thomson et al., 2007). Neste contexto e diante das importantes propriedades farmacológicas descritas para o DD, bem como da participação da glutathione peroxidase no controle do processo aterogênico, hipotetizamos que este composto pode ser efetivo na prevenção e/ou tratamento da aterosclerose.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar os efeitos de um composto orgânico de selênio, o disseleneto de difenila (DD), sobre diversos parâmetros biológicos em modelos *in vivo* e *in vitro* de aterosclerose experimental.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tratamento com DD sobre a extensão da lesão aterosclerótica, níveis de citocinas e lipídeos plasmáticos, reatividade vascular, e marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo na lesão aterosclerótica, em camundongos LDLr -/- submetidos à dieta hipercolesterolêmica;
- Determinar o efeito protetor do DD sobre o dano endotelial induzido pela oxLDL humana isolada em cultura primária de células endoteliais de aorta bovina através da avaliação de marcadores de estresse oxidativo, de função mitocondrial e de morte celular;
- Verificar o efeito protetor do DD sobre a formação de células espumosas, produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio em cultura de macrófagos J774 estimulados com oxLDL humana isolada.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Disseleneto de difenila

O disseleneto de difenila (DD) foi sintetizado de acordo com métodos previamente descritos (Paulmier, 1986). Análises de ressonância magnética nuclear e espectros mostraram que o composto sintetizado apresentou dados analíticos e espectrofotométricos condizentes com a estrutura química do DD. A pureza química (99,9%) do DD foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência. A síntese do composto foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, sob supervisão do Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha.

Para a realização dos experimentos *in vivo*, o DD foi solubilizado em óleo de canola. Nos protocolos utilizando cultura de células o composto foi dissolvido em meio de cultura (DMEM) contendo no máximo 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO). Em ambos os casos, o veículo foi utilizado com controle negativo.

### 3.2 Ensaio *in vivo*

#### 3.2.1 Animais

Camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e homozigotos com deficiência para receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDLr<sup>-/-</sup>) foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brasil. Os progenitores foram adquiridos do Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EUA). Para a realização dos experimentos, foram utilizados camundongos machos (25 a 30 g) com 3 meses de idade. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas, mantidos em temperatura ambiente controlada ( $22 \pm 2$  °C), com ciclo claro/escuro de 12 horas no biotério setorial do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (PP00226).

### **3.2.2 Validação do protocolo para avaliação da aterosclerose induzida pela dieta hipercolesterolêmica em camundongos LDLr -/-**

Com o objetivo de avaliar o efeito temporal da ingestão de uma ração rica em colesterol sobre a formação de lesões ateroscleróticas, camundongos LDLr -/- foram tratados por 30 dias com ração hipercolesterolêmica (HC) constituída por 25% de gordura saturada, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico (Krieger et al., 2006) (n = 5). Paralelamente, um grupo de camundongos LDLr -/- foi tratado com ração padrão para roedores (Nuvilab CR1®, Nuvital Nutrientes, Brazil) (C, controle, n = 5). Como controle para os experimentos, foram utilizados camundongos C57Bl6 do tipo selvagem alimentados com dieta padrão (CS, controle selvagem, n = 5). O peso dos animais foi avaliado no início e no final do tratamento. Ao final dos 30 dias, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (90 mg/kg) e cloridrato de xilazina (15 mg/kg) e o sangue foi coletado através do plexo retro-orbital para obtenção do plasma, onde foram avaliados os níveis lipídicos. Após a eutanásia dos animais, foram retirados a aorta torácica, para avaliação da reatividade vascular, e o coração, para análises histológicas.

#### **3.2.2.1 Determinação de lipídeos plasmáticos: colesterol total, lipoproteínas e triglicerídeos**

A quantificação do colesterol total (CT), fração HDL e triglicerídeos no plasma dos camundongos foi realizada utilizando reagentes comerciais (Gold Analisa, Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as especificações do fabricante. A concentração plasmática de colesterol contida nas lipoproteínas (VLDL, LDL + IDL) foi determinada indiretamente através da diferença entre os níveis de CT e fração HDL. Os resultados foram expressos em mg/dL e a razão entre (VLDL+LDL+IDL)/HDL foi calculada.

#### **3.2.2.2 Análise histológica da lesão aterosclerótica**

Após a retirada da aorta torácica, os corações foram perfundidos através do ventrículo direito com solução salina (NaCl 0,9%), seguida de formaldeído 10%. Os corações foram removidos e fixados por 24 h em formaldeído 10% e então incluídos em gelatina 5, 10 e 25%. O processamento histológico e coloração dos cortes foram realizados como descrito por Paigen e colaboradores (1987).

Resumidamente, após a aplicação de meio de congelamento nos blocos de gelatina contendo os corações, cada órgão foi cortado transversalmente em criostato a uma temperatura de  $-25^{\circ}\text{C}$ , com uma espessura de  $20\ \mu\text{m}$  cada corte, a partir do início da aorta, totalizando uma extensão de  $480\ \mu\text{m}$ , utilizando-se para a localização desta área a visualização microscópica das válvulas semilunares. Os cortes foram então corados com *Oil Red O* 0,5% e contracorados com Light Green e hematoxilina de Harris. Nesta etapa de padronização do tempo de tratamento não foi realizada a análise quantitativa das lesões ateroscleróticas.

### **3.2.2.3 Reatividade vascular em anéis de aorta torácica isolada**

A aorta torácica foi removida após a eutanásia dos camundongos e transferida para uma placa de Petri contendo solução fisiológica a  $37^{\circ}\text{C}$ , os tecidos adiposos e conectivos adjacentes foram removidos. O vaso foi seccionado na forma de anéis de 3-4 mm de comprimento, os quais foram transferidos para cubas de vidro com volume total de 5 mL de solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição (mM): NaCl 118; KCl 4,7;  $\text{CaCl}_2$  2,5;  $\text{MgSO}_2$  1,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,9;  $\text{NaHCO}_3$  25; glicose 11. A solução nutriente foi mantida a  $37^{\circ}\text{C}$ , pH 7,4 e aerada com uma mistura de 95% de  $\text{O}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Duas hastas metálicas foram inseridas na luz dos mesmos, sendo uma delas adaptada a um transdutor de tensão isométrica acoplado a um sistema de aquisição de dados Soft and Solutions (KitCad 8, São Paulo, SP, Brasil). Após o período de equilíbrio (60 minutos), os anéis de aorta foram contraídos por uma exposição a uma concentração submáxima efetiva de fenilefrina ( $1\ \mu\text{M}$ ) e foi verificada a capacidade de relaxamento em resposta à adição de concentrações crescentes e cumulativas de acetilcolina ( $1\ \text{nM}$  a  $3\ \mu\text{M}$ ). Os resultados de contração foram apresentados em miligramas de tensão e os de relaxamento máximo em porcentagem com relação à contração de fenilefrina.

### **3.2.3 Avaliação do efeito do disseleneto de sobre a aterosclerose experimental em camundongos LDLr -/-**

Na segunda etapa dos ensaios *in vivo*, camundongos LDLr -/- foram divididos em cinco grupos experimentais ( $n = 7-10$ ), conforme descrito na Tabela 2. Os animais receberam ração normal (padrão para roedores) ou hipercolesterolêmica (HC), durante 30 dias,

concomitantemente com o tratamento com DD (0,1; 1 ou 10 mg/kg/dia) ou veículo (óleo de canola) por via oral (gavagem; 0,1mL/10g de peso), uma vez ao dia.

**Tabela 2: Grupos experimentais.**

<b>Grupo</b>	<b>Dieta</b>	<b>Tratamento</b>
Controle (C)	Normal	Veículo
Controle Hipercolesterolêmico (HC)	Hipercolesterolêmica	Veículo
DD 0,1 mg/kg (HC + DD 0,1)	Hipercolesterolêmica	DD 0,1 mg/kg/dia
DD 1 mg/kg (HC + DD 1)	Hipercolesterolêmica	DD 1 mg/kg/dia
DD 10 mg/kg (HC + DD 10)	Hipercolesterolêmica	DD 10 mg/kg/dia

Durante o tratamento, o peso dos animais foi avaliado semanalmente, sendo que ao final do período experimental, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (90 mg/kg) e cloridrato de xilazina (15 mg/kg) e o sangue foi coletado através do plexo retro-orbital para obtenção do plasma, onde foram avaliados os níveis lipídicos e de citocinas. Após a eutanásia dos animais, a aorta torácica foi retirada, para avaliação da reatividade vascular e o coração, para análise histológica e imunoistoquímica. A análise dos lipídeos plasmáticos foi realizada conforme descrito no item 3.2.2.1.

### **3.2.3.1 Medida da área da lesão aterosclerótica - análise histológica**

Os procedimentos de preparação do tecido e coloração das lesões ateroscleróticas na aorta proximal ascendente foram executados conforme descrito anteriormente no item 3.2.2.2. A quantificação das lesões foi realizada segundo Rubin e colaboradores (1991), utilizando-se do programa NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). A área das lesões foi expressa como a somatória da área obtida em 6 cortes de 20  $\mu\text{m}$  de espessura, com 80  $\mu\text{m}$  de distância entre eles, em uma área total de 480  $\mu\text{m}$ . Os resultados foram expressos em  $\mu\text{m}^2$ .

### 3.2.3.2 Reatividade vascular em anéis de aorta torácica isolada

Os procedimentos para avaliação da resposta contrátil e vasodilatadora em aorta torácica isolada foram realizados conforme descrito no item 3.2.2.3. Após a avaliação da resposta vasodilatadora à acetilcolina, as preparações foram lavadas e deixadas em repouso por 30 min. Em seguida, os anéis foram contraídos com KCl 60 mM, por substituição equimolar de NaCl na solução fisiológica de Krebs-Henseleit, e a resposta contrátil foi expressa em miligramas.

### 3.2.3.3 Imunoistoquímica

Os marcadores de estresse oxidativo, malondialdeído (MDA) e 3-nitrotirosina (NT), e de macrófagos (Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1, IBA-1) foram detectados através de análise imunoistoquímica. Para isso, os corações foram perfundidos, removidos, fixados em formaldeído 10% e incluídos em parafina. Os cortes histológicos com espessura de 5  $\mu$ m foram obtidos da região da aorta proximal ascendente e mantidos em estufa a uma temperatura de 70-90 °C até a completa fusão da parafina. Posteriormente os tecidos foram desparafinizados em xilol e hidratados por passagens sucessivas em etanol de concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90%, etanol 80% e etanol 70%). O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar o desenvolvimento de reações inespecíficas falso-positivas. Para tanto, as lâminas foram imersas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% em metanol absoluto (v/v) por 20 minutos, com posterior lavagem em água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formaldeído e parafina. Para este fim, foi preparada uma solução composta por 180 mL de ácido cítrico 0,1 M e 820 mL de citrato de sódio 0,1 M; pH 6,0. As lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada, e mantidas em banho-maria ajustado para 95-98 °C, durante 45 minutos. Logo após, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 minutos à temperatura ambiente, e posteriormente lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, estas foram submersas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, composição: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM, pH 7,2 - 7,4). Os anticorpos

primários IBA-1 (1:300), anti-MDA (1:500) ou anti-NT (1:200) foram diluídos em reagente diluente para anticorpos (Novocastra<sup>TM</sup> Laboratories, EUA). A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 2-8 °C, durante 16 horas. Após lavagem com PBS a temperatura ambiente, as lâminas foram incubadas com os anticorpos secundários biotinizados: anti-cabra (1:500) para IBA-1 e anti-coelho (1:250) para anti-MDA e anti-NT por 90 min a temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram tratados com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase por 60 minutos. A revelação foi realizada utilizando uma solução cromógena de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) como substrato para a peroxidase. Após a revelação, foram realizadas as seguintes etapas: a contracoloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris; a desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, etanol 80%, 90% e etanol absoluto); a diafanização em xilol e a montagem em ENTELLAN<sup>®</sup>. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Olympus, BX-41) conectado a uma câmera digital (3.3 Mpixel QCOLOR3C, Qimaging<sup>TM</sup>) e a um software para aquisição de imagens (Qcapture Pro 5.1, QImaging<sup>TM</sup>). O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha no local da marcação pelos anticorpos. Foram analisados 3 cortes histológicos da amostra de cada animal, sendo que cada grupo experimental foi constituído de 6 animais. As imagens foram transferidas para um computador onde a intensidade da coloração castanha/marcação em pixels foi calculada para cada imagem utilizando o software NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). A intensidade de pixels obtida para cada marcação foi calculada em relação a área total do vaso em pixels. Os dados foram expressos como unidades arbitrárias (u.a.).

### **3.2.3.4 Determinação da proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1) no plasma**

A concentração plasmática de MCP-1 foi determinada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) seguindo as especificações do kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Os resultados foram expressos em pg/mL.



### **3.3 Ensaios *in vitro***

#### **3.3.1 Isolamento da lipoproteína de baixa densidade (LDL) humana**

A fração LDL foi isolada a partir de plasma humano proveniente do banco de sangue do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. Os procedimentos experimentais para utilização de plasma humano e isolamento da LDL foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos desta Universidade (parecer 943/10, FR 363814).

O isolamento da LDL foi realizado por ultracentrifugação de gradiente de densidade descontínua, conforme descrito por Silva e colaboradores (1998), com pequenas modificações. Ao plasma foi adicionado EDTA (1 mg/mL) e sacarose (concentração final de 0,5%) para evitar a agregação de LDL. Cinco mL de plasma-EDTA foi ajustado a uma densidade de 1,22 g/mL com KBr (0,326 g/mL) e em seguida foi adicionado cloreto de sódio (1,006 g/mL). A ultracentrifugação foi executada a 191.000 g por 2 horas a 4 °C em ultracentrífuga Hitachi Himac CP80WX, rotor 40ST. Após este processo, a camada contendo LDL (porção superior) foi coletada e dialisada (25 x 16 mm) durante 16 horas a 4°C em tampão fosfato 148 mM (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM, KCl 2,6 mM, NaCl 136mm, pH 7,4). O teor de proteína da LDL isolada foi determinado pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

#### **3.3.2 Oxidação da LDL**

Amostras de LDL isolada (1 mg de proteína/mL) foram oxidadas na presença de sulfato de cobre 10 µM por 16 horas a 37 °C sob agitação constante. Posteriormente, foi adicionado EDTA (1,5 mM) e as amostras foram dialisadas em tampão fosfato de sódio 10 mM por 24 horas a 4 °C. Após a diálise, as alíquotas de LDL oxidada (oxLDL) foram congeladas a -70 °C até a utilização.

#### **3.3.3 Ensaios utilizando cultura de células endoteliais de aorta bovina (BAECs)**

Células endoteliais de aorta bovina (BAECs) foram isoladas de aorta bovina conforme previamente descrito por Pellufo e colaboradores (2009). As aortas foram abertas longitudinalmente em capela de fluxo laminar para exposição do endotélio. A superfície do vaso foi raspada,

somente uma vez, com uma lâmina de bisturi e os aglomerados de células, contendo as células endoteliais, foram ressuspensos em 10 mL de DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), timidina 10 M, penicilina 100 U/mL e sulfato de estreptomicina 100 g/mL. As células foram coletadas por centrifugação a 800 g por 15 minutos, ressuspensas em 10 mL de DMEM, transferidas para placas de cultura e incubadas em atmosfera umidificada a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Colônias de BAECs foram isoladas utilizando anéis cilíndricos e expandidas em frascos de cultura em meio DMEM suplementado com 10% SFB. A pureza da cultura foi de 99%, determinada através de análise imunocitoquímica utilizando anticorpo para o fator de Von Willebrand. Este isolamento foi realizado na Universidad de La Republica, Montevideo, Uruguai, pela Profa Dra Andreza Fabro de Bem, sob supervisão do Prof Dr. Rafael Radi.

As células foram cultivadas e reproduzidas em DMEM suplementado com 10% de SFB, L-glutamina 2 mM, glicose 4,5 g/L, bicarbonato de sódio 1,5 g/L, tampão Hepes 1M, penicilina 10.000 UI e estreptomicina 10.000 UI, em atmosfera umidificada a 37 °C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Para a realização dos procedimentos experimentais, foram utilizadas células até a décima passagem.

Durante os experimentos, inicialmente as células foram plaqueadas em DMEM suplementado com 10% de SFB e incubadas em atmosfera umidificada a 37 °C contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para adesão. Em seguida, o meio foi substituído por DMEM contendo 0,5% de SFB, que foi mantido durante os tratamentos com DD e oxLDL, conforme descrito a seguir para cada protocolo experimental.

### **3.3.3.1 Ensaio de citotoxicidade celular**

Para determinar a citotoxicidade do DD sobre as BAECs, foi utilizado o teste do MTT, que mede a atividade da desidrogenase mitocondrial através da redução do (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) em formazan, nas células viáveis (Mosmann, 1983). Células foram plaqueadas em placas de 96 poços (1 x 10<sup>4</sup> células/poço) e colocadas em estufa incubadora (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) por 24 horas. Após este período, as células foram tratadas com diferentes concentrações de DD (0,1 – 100 µM) ou veículo (DMEM 0,5% + concentração máxima de DMSO 0,1%), nos grupos controles, e incubadas por 24 horas. Ao final deste período, o meio foi removido e 100 µL de MTT 0,5 mg/mL foram adicionados a cada poço e uma nova

incubação por 2,5 horas foi efetuada. Terminada esta etapa, o MTT foi removido e adicionados 200  $\mu$ L de DMSO para dissolução dos cristais de formazan. Esse composto, que possui coloração violeta, é formado pela redução do MTT através de desidrogenases presentes em células viáveis. As placas foram então submetidas à leitura de densidade óptica (540 nm) e porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle (células não tratadas) (Siqueira et al., 2009). Os experimentos foram realizados em triplicata.

### **3.3.3.2 Medida da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)**

A geração intracelular de EROs foi medida utilizando a sonda 2',7'- diclorodihidrofluoresceína acetato (DCFH-DA). Quando aplicada a células intactas, a DCFH-DA passa pela membrana celular e é hidrolisada enzimaticamente por esterases formando um produto não fluorescente DCFH. Na presença de EROs, a DCFH é oxidada gerando o composto altamente fluorescente DCF, cuja fluorescência pode ser quantificada por citometria de fluxo ou fluorimetricamente (Wang e Joseph, 1999). Inicialmente, as células foram semeadas em placas de 12 poços ( $3 \times 10^5$  células/poço) e mantidas em estufa incubadora (5%  $\text{CO}_2$ , 37 °C) por 24 horas. Em seguida, as células foram expostas a diferentes concentrações de oxLDL (25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 1 hora. Para examinar os efeitos do DD sobre a produção de EROs induzida por LDL, células foram pré-tratadas com o referido composto (0,1; 0,5 ou 1  $\mu\text{M}$ ) ou veículo por 24 horas, e em seguida estimuladas com oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou veículo por mais 1 hora. Ao final do tratamento, foi realizada a incubação com DCFH-DA (10  $\mu\text{M}$ ) por 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, as células foram lavadas 2 vezes com PBS na placa, tripsinizadas, coletadas e centrifugadas a 1.200 g por 3 minutos. Para remover o excesso da sonda fluorescente DCFH-DA, o pellet foi lavado 3 vezes com PBS e ressuspendido em 200  $\mu\text{L}$  após a última lavagem. A quantificação da fluorescência emitida foi realizada por citometria de fluxo (FACS Canto II, BD Bioscience, USA). Os dados foram analisados utilizando o software WinMID 2.9 (USA, 2000) e os resultados expressos como porcentagem em relação à intensidade de fluorescência do controle (células não tratadas, 100%). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Para avaliar a cinética de formação de EROs induzida pela exposição à oxLDL, as células foram tratadas com oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e DCFH-DA (10  $\mu\text{M}$ ) simultaneamente e a intensidade de fluorescência

foi medida em um espectrofluorímetro (Infinite M200, TECAN, Mannedorf, Suíça) durante 1 hora (488 nm de excitação e 520 nm de emissão) em intervalos de 2 minutos. Os resultados deste experimento foram expressos em intensidade de fluorescência por tempo (minutos).

### **3.3.3.3 Determinação da concentração intracelular de glutathiona reduzida (GSH)**

Os níveis intracelulares de GSH foram determinados por ensaio fluorimétrico conforme previamente descrito por Hissin e colaboradores (1976). As células foram semeadas em placas de 6 poços (6 x 10<sup>5</sup> células/poço), mantidas em estufa incubadora (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) por 24 horas e em seguida expostas a diferentes concentrações de oxLDL (25, 50, 100 e 200 µg/mL) por 1 hora. Para examinar os efeitos do DD, células foram pré-tratadas com o composto (0,1; 0,5 ou 1 µM) ou veículo por 24 horas, e posteriormente expostas à oxLDL (100 µg/mL) ou veículo por 1 hora adicional. Após o tratamento as células foram lavadas com PBS, coletadas com ácido perclórico 0,6 M e tampão fosfato de sódio 100 mM/EDTA 5 mM (0,5 mL), pH 8,0 a 4°C. As amostras foram centrifugadas a 14.000 g, a 4 °C por 10 minutos. Volume de 100 µL do sobrenadante foi incubado com 100 µL de ortoftalaldeído (0,1% p/v em metanol) e 1,8 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, por 15 min a temperatura ambiente. A intensidade de fluorescência foi medida em espectrofluorímetro (350 nm de excitação e 420 nm de emissão). O conteúdo intracelular de GSH foi calculado utilizando uma curva padrão de GSH e expresso como micromoles de GSH por miligrama de proteína. As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores (1951) e os experimentos foram realizados em triplicata.

### **3.3.3.4 Medida do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )**

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado utilizando o fluorocromo JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina iodado). JC-1 é um composto lipofílico que entra seletivamente na membrana e é utilizado como um indicador de alterações no potencial de membrana mitocondrial. Em células com alto  $\Delta\Psi_m$ , JC-1 forma complexos conhecidos como J-agregados com intensa fluorescência vermelha. Por outro lado, em células com baixo  $\Delta\Psi_m$ , JC-1 permanece na forma monomérica, que

apresenta fluorescência verde (Cossarizza et al., 1993). As células foram semeadas em placas de 24 poços ( $1 \times 10^5$  células/poço), mantidas em estufa incubadora (5%  $\text{CO}_2$ , 37 °C) por 24 horas, e em seguida expostas a diferentes concentrações de oxLDL (25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 1 hora. Para examinar os efeitos do DD, células foram pré-tratadas com o composto (0,1; 0,5 ou 1  $\mu\text{M}$ ) ou veículo por 24 horas, e em seguida expostas à oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou veículo por mais 1 hora. Após o tratamento, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e incubadas com JC-1 (5  $\mu\text{M}$ ) por 20 minutos a 37 °C. Ao final da incubação, as células foram novamente lavadas, na placa, e 500  $\mu\text{L}$  de PBS foram adicionados antes da leitura. A intensidade de fluorescência do JC-1 foi medida em espectrofluorímetro com 488 nm de excitação e emissão a 525 e 590 nm, que representa a forma agregada (fluorescência vermelha) e monomérica (fluorescência verde), respectivamente. O potencial de membrana mitocondrial foi apresentando como a razão entre a intensidade de fluorescência vermelha em relação à verde. Além disso, as células foram observadas em microscópio invertido de fluorescência (Olympus IX71) e imagens foram registradas através de uma câmera digital (Olympus DP71 camera) e software para aquisição de imagens. Foram obtidas imagens utilizando 2 filtros, um para visualização da fluorescência vermelha e outro para verde. As fotomicrografias representativas foram obtidas através da sobreposição de imagens utilizando o software NIH ImageJ 1.36b. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### **3.3.3.5 Avaliação da apoptose e necrose**

Para avaliar o processo de apoptose ou necrose induzida pela oxLDL, foi utilizado o ensaio de incorporação de anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI). Nas fases iniciais da apoptose ocorrem modificações na membrana plasmática com translocação de resíduos de fosfatidilserina para o lado externo da membrana. Essas modificações podem ser medidas através da incorporação de anexina V, uma proteína com alta afinidade por estes resíduos. Para distinguir a apoptose da necrose, foi utilizado o PI que consegue penetrar na célula quando ocorre rompimento da membrana celular, indicativo de processo necrótico. A ocorrência de dupla marcação com anexina-V e PI, pela exposição de resíduos de fosfatidilserina e perda da integridade da membrana caracteriza estágios tardios de apoptose (Vermees et al., 1995).

Neste ensaio, BAECs foram semeadas em placas de 12 poços ( $3 \times 10^5$  células/poço), com meio de cultura DMEM. Após 24 horas, foram pré-tratadas com DD ( $1 \mu\text{M}$ ) ou veículo por 24 horas e em seguida expostas a oxLDL ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) por mais 24 horas. Decorridos os períodos de incubação, as células foram cuidadosamente coletadas com tripsina 0,05% e ressuspensas em tampão de ligação (NaOH/Hepes  $100 \text{ mM}$ , pH 7,5; NaCl  $1,4 \text{ mM}$ ;  $\text{CaCl}_2$   $25 \text{ mM}$ ). Em seguida, as suspensões foram incubadas com anexina V-FITC ( $5 \mu\text{L}$ ) e iodeto de propídio ( $1,5 \mu\text{g/mL}$ ) por 15 minutos, à  $25^\circ\text{C}$ , protegidas da luz. Imediatamente após este período, foi medida a fluorescência das células ( $10.000$  células/amostra) em citômetro de fluxo (FACS Canto II, BD Bioscience, USA). Os dados foram analisados utilizando o software WinMID 2.9 (USA, 2000) e a porcentagem de células agrupadas em cada estágio/quadrante foi calculada. Q1 = células necróticas (anexina V -, PI +), Q2 = células em apoptose tardia (anexina V +, PI +), Q3 = células viáveis (anexina V -, PI -) e Q4 = células em apoptose inicial (anexina V +, PI -). Os experimentos foram realizados em triplicata.

### **3.3.4 Ensaios utilizando cultura de macrófagos murinos da linhagem J774**

Macrófagos murinos da linhagem J774 foram obtidos do *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EUA) e cultivados em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina  $2 \text{ mM}$ , glicose  $4,5 \text{ g/L}$ , bicarbonato de sódio  $1,5 \text{ g/L}$ , tampão Hepes  $1 \text{ M}$ , penicilina  $10.000 \text{ UI}$  e estreptomicina  $10.000 \text{ UI}$ , em atmosfera umidificada a  $37^\circ\text{C}$  contendo 5% de  $\text{CO}_2$ .

Assim como para as BAECs, as células foram plaqueadas em DMEM suplementado com 10% de SFB e incubadas em atmosfera umidificada a  $37^\circ\text{C}$  contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , por 24 horas para adesão. Em seguida, o meio foi substituído por DMEM contendo 0,5% de SFB, que foi mantido durante os tratamentos com DD e oxLDL, descritos a seguir para cada protocolo experimental.

#### **3.3.4.1 Ensaio de formação de células espumosas**

As células J774 foram semeadas em placas de 12 poços ( $2,5 \times 10^5$  células/poço), sobre lamínulas de vidro estéreis. Após 24 horas, foram adicionados DD  $1 \mu\text{M}$  ou veículo por 24 horas. Posteriormente, as células foram tratadas com oxLDL  $100 \mu\text{g/mL}$  ou veículo por mais 3 horas. Ao final do tratamento, as lamínulas contendo as células aderidas

foram retiradas da placa, lavadas duas vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% durante 10 minutos. Em seguida, as células foram coradas com *Oil Red O* 0,3% por 10 minutos, lavadas em PBS e contracoradas com hematoxilina de Harris. As lâminas foram montadas e as imagens das células foram obtidas utilizando um microscópio de luz (Olympus, BX-41) conectado a uma câmara digital (3.3 Mpixel QCOLOR3C, Qimaging<sup>TM</sup>) e software para captura de imagens (Qcapture Pro 5.1, QImaging<sup>TM</sup>). A intensidade total de pixels foi determinada utilizando o software NIH ImageJ 1.36 e o teor de lipídeos foi expresso como unidade arbitrária (u.a.). Os experimentos foram realizados em triplicata e foram analisadas de 6 a 8 fotomicrografias por grupo.

### **3.3.4.2 Medida da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)**

A produção intracelular de EROs foi detectada utilizando a sonda fluorescente DCFH-DA. As células J774 foram semeadas em placas de 24 poços ( $1 \times 10^5$  células/poço) e após 24 horas foram pré-tratadas com DD  $1 \mu\text{M}$  ou veículo por 24 horas. Em seguida, as células foram expostas a oxLDL  $100 \mu\text{g/mL}$  ou veículo por 3 horas adicionais. Após a exposição à oxLDL, as células foram tratadas com DCFH-DA ( $10 \mu\text{M}$ ) por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida, as células foram fotografadas utilizando microscópio invertido de fluorescência, previamente descrito. Para quantificar a produção de EROs as células foram coletadas com PBS e a intensidade de fluorescência foi medida em espectrofluorímetro com excitação a 485 nm e emissão a 520 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### **3.3.4.3 Quantificação da produção de citocinas: fator de necrose tumoral- $\alpha$ e proteína quimiotática para monócitos-1**

As células J774 foram semeadas em placas de 24 poços ( $1 \times 10^5$  células/poço) e após 24 horas de incubação (5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ ), foram pré-tratadas com DD  $1 \mu\text{M}$  ou veículo por 24 horas. Posteriormente, as células foram estimuladas com oxLDL,  $100 \mu\text{g/mL}$  ou veículo por 24 horas adicionais. Ao final do tratamento o sobrenadante das células foi coletado e os níveis de TNF- $\alpha$  e MCP-1 foram determinados utilizando kits de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.4 Drogas e reagentes

Kits enzimáticos para colesterol total, HDL e triglicerídeos foram obtidos da Gold Analisa (Belo Horizonte, Brasil). Kits de Elisa para MCP-1 e TNF-  $\alpha$  foram adquiridos da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA). Cloridrato de quetamina (Dopalen®) e cloridrato de xilazina (Anasedan®) foram obtidos da Vetbrands (Paulínia, SP, Brasil). CuSO<sub>4</sub>, EDTA, etanol, formaldeído, HCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KBr, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, metanol, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, NaOH, parafina, sacarose e xilol foram obtidos da Nuclear (São Paulo, SP, Brazil). Ácido cítrico, ácido perclórico, CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, citrato de sódio, glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), hematoxilina de Harris, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Acetilcolina, diaminobenzidina, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína acetato, dimetilsulfóxido (DMSO), fenilefrina, iodeto de propídio, JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina iodado), gelatina de pele bovina, paraformaldeído, ortoftaldeído e timidina foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Light Green e *Oil Red O* foram adquiridos da Amresco (Solon, OH, EUA). Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: IBA-1 e anti-MDA (Abcam, Cambridge, Reino Unido) e anti-nitrotirosina (Brito et al., 1999). Os anticorpos secundários, anti-coelho e anti-cabra e o complexo estreptavidina-peroxidase foram obtidos da DAKO (Glostrup, Dinamarca). Anexina V-FITC, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), estreptomomicina, HEPES, L-glutamina, MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina, penicilina, soro fetal bovino, tripsina foram adquiridos da Gibco (Carlsbad, CA, EUA).

### 3.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas com análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Neuman-Keuls. Análise de regressão linear foi utilizada para avaliar efeitos concentração-dependente nos experimentos *in vitro*. As análises estatísticas foram realizadas usando-se o software Graphpad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Ensaios *in vivo*

#### 4.1.1 Avaliação da aterosclerose induzida pela dieta hipercolesterolêmica em camundongos LDLr -/-

Com o objetivo de estabelecer o intervalo temporal de instalação da aterosclerose experimental no modelo utilizado nas etapas subsequentes deste estudo, avaliamos inicialmente se o tratamento por 30 dias de camundongos LDLr -/- com uma dieta rica em colesterol seria suficiente para induzir a formação de lesões na aorta proximal ascendente destes animais. Camundongos LDLr -/- (n = 5) e camundongos C57B16 (n = 5) tratados com dieta padrão foram utilizados como controle deste protocolo experimental. Ao final do tratamento, avaliamos os lipídeos plasmáticos, reatividade vascular e a lesão aterosclerótica nos diferentes grupos experimentais.

A Tabela 3 apresenta os níveis de lipídeos plasmáticos e variação do peso corporal dos animais. A deleção dos receptores de LDL, que caracteriza o modelo, resultou em aumento significativo ( $\cong$  2,8 vezes,  $p < 0,01$ ) nos níveis plasmáticos de colesterol total nos camundongos LDLr -/- em relação aos animais selvagens. Da mesma forma, o tratamento dos camundongos LDLr -/- com a dieta HC promoveu um aumento bastante significativo nos níveis de colesterol total, cerca de 3,6 vezes ( $p < 0,001$ ), e na razão (LDL + VLDL + IDL)/HDL ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle. Conforme esperado, o tratamento com a dieta HC foi capaz de induzir um quadro de intensa hipercolesterolemia nos animais LDLr -/-. Não foram observadas diferenças significativas no peso corporal e nas concentrações plasmáticas de triglicerídeos dos animais entre os diferentes grupos experimentais.

**Tabela 3: Efeito da dieta hipercolesterolêmica sobre a variação de peso (peso final – inicial) e lipídeos plasmáticos de camundongos LDLr -/-.**

	CS	C	HC
<b>Δ Peso (final – inicial) (g)</b>	0,86 ± 0,20	0,79 ± 0,62	1,16 ± 0,57
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	97,0 ± 9,3**	270,2 ± 13,9	984,1 ± 54,3***
<b>(LDL + VLDL + IDL)/HDL</b>	1,94 ± 0,25	2,9 ± 0,7	11,2 ± 1,2***
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	66,9 ± 16,3	116,4 ± 20,4	97,3 ± 18,6

CS, controle selvagem; C, controle, camundongos LDLr -/- tratados com dieta padrão; HC, hipercolesterolêmico, camundongos LDLr -/- tratados com dieta HC;

Dados apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) de 5 animais por grupo;

\*\* p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 indica a diferença quando comparado ao grupo C;

ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

O efeito do tratamento com a dieta HC sobre a resposta contrátil em anéis de aorta torácica de camundongos LDLr -/- também foi avaliado. Na tabela 4 é possível verificar que a dieta HC reduziu significativamente (p < 0,001) a contração induzida pela fenilefrina em relação ao grupo C. Com relação a vasodilatação induzida pela acetilcolina, nossos resultados demonstram um prejuízo no relaxamento induzido por este agonista colinérgico no grupo HC (p < 0,001), comparado aos animais tratados com dieta padrão. Não foram observadas diferenças significativas nestes parâmetros entre os animais do tipo selvagem e LDLr -/- tratados com dieta padrão.

**Tabela 4: Efeito da dieta hipercolesterolêmica sobre a resposta contrátil e vasorrelaxante em anéis de aorta torácica isolada em camundongos LDLr -/-.** Avaliação do efeito da exposição dos animais LDLr -/- à dieta HC, durante 30 dias, sobre a contração induzida pela fenilefrina (1 μM) e relaxamento máximo induzido pela acetilcolina (3 μM) em anéis de aorta torácica.

	CS	C	HC
<b>Contração (mg)</b>	210,4 ± 33	230 ± 61	102 ± 42***
<b>Relaxamento máximo (%)</b>	67,2 ± 6,3	77,2 ± 9,4	32,8 ± 10,1***

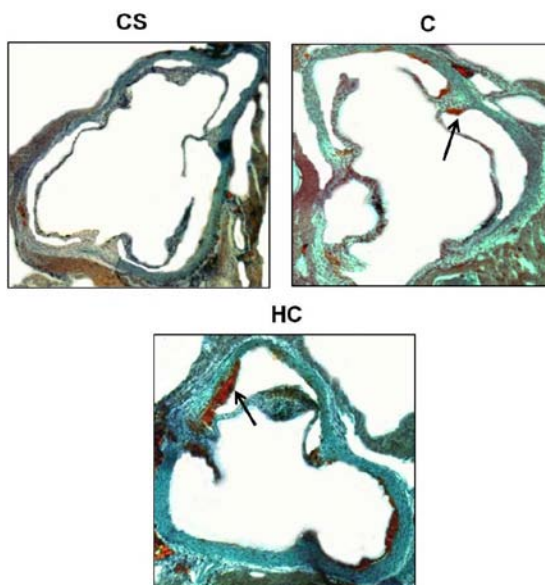
CS, controle selvagem; C, controle, camundongos LDLr -/- tratados com dieta padrão; HC, hipercolesterolêmico, camundongos LDLr -/- tratados com dieta HC;

Dados apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) de 8 anéis de aorta por grupo;

\*\*\*p < 0,001 indica a diferença quando comparado ao grupo C;

ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

A análise da lesão aterosclerótica foi realizada através da coloração de cortes histológicos com *Oil Red O*, um corante vermelho que apresenta afinidade por lipídeos. O depósito lipídico na aorta proximal ascendente em camundongos LDLr  $-/-$  com 3 meses de idade tratados com uma dieta padrão (grupo C) foi tênue, quando comparado com os animais do tipo selvagem. Por outro lado, o tratamento dos camundongos LDLr  $-/-$  com a dieta HC por 30 dias levou a uma intensa deposição de lipídeos (coloração vermelha) na aorta proximal ascendente, caracterizando uma lesão aterosclerótica inicial nestes animais (Figura 6). Os animais do tipo selvagem não apresentaram depósitos lipídicos na parede vascular. As fotomicrografias apresentadas na figura 6 são representativas, no entanto não foi realizada análise quantitativa neste protocolo experimental.



**Figura 6: Efeito da dieta hipercolesterolêmica sobre a lesão aterosclerótica na aorta proximal ascendente de camundongos LDLr  $-/-$ .** Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos, corados com *Oil red O*, na região da aorta proximal ascendente de camundongos. As setas indicam áreas de deposição de lipídeos (coloração vermelha). Aumento 40x. CS, controle do tipo selvagem; C, controle, camundongos LDLr  $-/-$  tratados com dieta padrão; (HC), hipercolesterolêmico, camundongos LDLr  $-/-$  tratados com dieta HC.

Os resultados acima apresentados indicam que o tratamento por 30 dias com uma dieta rica em lipídeos gerou um quadro de hipercolesterolemia, prejuízos na função vascular (contração e relaxamento) e desenvolvimento de lesões ateroscleróticas nos camundongos LDLr -/-. Com base nisso, este protocolo experimental foi utilizado para avaliar o efeito antiaterogênico do composto objeto do presente estudo.

#### **4.1.2 Efeito do disseleneto de difenila sobre a aterosclerose experimental induzida pela dieta hipercolesterolêmica em camundongos LDLr -/-**

##### **4.1.2.1 Efeito do disseleneto de difenila sobre o peso corporal e lipídeos plasmáticos em camundongos LDLr -/- submetidos à dieta hipercolesterolêmica**

Após 30 dias de tratamento foram determinados os níveis de colesterol total, frações HDL e (VLDL + LDL + IDL), e triglicerídeos. Os animais LDLr -/- que receberam dieta hipercolesterolêmica apresentaram níveis plasmáticos de colesterol total significativamente mais elevados ( $p < 0,001$ ) do que os animais que receberam dieta padrão para roedores (Tabela 5). O tratamento por via oral com DD na menor dose (0,1 mg/kg/dia) aumentou, embora de maneira discreta, os níveis de colesterol total, quando comparados aos animais hipercolesterolêmicos, sendo que o mesmo não ocorreu nos animais tratados com 1 mg/kg/dia de DD. No entanto, apesar deste aumento, as doses de 0,1 e 1 mg/kg/dia foram capazes de reduzir significativamente a razão (LDL + VLDL + IDL)/HDL quando comparado ao grupo não tratado. Por outro lado, o tratamento destes animais com 10 mg/kg/dia de DD levou a um aumento dos níveis de colesterol total ( $p < 0,05$ ), porém sem modificações na razão entre as lipoproteínas. As concentrações plasmáticas de triglicerídeos não foram modificadas em nenhum dos grupos experimentais.

Com relação à variação de peso nos animais, pode-se verificar que os animais tratados com DD 1 mg/kg/dia apresentaram perda de peso corporal em relação aos animais HC, entretanto este fato foi mais evidente nos animais tratados com a dose de 10 mg/kg/dia de DD (Tabela 5).

**Tabela 5: Efeito do tratamento com DD sobre a variação de peso (peso final – inicial) e lipídeos plasmáticos de camundongos LDLr -/- submetidos à dieta hipercolesterolêmica.**

	$\Delta$ peso (peso final – inicial) (g)	Colesterol total (mg/dL)	(LDL+VLDL+ IDL)/ HDL	Triglicerídeos (mg/dL)
<b>C</b>	-0,05 $\pm$ 0,15	210,6 $\pm$ 13,4	0,7 $\pm$ 0,3	72,8 $\pm$ 11,4
<b>HC</b>	1,33 $\pm$ 0,39 <sup>##</sup>	834,1 $\pm$ 20,7 <sup>#</sup>	13,4 $\pm$ 2,3 <sup>#</sup>	132,1 $\pm$ 12,7
<b>HC + DD 0,1</b>	1,20 $\pm$ 0,31	1180,0 $\pm$ 64,1*	7,8 $\pm$ 0,9**	174,7 $\pm$ 38,0
<b>HC + DD 1</b>	-0,72 $\pm$ 0,18***	865,0 $\pm$ 42,5	8,8 $\pm$ 0,8*	151,6 $\pm$ 16,4
<b>HC + DD 10</b>	-2,28 $\pm$ 0,35***	1058,0 $\pm$ 57,5*	16,2 $\pm$ 1,8	191,9 $\pm$ 23,2

C, Controle; HC, Controle Hipercolesterolêmico; HC + DD 0,1, Hipercolesterolêmico + DD 0,1 mg/kg; HC + DD 1, Hipercolesterolêmico + DD 1,0 mg/kg e HC + DD 10 mg/kg, Hipercolesterolêmico + DD 10 mg/kg;

Dados apresentados como média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM) de 7-8 animais por grupo;

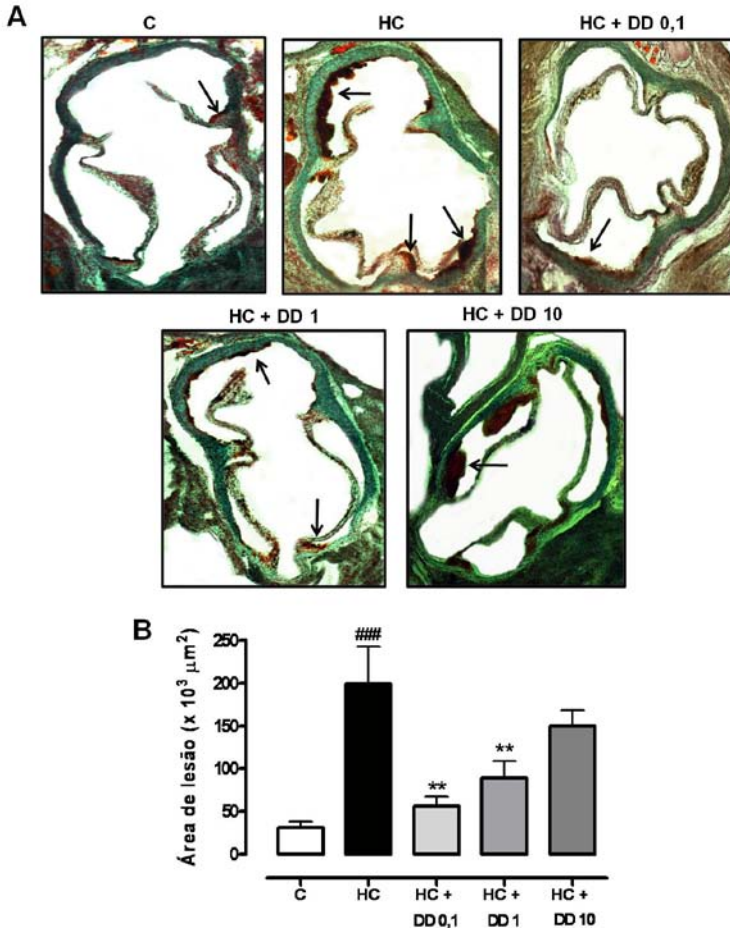
<sup>#</sup>p < 0,05; <sup>##</sup>p < 0,01; <sup>###</sup>p < 0,001 indica a diferença quando comparado a C;

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 indica a diferença quando comparado a HC;

ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

#### **4.1.2.2 Efeito do disseleneto de difenila sobre a área de lesão aterosclerótica induzida pela dieta hipercolesterolêmica em camundongos LDLr-/-**

A Figura 7 demonstra o efeito do DD sobre a lesão aterosclerótica na aorta proximal ascendente ou raiz da aorta dos animais LDLr -/-. De acordo com nossos dados anteriores, a ingestão da dieta HC por 30 dias induziu o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas significativamente maiores que nos animais controle que receberam dieta padrão. Os animais tratados com DD, nas doses de 0,1 e 1 mg/kg/dia, apresentaram uma redução significativa da área da placa quando comparados aos animais controle hipercolesterolêmicos (inibição de 71,7% na dose de 0,1 mg/kg/dia e 55,3% na dose de 1 mg/kg/dia, p < 0,01 e p < 0,05, respectivamente). O tratamento com a dose de 10 mg/kg/dia não foi capaz de modificar o tamanho da lesão em relação ao controle HC (Figura 7A e B).

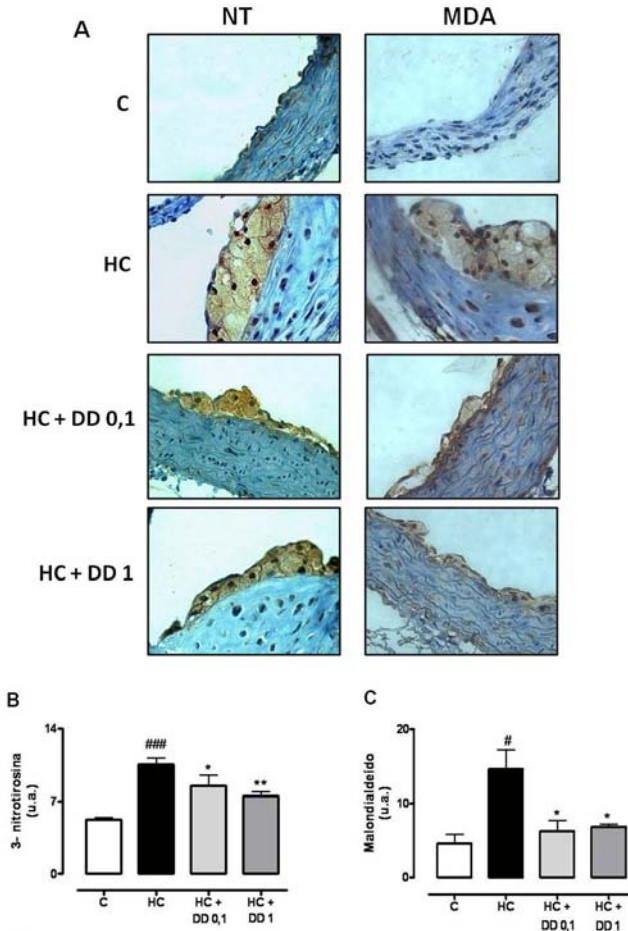


**Figura 7: Efeito do tratamento com DD sobre a lesão aterosclerótica induzida pela dieta hipercolesterolêmica em camundongos LDLr<sup>-/-</sup>.** (A) Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos da região da aorta proximal ascendente corados com *Oil Red O* de camundongos LDLr<sup>-/-</sup>. As setas indicam áreas de deposição de lipídeos (coloração vermelha). Aumento 40x. (B) Quantificação da área de lesão (μm<sup>2</sup>). C, Controle; HC, Controle Hipercolesterolêmico; HC + DD 0,1, Hipercolesterolêmico + DD 0,1 mg/kg; HC + DD 1, Hipercolesterolêmico + DD 1,0 mg/kg e HC + DD 10 mg/kg, Hipercolesterolêmico + DD 10 mg/kg. Cada barra representa a média ± EPM de 6 animais por grupo. ### p < 0,001 indica a diferença quando comparado ao C; \*\*p < 0,01 indica a diferença quando comparado ao HC (ANOVA de 1 via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

Visto que, a dose de 10 mg/kg/dia não demonstrou ser efetiva em reduzir o tamanho da lesão aterosclerótica, os estudos acerca de possíveis mecanismos de ação do DD prosseguiram somente com as doses de 0,1 e 1 mg/kg/dia.

#### **4.1.2.3 Efeito do disseleneto de difenila sobre os marcadores de estresse oxidativo na lesão aterosclerótica em camundongos LDLr -/- submetidos à dieta hipercolesterolêmica**

Conforme descrito anteriormente, a aterosclerose está associada à produção excessiva de EROs e ERNs. Assim, foi utilizado como indicadores de estresse oxidativo o dano mediado por EROs/ERNs aos lipídeos e proteínas, por meio da quantificação da expressão de MDA e NT, na raiz da aorta dos camundongos LDLr -/-. Os resultados obtidos demonstraram que a dieta HC aumentou significativamente os níveis de NT e MDA na parede vascular ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). Por outro lado, o tratamento com DD, nas duas doses utilizadas, foi capaz de prevenir o aumento de ambos marcadores na parede vascular (Figura 8). As fotomicrografias representam apenas uma região da aorta proximal ascendente (aumento de 400x).



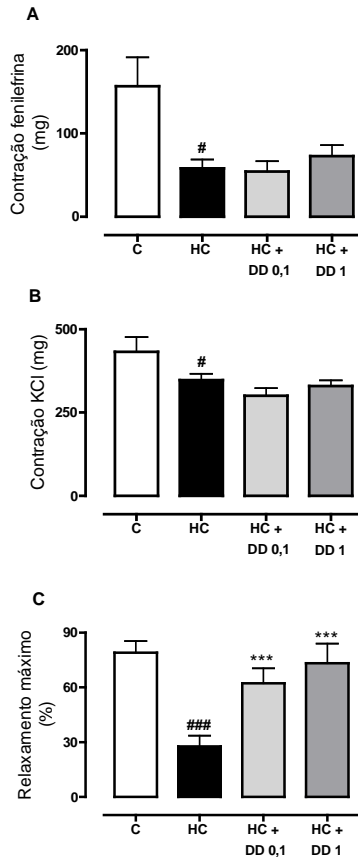
**Figura 8: Efeito do tratamento com DD sobre os marcadores de estresse oxidativo (3-nitrotirosina, NT e malondialdeído, MDA) em camundongos LDLR<sup>-/-</sup> submetidos à dieta hipercolesterolêmica. (A)** Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos da região da aorta proximal ascendente. A coloração marrom indica regiões com marcação positiva para NT e MDA. Aumento 400x. **(B e C)** Quantificação da imunomarcação para NT e MDA (unidades arbitrárias, u.a.). C, Controle; HC, Controle Hipercolesterolêmico; HC + DD 0,1, Hipercolesterolêmico + DD 0,1 mg/kg e HC + DD 1, Hipercolesterolêmico + DD 1,0 mg/kg. Cada barra representa a média ± EPM de 6 animais por grupo. #  $p < 0,05$ ; ###  $p < 0,001$  indica a diferença quando comparado ao C; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  indica a diferença quando comparado ao HC (ANOVA de 1 via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).



#### **4.1.2.4 Efeito do disseleneto de difenila sobre a reatividade vascular em aorta torácica isolada de camundongos LDLr -/- submetidos à dieta hipercolesterolemica**

Na figura 9A, estão representadas as contrações máximas induzidas pela fenilefrina ( $1 \mu\text{M}$ ) nos diferentes grupos experimentais. A hipercolesterolemia promoveu uma redução na resposta contrátil à fenilefrina ( $\cong 63\%$ ,  $p < 0,05$ ) quando comparado aos animais controle. De maneira semelhante, a contração induzida pelo KCl ( $60 \text{ mM}$ ) também foi reduzida na aorta dos camundongos hipercolesterolêmicos ( $\cong 20\%$ ,  $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. O tratamento com DD não modificou a resposta contrátil ao agonista  $\alpha$ -adrenérgico, nem ao KCl em relação ao grupo tratado com a dieta HC (Figura 9B).

Em relação à resposta vasodilatadora promovida pela acetilcolina ( $3 \mu\text{M}$ ), foi verificado que em aorta de camundongos LDLr -/- submetidos à dieta HC ocorre um intenso prejuízo no relaxamento máximo em relação aos animais controle ( $p < 0,001$ ). No entanto, quando os animais receberam DD, nas duas doses estudadas, observa-se um aumento nesta resposta em relação aos camundongos hipercolesterolêmicos ( $p < 0,001$ ) (Figura 9C).

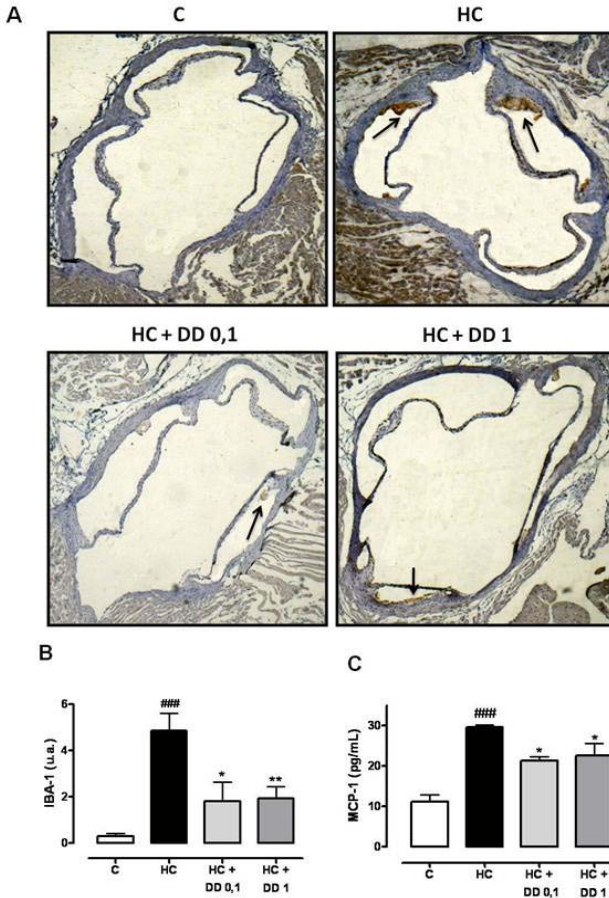


**Figura 9: Efeito do tratamento com DD sobre a resposta contrátil e vasodilatadora em anéis de aorta torácica isolada de camundongos LDLr<sup>-/-</sup> submetidos à dieta hipercolesterolêmica.** Efeito contrátil da fenilefrina (1  $\mu$ M) (A) e do KCl (60 mM) (B) em anéis de aorta torácica isolada de camundongos LDLr<sup>-/-</sup>. (C) Relaxamento máximo em resposta à acetilcolina (3  $\mu$ M) em anéis de aorta torácica isolada, pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu$ M), de camundongos LDLr<sup>-/-</sup>. C, Controle; HC, Controle Hipercolesterolêmico; HC + DD 0,1, Hipercolesterolêmico + DD 0,1 mg/kg e HC + DD 1, Hipercolesterolêmico + DD 1,0 mg/kg. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-8 anéis por grupo. <sup>#</sup>p < 0,05; <sup>###</sup>p < 0,001 indica a diferença quando comparado ao C; <sup>\*\*\*</sup>p < 0,001 indica a diferença quando comparado ao HC (ANOVA de 1 via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

#### **4.1.2.5 Efeito do disseleneto de difenila sobre marcadores inflamatórios circulantes e na lesão aterosclerótica induzidos pela dieta hipercolesterolêmica**

Para verificar um possível efeito do DD sobre alguns indicadores de inflamação no processo aterosclerótico, foram avaliadas a concentração plasmática da quimiocina MCP-1 e a infiltração de macrófagos diretamente na lesão, utilizando um marcador de macrófagos ativados, o IBA-1.

Os resultados apresentados na Figura 10 demonstram que o acúmulo de macrófagos na lesão aterosclerótica em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> alimentados com a dieta HC foi acompanhado de elevação nos níveis de MCP-1 circulantes. Todavia, o tratamento com DD, em ambas as doses utilizadas neste estudo, foi capaz de diminuir significativamente tanto a deposição de macrófagos na lesão ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , para as doses de 0,1 e 1 mg/kg/dia de DD respectivamente) (Figura 10A e B), quanto as concentrações plasmáticas de MCP-1 em relação aos animais hipercolesterolêmicos ( $p < 0,05$ ) (Figura 10C).

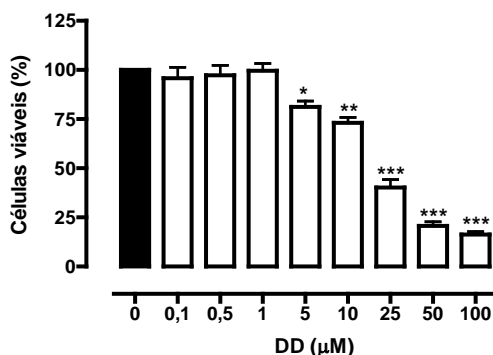


**Figura 10: Efeito do tratamento com DD sobre a infiltração macrófagos e níveis plasmáticos de MCP-1 em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> submetidos à dieta hipercolesterolêmica.** (A) Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos da região da aorta proximal ascendente. A coloração marrom indica regiões com marcação positiva para macrófagos (IBA-1 positivas). Aumento 40x. (B) Quantificação da imunomarcagem para macrófagos (IBA-1) (unidades arbitrárias, u.a.). (C) Concentração plasmática de MCP-1 (pg/mL) detectada através de ensaio imunoenzimático. C, Controle; HC, Controle Hipercolesterolêmico; HC + DD 0,1, Hipercolesterolêmico + DD 0,1 mg/kg e HC + DD 1, Hipercolesterolêmico + DD 1,0 mg/kg. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo. ###  $p < 0,001$  indica a diferença quando comparado ao C; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  indica a diferença quando comparado ao HC (ANOVA de 1 via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

## 4.2 Ensaios *in vitro* utilizando cultura de células endoteliais de aorta bovina (BAECs)

### 4.2.1 Avaliação da citotoxicidade do disseleneto de difenila sobre células endoteliais de aorta bovina (BAECs)

Com o intuito de estabelecer um intervalo de concentrações seguro para investigar o efeito do DD em BAECs, foi realizado o teste de viabilidade celular pelo método do MTT. A figura 11 apresenta a porcentagem de células viáveis na presença de concentrações crescentes de DD. A exposição por 24 horas com DD em concentrações iguais ou menores que 1  $\mu\text{M}$  não afetou a viabilidade celular. É possível observar uma diminuição significativa da viabilidade celular em relação ao controle (ausência de DD, 100) a partir de 5  $\mu\text{M}$  (81,2%,  $p < 0,05$ ), chegando a uma redução máxima da viabilidade na concentração de 100  $\mu\text{M}$  (16,1%,  $p < 0,001$ ). A concentração inibitória 50% (CI50) do DD sobre a viabilidade celular foi de 19,3 (16,1 – 23,1)  $\mu\text{M}$ .

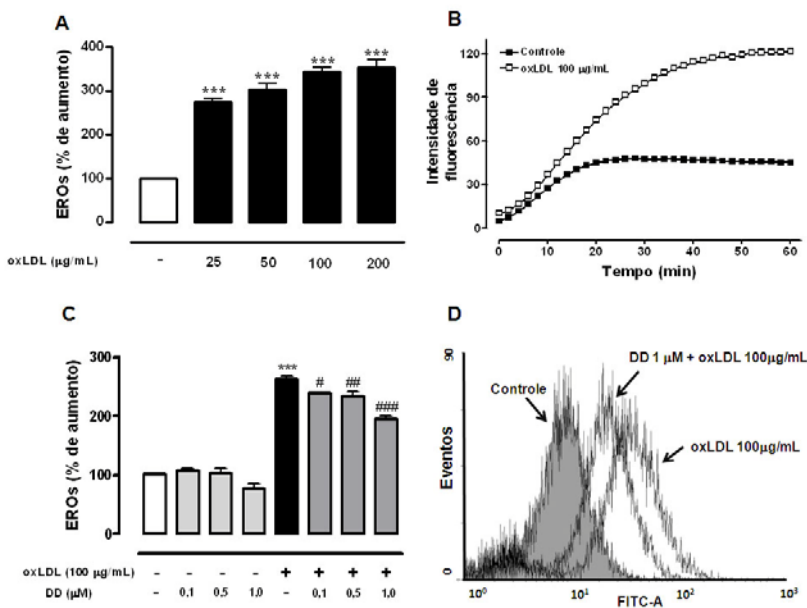


**Figura 11: Efeito do DD (0,1 – 100  $\mu\text{M}$ ) sobre a viabilidade celular em células endoteliais de aorta bovina (BAECs).** As células foram incubadas com concentrações crescentes de DD por 24 horas (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ) e em seguida avaliadas pelo ensaio do MTT. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM da porcentagem de células viáveis em relação ao controle (ausência de DD, 100 de 3 experimentos independentes em triplicata. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo (ANOVA de 1 via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

Somente concentrações de DD abaixo do limite de toxicidade (até 1 $\mu\text{M}$ ) foram utilizadas nos ensaios posteriores.

#### 4.2.2 Efeito do disseleneto de difenila sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em BAECs estimuladas com oxLDL

A Figura 12 demonstra o efeito da oxLDL e do pré-tratamento com DD sobre a produção intracelular de EROs, avaliada pela oxidação da sonda fluorescente DCFH-AC por citometria de fluxo. A exposição das BAECs à oxLDL induziu um aumento dependente da concentração ( $\beta = 0,869$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 12A) na geração de EROs. A avaliação da cinética de produção de EROs induzida pela oxLDL, mostra uma curva hiperbólica de produção, atingindo valores máximos e constantes após 20-30 minutos de exposição (Figura 12B). A concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  de oxLDL, com 1 hora de exposição, foi utilizada para avaliar o efeito do DD sobre a indução de EROs mediada pela oxLDL em BAECs. O pré-tratamento por 24 horas com DD (0,1; 0,5 ou 1  $\mu\text{M}$ ) foi capaz reduzir significativamente e de forma dependente da concentração, a geração de EROs induzida pela exposição à oxLDL (Figura 12C e D). Outro fato importante é que o DD *per se* não induz a produção de EROs quando adicionado às células na ausência de oxLDL (Figura 12C).



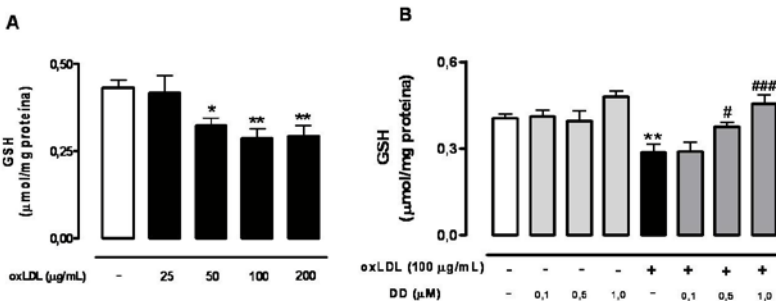
**Figura 12: Efeito do DD sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzida por oxLDL em BAECs. (A)** Células tratadas com concentrações crescentes de oxLDL (25 - 200 µg/mL) ou veículo por 1 hora e incubadas com DCFH-DA (10 µM) por 30 min. A intensidade de fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo e a porcentagem de EROs calculada em relação ao controle (100%). **(B)** Curva temporal representativa da geração de EROs em BAECs estimuladas com oxLDL (100 µg/mL) e incubadas com DCFH-DA (10 µM). **(C)** Células foram pré-incubadas com DD (0,1; 0,5 ou 1 µM) por 24 horas e posteriormente estimuladas com oxLDL (100 µg/mL) ou veículo por 1 hora. Após a incubação com DCFH-DA (10 µM) por 30 min, as amostras foram avaliadas por citometria de fluxo. **(D)** Histograma representativo do ensaio de citometria de fluxo. Cada barra representa a média ± EPM da porcentagem de aumento de EROs em relação ao controle (células não tratadas) de 3 experimentos independentes em triplicata. \*\*\*p < 0,001 comparado ao grupo controle; #p < 0,05; ##p < 0,01; ###p < 0,001 comparado ao grupo oxLDL 100 µg/mL (ANOVA de 1 via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

#### 4.2.3 Efeito do disseleneto de difenila sobre a concentração intracelular de GSH em BAECs estimuladas com oxLDL

Dados da literatura reportam que oxLDL exerce citotoxicidade em células endoteliais, sendo este efeito associado à depleção de GSH

(Therond et al., 2000). Assim, avaliamos se o composto em estudo seria capaz de prevenir esta redução intracelular de GSH.

A exposição de BAECs à oxLDL, a partir de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 1 hora induziu a uma depleção significativa do conteúdo de GSH (Figura 13A). O pré-tratamento com DD 0,5 e 1  $\mu\text{M}$  por 24 horas, preveniu a redução nos níveis de GSH desencadeada pela estimulação com oxLDL 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 13B, 0,5  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0,05$  e 1  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0,001$ ). Além disso, como no ensaio da geração de EROs, quando as células foram tratadas somente com DD não observamos mudanças no conteúdo de GSH em relação as células não tratadas (Figura 13B).



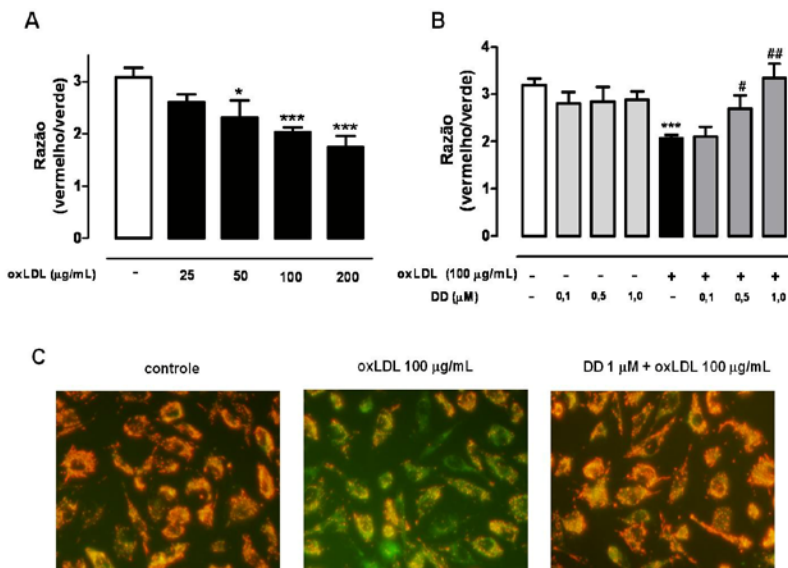
**Figura 13: Efeito do DD sobre os níveis intracelulares de GSH em BAECs estimuladas com oxLDL.** (A) Células foram incubadas com oxLDL (25 – 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou veículo por 1 hora. (B) Células foram pré-incubadas com DD (0,1; 0,5 ou 1  $\mu\text{M}$ ) ou veículo por 24 horas e em seguida estimuladas com oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou veículo por 1 hora. Ao final do tratamento as células foram coletadas e os níveis de GSH determinados por ensaio fluorimétrico. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM da concentração de GSH ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína) de 3 experimentos independentes em triplicata. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; comparado ao grupo controle (células não tratadas); # $p < 0,05$ ; ### $p < 0,001$  comparado ao grupo oxLDL 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (ANOVA de 1 via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

#### 4.2.4 Efeito do disseleneto de difenila sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em BAECs estimuladas com oxLDL

Quando as BAECs foram expostas a oxLDL, o  $\Delta\Psi_m$  diminuiu de forma dependente da concentração ( $\beta = -0,753$ ;  $p < 0,0001$ ), como indicado pelo aumento da fluorescência verde, isto é, diminuição da razão vermelho/verde (Figura 14A). O pré-tratamento com DD, 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ , por 24 horas, preveniu as alterações no  $\Delta\Psi_m$ , conforme indicado pela redução da fluorescência verde e restauração da fluorescência



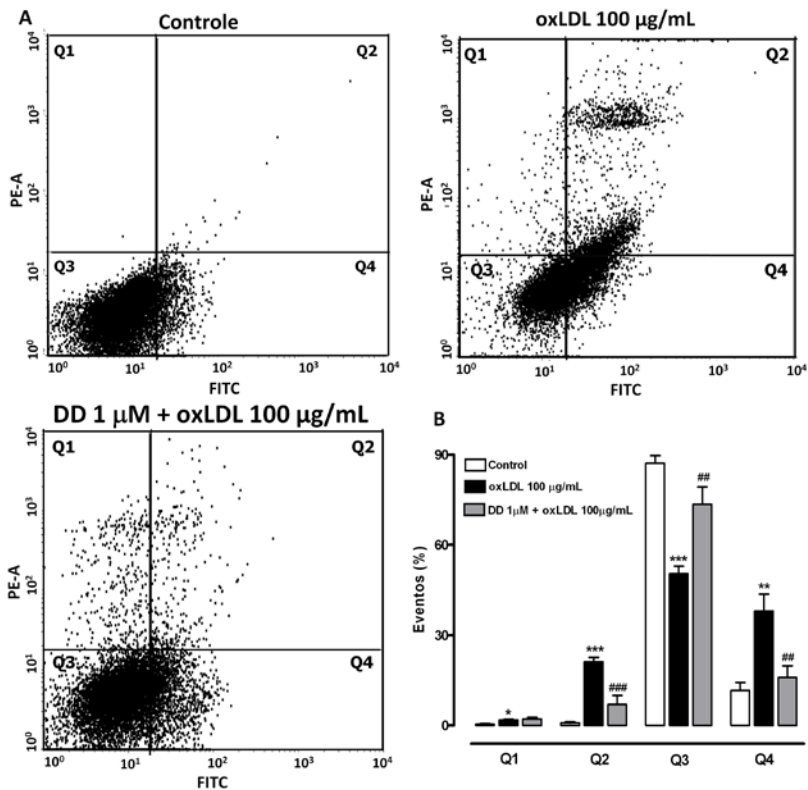
vermelha (Figura 14B e C). Assim como nos ensaios anteriores, não observamos modificações  $\Delta\Psi_m$  nas células incubadas somente com DD.



**Figura 14: Efeito do DD sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em BAECs estimuladas com oxLDL.** (A) Células foram incubadas com oxLDL (25 – 200  $\mu\text{g/mL}$ ) ou veículo por 1 hora. (B) Células foram pré-incubadas com DD (0,1; 0,5 ou 1  $\mu\text{M}$ ) ou veículo por 24 horas e em seguida estimuladas com oxLDL (100  $\mu\text{g/mL}$ ) ou veículo por 1 hora. Ao final do tratamento as células foram incubadas com JC-1 e a intensidade de fluorescência foi quantificada. (C) Fotomicrografias representativas da marcação com JC-1. A fluorescência verde indica as células com potencial de membrana mitocondrial reduzido, enquanto a fluorescência vermelha indica células com potencial estável. Aumento 400x. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM da razão da fluorescência vermelha/verde de 3 experimentos independentes em triplicata. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo controle (células não tratadas); # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  comparado ao grupo oxLDL 100  $\mu\text{g/mL}$  (ANOVA de 1 via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

#### **4.2.5 Efeito do disseleneto de difenila sobre a apoptose induzida por oxLDL em BAECs**

Para avaliar o processo de morte celular, por apoptose ou necrose, induzida por oxLDL, foi realizado o ensaio de incorporação de anexina (marcador de apoptose) e iodeto de propídio (marcador de necrose). Neste ensaio, as células foram tratadas apenas com DD 1  $\mu\text{M}$  e estimuladas com oxLDL 100  $\mu\text{g/mL}$ , sendo que estas concentrações foram escolhidas com base nos resultados anteriores. A incubação de BAECs com oxLDL 100  $\mu\text{g/mL}$  por 24 horas promoveu um aumento da porcentagem de células nos quadrantes 2 e 4 ( $p < 0,001$  e  $p < 0,01$ , respectivamente), indicando uma maior porcentagem de células em condição de apoptose quando comparado as células controle (Figura 15). O pré-tratamento das células por 24 horas com DD reduziu a apoptose induzida por oxLDL, verificado pela redução da porcentagem de células nos quadrantes 2 ( $p < 0,001$ ) e 4 ( $p < 0,01$ ) e pelo aumento na porcentagem de células viáveis ( $p < 0,01$ ; quadrante 3). Nossos dados mostram ainda que a oxLDL, na concentração utilizada, causou necrose em uma porcentagem muito pequena de células (aproximadamente 3%).



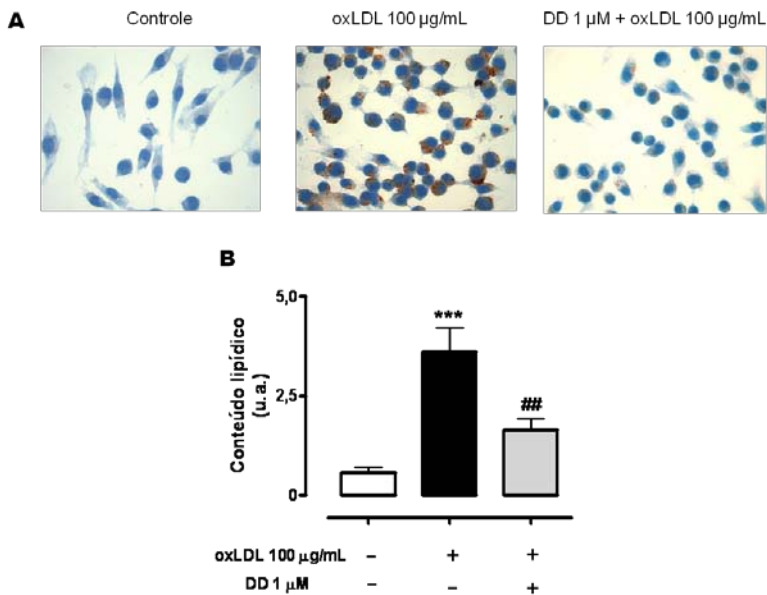
**Figura 15: Efeito do DD sobre a apoptose induzida pela oxLDL em BAECs.** As células foram pré-incubadas com DD 1 µM ou veículo por 24 horas e em seguida estimuladas com oxLDL 100 µg/mL ou veículo por mais 24 horas. Após serem coletadas as células foram marcadas com Anexina-V FITC e Iodeto de Propídio (PI) e analisadas por citometria de fluxo. **(A)** Figuras representativas (*dot plots*) dos diferentes grupos experimentais. Q1 = células necróticas (anexina V -, PI +), Q2 = células em apoptose tardia (anexina V +, PI +), Q3 = células viáveis (anexina V -, PI -) e Q4 = células em apoptose inicial (anexina V +, PI -). Cada painel demonstra a plotagem de 10.000 células por amostra de um experimento representativo. **(B)** Porcentagem de eventos/células nos diferentes quadrantes. Cada barra representa a média ± EPM de 3 experimentos independentes em triplicata. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  indica a diferença comparado ao grupo controle (células não tratadas); ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  indica a diferença comparado ao grupo oxLDL 100 µg/mL (ANOVA de 1 via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

### **4.3 Ensaios *in vitro* utilizando cultura de macrófagos murinos J774**

Nos ensaios utilizando cultura de macrófagos murinos da linhagem J744, somente uma concentração de DD (1  $\mu\text{M}$ ) e de oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi utilizada. De maneira semelhante às células endoteliais, o DD na concentração utilizada não apresentou efeito citotóxico nesta linhagem celular (dados não apresentados).

#### **4.3.1 Efeito do disseleneto de difenila sobre a formação de células espumosas induzida pela oxLDL em macrófagos murinos J774**

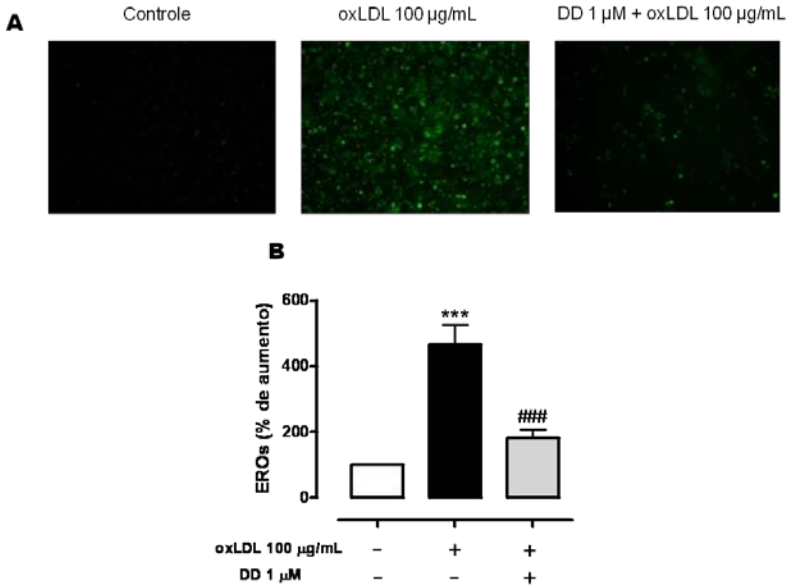
A formação de células espumosas pode ser avaliada *in vitro* através da incubação de macrófagos em cultura com oxLDL e coloração com *Oil Red O*. A exposição à oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), por 3 horas de macrófagos em cultura, induziu a formação de células espumosas pela captação desta lipoproteína pelos macrófagos (Figura 16,  $p < 0,001$ ), de maneira semelhante ao que ocorre *in vivo*. O pré-tratamento com DD 1  $\mu\text{M}$  por 24 horas reduziu significativamente o conteúdo lipídico no interior dos macrófagos, demonstrando que este composto foi capaz de diminuir a captação de oxLDL e conseqüentemente a formação de células espumosas *in vitro* (Figura 16A e B,  $p < 0,01$ ).



**Figura 16: Efeito do DD sobre a formação de células espumosas em macrófagos murinos J774 expostos a oxLDL.** (A) Fotomicrografias representativas da formação de células espumosas. Macrófagos da linhagem J774 foram pré-incubados com DD (1 µM) ou veículo por 24 horas e em seguida estimulados com oxLDL (100 µg/mL) por 3 horas. Posteriormente, as células foram fixadas e coradas com *Oil Red O* e hematoxilina de Harris. Aumento 1.000x. (B) Conteúdo lipídico das células espumosas (unidades arbitrárias, u.a.). Cada barra representa a média ± EPM de 3 experimentos independentes em triplicata. \*\*\* $p < 0,001$  indica a diferença comparado ao grupo controle (células não tratadas); ## $p < 0,01$ ; indica a diferença comparado ao grupo oxLDL 100 µg/mL (ANOVA de 1 via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

#### 4.3.2 Efeito do disselenito de difenila sobre a geração de EROs induzida pela oxLDL em macrófagos murinos J774

Para quantificar a produção de EROs em macrófagos estimulados com oxLDL, utilizamos o ensaio da DCFH-DA. De acordo com a figura 17A e B, os resultados mostraram que o DD diminuiu significativamente a geração intracelular de EROs induzida por oxLDL em macrófagos ( $p < 0,001$ ), verificada pela redução da emissão da fluorescência verde.

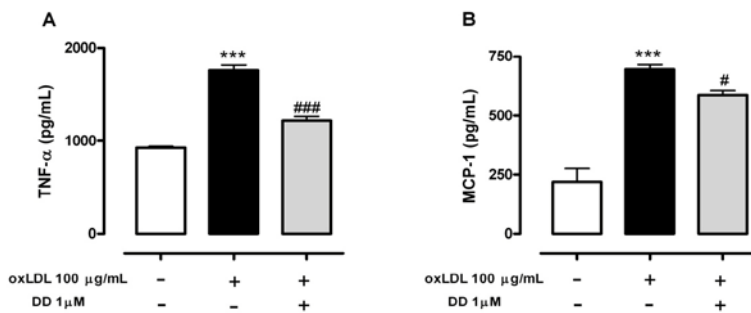


**Figura 17: Efeito do DD sobre a produção EROs em macrófagos murinos J774 estimulados com oxLDL.** (A) Fotomicrografias representativas da formação de EROs em macrófagos da linhagem J774. Células foram pré-incubadas com DD (1 µM) ou veículo por 24 horas e em seguida estimuladas com oxLDL (100 µg/mL) por 3 horas. Ao final do tratamento, as células foram incubadas com DCFH-AC (10 µM) por 30 min, em seguida as imagens foram obtidas em microscópio invertido de fluorescência. Aumento 200x. (B) Quantificação da produção de EROs. A intensidade de fluorescência foi medida em espectrofluorímetro e expressa como porcentagem de aumento em relação ao controle (100%). Cada barra representa a média ± EPM de 3 experimentos independentes em triplicata. \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo controle; ### $p < 0,001$  comparado ao grupo oxLDL 100 µg/mL (ANOVA de 1 via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

### 4.3.3 Efeito do disseleneto de difenila sobre a produção de citocinas inflamatórias em macrófagos J774 estimulados com oxLDL

A oxLDL pode estimular macrófagos a produzirem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias (Hamilton et al., 1990; Terkeltaub et al., 1994). Neste estudo, a incubação de macrófagos com oxLDL por 24 horas induziu um aumento pronunciado na produção das citocinas TNF- $\alpha$  e MCP-1 ( $p < 0,001$ ), por outro lado, o pré-tratamento com DD por 24 horas foi capaz de reduzir significativamente os níveis destas citocinas inflamatórias no sobrenadante das células (TNF- $\alpha$ ,  $p <$

0,001; MCP-1,  $p < 0,05$ ) (Figura 18A e B).



**Figura 18: Efeito do DD sobre a produção de TNF- $\alpha$  e MCP-1 em macrófagos murinos J774 estimulados com oxLDL.** Macrófagos da linhagem J774 foram pré-incubados com DD (1 $\mu$ M) ou veículo por 24 horas e em seguida estimulados com oxLDL (100  $\mu$ g/mL) por adicionais 24 horas. O sobrenadante foi coletado para determinação das concentrações de TNF- $\alpha$  (A) e MCP-1 (B) por ensaio imunoenzimático). Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes em triplicata. \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ ; ### $p < 0,001$  comparado ao grupo oxLDL 100  $\mu$ g/mL (ANOVA de 1 via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

## 5 DISCUSSÃO

A aterosclerose é uma patologia complexa que envolve múltiplas interações entre fatores genéticos e ambientais. Atualmente, o tratamento da aterosclerose consiste na utilização de fármacos capazes de reduzir a hipercolesterolemia, diminuindo os eventos clínicos e a mortalidade causados pela doença (Lusis, 2000; Insull, 2009). Entretanto, a busca por novas terapias e alvos farmacológicos que possam reduzir a progressão da aterosclerose vem crescendo nos últimos anos (Rader e Daugherty, 2008). Assim, há um grande interesse em compostos que sejam capazes de, não somente diminuir as concentrações plasmáticas de colesterol, mas de atuar em diferentes etapas no processo aterogênico. Neste contexto, destacam-se os compostos orgânicos de selênio e suas importantes propriedades farmacológicas previamente descritas (Nogueira e Rocha, 2010).

Numerosas espécies animais têm sido utilizadas para estudar a patogênese e potenciais tratamentos das lesões ateroscleróticas. A primeira evidência experimental de aterosclerose foi descrita em 1908, quando Ignatowski relatou um espessamento da camada íntima do vaso, com formação de células claras na aorta de coelhos alimentados com uma dieta rica em carne, ovos e leite (apud Jawien et al., 2004). A partir de 1920, os primeiros trabalhos utilizando modelos experimentais de aterosclerose em coelhos foram relatados (apud Williams et al., 2007). Além desta espécie, também foram desenvolvidos estudos, em menor número, em porcos, macacos, hamsters e pombos (Daugherty, 2002). Apesar de não desenvolverem aterosclerose espontaneamente, os coelhos são bastante utilizados até o presente momento, pois são altamente responsivos à ingestão de colesterol e desenvolvem lesões em curto prazo. Porém, nesta espécie, os níveis plasmáticos de colesterol são muito elevados e as lesões formadas apresentam conteúdo lipídico e inflamatório muito superior às lesões apresentadas por humanos. Recentemente, o uso de camundongos em modelos experimentais tem gerado uma explosão no número de estudos *in vivo* sobre a aterosclerose (Jawien et al., 2004).

A utilização de camundongos para o estudo do processo aterosclerótico tem várias vantagens em relação às outras espécies. Uma delas é a extensa informação genética disponível em numerosas linhagens consanguíneas. O pequeno tamanho e a alta taxa reprodutiva desta espécie também facilitam a utilização de um grande número de grupos experimentais utilizados nos estudos (Daugherty, 2002). No entanto, não há conhecimento de que camundongos do tipo selvagem



desenvolvam aterosclerose de maneira espontânea. Além disso, muitas linhagens destes animais respondem fracamente à dieta rica em colesterol e desenvolvem apenas estrias gordurosas no arco aórtico (Paigen et al., 1990). A partir de 1989, o surgimento de camundongos geneticamente modificados solucionou muitos problemas relacionados ao estudo experimental da aterosclerose (Ohashi et al., 2004). Os camundongos com deleção gênica de apolipoproteína E (apoE  $-/-$ ) ou do receptor de LDL (LDLr  $-/-$ ) são os mais empregados atualmente.

Os camundongos LDLr  $-/-$ , desenvolvidos em 1993 por Ishibashi e colaboradores, apresentam hipercolesterolemia, caracterizada por níveis moderados de LDL e podem desenvolver lesões ateroscleróticas a longo prazo. As partículas de VLDL e LDL normalmente competem por receptores hepáticos comuns, denominados receptores de LDL ou B/E, os quais reconhecem as apolipoproteínas B e E (apoB e apoE), presentes nestas lipoproteínas (Catanozi et al., 2003; Jawien et al., 2004). Os camundongos LDLr  $-/-$  apresentam moderada hipercolesterolemia devido à ausência de receptores hepáticos para LDL, os quais prolongam a meia-vida plasmática da VLDL e LDL (Kowala et al., 2000). Todavia, quando alimentados com uma dieta rica em colesterol, esses animais tornam-se severamente hipercolesterolêmicos, desenvolvendo aterosclerose aórtica que pode evoluir para o desenvolvimento de xantomas subcutâneos (Ishibashi et al., 1993; Kowala et al., 2000; Daugherty, 2002). Algumas características deste modelo animal podem trazer vantagens para sua utilização, tais como: (1) a semelhança à condição humana de hipercolesterolemia familiar, causada por mutações no gene para o receptor de LDL; (2) o perfil de lipoproteínas plasmáticas, que se assemelha ao de humanos, estando a maior parte do colesterol confinado na fração LDL; e (3) o grau de dislipidemia intermediário, desenvolvendo lesões menos avançadas do que os camundongos apoE  $-/-$  (Zadelaar et al., 2007). Além disso, evidências da literatura demonstram que os camundongos LDLr  $-/-$  podem fornecer resultados de valor preditivo relevante na pesquisa de novos compostos para o tratamento e prevenção da aterosclerose (Cyrus et al., 2003; 2006).

Nossos resultados demonstraram que os níveis de colesterol total em camundongos LDLr  $-/-$  adultos, alimentados com dieta padrão é significativamente superior (2,8 vezes) ao controle do tipo selvagem, todavia, as inclusões lipídicas vasculares nestes animais são ainda muito insipientes. Porém, quando estes animais foram alimentados com uma dieta rica em colesterol por um período de 30 dias, o quadro de hipercolesterolemia agravou-se (aumento de cerca de 3,6 vezes em

relação ao grupo LDLr  $-/-$  com dieta padrão), promovendo a deposição de lipídeos na raiz da aorta e diminuindo a responsividade vascular a vasoconstritores e vasodilatadores que atuam via endotélio (Tabela 4 e Figura 6). Muitos estudos utilizam um longo período de exposição (12-16 semanas) destes animais à dieta rica em lipídeos para que ocorra a indução de lesões ateroscleróticas (Babaei et al., 2002; Cyrus et al., 2002). Entretanto, alguns trabalhos têm verificado que camundongos LDLr  $-/-$  que recebem uma dieta hipercolesterolêmica por apenas 2 semanas já apresentam lesões mensuráveis no seio aórtico, caracterizando estágios iniciais do processo aterosclerótico (Krieger et al., 2006; Garcia et al., 2008).

Uma vez padronizado e caracterizado o modelo experimental, os possíveis efeitos protetores do DD, objeto deste estudo, foram investigados sobre a aterosclerose em camundongos LDLr  $-/-$ . O tratamento dos animais foi realizado por via oral uma vez ao dia, em três diferentes doses (0,1; 1 e 10 mg/kg/dia). Esta via de administração foi escolhida pois a maioria dos fármacos utilizados no tratamento da aterosclerose é administrada por via oral. No entanto, existem poucos estudos relacionados à absorção deste composto por esta via. Recentemente, foi demonstrado por Prigol e colaboradores (2009), que 30 minutos após a administração de DD (500 mg/kg dissolvido em óleo de canola), em camundongos, ocorre um pico plasmático deste composto (aproximadamente 10  $\mu\text{g/mL}$ ). Além disso, verificou-se que 8 horas após a administração do DD ainda era possível detectar o composto no plasma dos animais. Sabe-se ainda que este composto é altamente lipofílico e possui afinidade elevada pela albumina plasmática (99%) (Prigol, 2010). Entretanto, são necessários estudos mais detalhados com relação aos aspectos farmacocinéticos, tendo em vista que até o momento os resultados obtidos foram provenientes de estudos que utilizaram doses tóxicas deste composto.

Vários estudos têm sido realizados no intuito de estabelecer os limites de segurança e toxicidade do DD em diferentes espécies animais (ratos, camundongos e coelhos). Os efeitos tóxicos deste composto estão relacionados com a dose e via de administração, bem como a espécie animal (Nogueira et al., 2003a; de Bem et al., 2006; 2007; Meotti et al., 2003; Straliotto et al., 2010). Neste trabalho foram utilizadas doses inferiores as doses tóxicas estabelecidas na literatura. Recentemente, Savegnago e colaboradores (Savegnago et al., 2007) caracterizaram que a DL50 (Dose Letal 50%) para camundongos, por via oral, é maior do que 312 mg/kg, cerca de 30 vezes maior que a dose

mais alta utilizada neste estudo. Durante os 30 dias de tratamento não foram observados sinais de toxicidade aparente nos animais tratados com 0,1 e 1 mg/kg/dia de DD. Todavia, o tratamento com 10 mg/kg/dia causou uma redução significativa no ganho de peso corporal, podendo estar relacionado com a indução de toxicidade.

Concentrações plasmáticas elevadas de colesterol, em particular de LDL, estão entre os fatores de risco primários para o desenvolvimento da aterosclerose (Ross, 1999). Medicamentos com atividade hipolipemiante apresentam bons resultados no tratamento de pacientes com doença arterial coronariana (Rader e Daugherty, 2008). Os mecanismos responsáveis por essa ação são bem estabelecidos, e no contexto geral da patologia, reduções significativas do colesterol sérico em indivíduos com aterosclerose têm demonstrado ser uma estratégia importante para o tratamento dos pacientes com risco de doença arterial coronariana, aliados à reeducação alimentar e prática de atividades físicas. Com base nisso, avaliamos se o tratamento com DD poderia alterar as concentrações plasmáticas de lipídeos (colesterol total, lipoproteínas e triglicérides) em camundongos LDLr -/- hipercolesterolêmicos. Os resultados demonstraram que as doses de 0,1 e 1 mg/kg/dia foram capazes de reduzir significativamente a razão (LDL + VLDL + IDL)/HDL quando comparado ao grupo não tratado (Tabela 5). Recentemente, de Bem e colaboradores (2009) verificaram que o DD reduz a concentração de colesterol sérico em coelhos hipercolesterolêmicos, porém a proporção entre as lipoproteínas não foi avaliada. Corroborando nossos resultados, um estudo demonstrou que a administração de DD (10 mg/kg/dia, por via oral) diminuiu significativamente o colesterol total, colesterol não-HDL e triglicérides, enquanto aumenta os níveis de HDL em camundongos com hiperlipidemia induzida por Triton WR-1339 (da Rocha et al., 2009). Ademais, Dhingra e Bansal (2006) demonstraram que a suplementação com selênio leva a uma redução da expressão de apolipoproteína B e da enzima HMG-CoA redutase, reduzindo os níveis de colesterol total e LDL, durante a hipercolesterolemia em ratos.

A análise *in situ* do tamanho da lesão aterosclerótica, demonstrou que os animais tratados com DD, nas doses de 0,1 e 1 mg/kg/dia, apresentaram áreas de lesões significativamente menores na aorta proximal ascendente, em relação aos animais hipercolesterolêmicos (Figura 7). Conforme descrito na literatura, existe uma associação inversa entre a atividade da enzima GPx e o risco de eventos cardiovasculares em humanos (Blankenberg et al., 2003) e em modelos animais (Torzewski et al., 2007). Neste sentido, o conjunto de

nossos resultados, que evidenciam o papel antiaterogênico do DD na parede arterial pode ser atribuído, pelo menos em parte, à sua atividade mimética da GPx e ainda à sua capacidade em inibir a oxidação da LDL *in vitro* (de Bem et al., 2008). Dentro deste contexto, um estudo recente demonstrou que outro composto mimético da GPx, o ebselen, reduz as lesões ateroscleróticas em diferentes regiões da aorta de camundongos apoE<sup>-/-</sup> diabéticos, exceto no seio aórtico (Chew et al., 2009). Em nosso protocolo experimental, a dose diária de DD utilizada foi cerca de 100 vezes menor que a do ebselen, sendo capaz de reduzir as lesões ateroscleróticas na região do seio aórtico de camundongos LDLr<sup>-/-</sup>. Este fato pode estar relacionado a uma maior atividade tiol peroxidase do DD, quando comparado ao ebselen (Nogueira et al., 2004). Outro aspecto relevante é o fato de que a dose de 10 mg/kg/dia de DD não foi capaz de diminuir o tamanho da lesão, nem alterar a razão entre as lipoproteínas plasmáticas. Com base nestes dados, o composto parece não exercer seu efeito de maneira dose-dependente neste protocolo experimental. Acredita-se que altas doses de determinados compostos antioxidantes podem passar a ter uma ação pró-oxidante, limitando seus efeitos benéficos a baixas doses (Yamamoto e Niki, 1988; Parthasarathy et al., 1999).

Os demais experimentos realizados, com o intuito de esclarecer os possíveis mecanismos moleculares do efeito do DD neste modelo experimental, foram conduzidos somente com as doses diárias mais baixas do composto (0,1 e 1 mg/kg/dia) as quais demonstraram efetividade na prevenção da aterosclerose experimental. Vale ressaltar que o DD não promoveu alterações nos níveis de lipídeos plasmáticos e no tamanho das lesões ateroscleróticas, quando administrado aos animais na ausência da dieta hipercolesterolêmica.

Conforme descrito anteriormente, o processo aterosclerótico está associado à produção excessiva de EROs e ERNs. Assim, como indicadores de estresse oxidativo investigamos o dano mediado por EROs/ERNs aos lipídeos e proteínas, quantificando a expressão de MDA e NT, na aorta proximal ascendente de animais tratados com DD. Diversos estudos indicam que níveis elevados de 3-nitrotirosina podem ser detectados em placas ateromatosas através de técnicas de imunistoquímica (Mohiuddin et al., 2006). A NT é formada pela nitração de resíduos protéicos de tirosina pelo ONOO<sup>-</sup>, o qual é produzido pela rápida reação entre <sup>•</sup>NO e O<sub>2</sub><sup>-•</sup> (Radi et al., 1991). Além disso, ONOO<sup>-</sup> é um potente oxidante e pode induzir peroxidação lipídica e oxidação da LDL (Peluffo et al., 2009). O outro marcador

avaliado por imunohistoquímica foi o MDA, que é um produto final de peroxidação de lipídeos e um marcador inicial da formação da estria gordurosa. Recentemente, foi relatado um aumento nos níveis de MDA foram encontrados em homogenatos de placas ateroscleróticas de carótidas de humanos (Sigala et al., 2010). Nosso estudo demonstrou que a dieta HC aumentou significativamente os níveis destes marcadores, NT e MDA, na parede vascular, e que o tratamento com DD foi capaz de prevenir este aumento (Figura 8). Estes resultados sugerem o papel do DD em reduzir o estresse oxidativo em locais de lesão aterosclerótica, diminuindo os danos às proteínas e aos lipídeos de membrana. De fato, já se sabe que compostos orgânicos de selênio, como o ebselen, são capazes de reagir eficientemente com o ONOO<sup>-</sup>, prevenindo a oxidação e nitração de biomoléculas (Briviba et al., 1996; Arteel et al., 1998). Além disso, a diminuição da peroxidação lipídica pelo DD já foi demonstrada em diversos modelos experimentais em animais (de Bem et al., 2009; Posser et al., 2008; Barbosa et al., 2006).

A formação vascular de EROs promove a disfunção endotelial e aterogênese, em grande parte por reduzir a biodisponibilidade de <sup>•</sup>NO. A diminuição da biodisponibilidade do <sup>•</sup>NO, pela reação com O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, tem como consequência a redução dos seus efeitos vasodilatadores e vasoprotetores, causando prejuízo no relaxamento vascular dependente do endotélio e ativação/disfunção endotelial (Harrison, 1997; Bonetti et al., 2003). Esta disfunção ocorre em estágios iniciais do processo aterogênico, precedendo o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas visíveis nas artérias.

Um parâmetro essencial que caracteriza a disfunção endotelial é o prejuízo da vasodilatação dependente do endotélio induzida pela acetilcolina ou outros vasodilatadores que atuam desta maneira (Ludmer et al., 1986; Anderson, 1999). Em nossos ensaios, camundongos LDLr<sup>-/-</sup> submetidos à dieta HC apresentaram uma redução no relaxamento máximo induzido pela acetilcolina em anéis de aorta torácica isolada quando comparado aos animais controle. Por outro lado, o tratamento com DD foi capaz de preservar a resposta do endotélio aos efeitos vasodilatadores induzidos pelo agonista colinérgico (Figura 9C). De acordo com Forgione e colaboradores (2002), a deficiência homozigótica de GPx-1 leva a uma diminuição da vasodilatação dependente do endotélio, provavelmente devido à redução da biodisponibilidade de <sup>•</sup>NO e aumento do estresse oxidativo vascular. Brodsky e colaboradores (2004) observaram que o ebselen melhora a vasodilatação induzida por acetilcolina e aumenta a produção de <sup>•</sup>NO

em ratos diabéticos. A capacidade do DD de aumentar a vasodilatação induzida pela acetilcolina pode estar relacionada à redução do estresse oxidativo vascular, tendo como consequência o aumento da disponibilidade de  $\text{NO}$ .

A dieta hipercolesterolêmica parece promover efeitos deletérios na função contrátil vascular nos camundongos LDLr  $-/-$ , conforme demonstrado pela redução da resposta à fenilefrina e ao KCl em anéis de aorta (Figura 9A e B). Como foram observados prejuízos na resposta aos dois agentes utilizados, sugere-se que este efeito esteja relacionado a uma diminuição da resposta contrátil das células musculares lisas. Esses dados são consistentes com o trabalho de Dupasquier e colaboradores (2006), os quais demonstraram que a exposição de coelhos a uma dieta rica em lipídeos por 6 e 16 semanas reduziu a resposta contrátil à noradrenalina e ao KCl, em anéis de aorta torácica. Em outro trabalho, utilizando experimentos *in vitro*, verificaram que a incubação de artérias carótidas isoladas de coelho com LDL oxidada diminuiu a contração induzida pela fenilefrina (Napoli et al., 1997). O excesso de colesterol pode acarretar modificações no transporte intracelular de íons, incluindo a regulação da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  nas células musculares lisas, o que poderia representar um possível mecanismo para explicar os prejuízos sobre a função vasoconstritora nos animais hipercolesterolêmicos (Broderick et al., 1989; Bialecki et al., 1991; Gleason et al., 1991; Saini et al., 2004). Além disso, o processo aterosclerótico pode induzir mudanças no fenótipo das células musculares lisas e isto levaria a alterações na sua maquinaria contrátil (Mulvihill et al., 2004). Resultados anteriores de nosso grupo de pesquisa também demonstraram uma hiporresponsividade à fenilefrina em camundongos LDLr  $-/-$  tratados com a dieta HC por 12 ou 4 semanas (Dal Bó, 2009; Minatti, 2010). Todavia, relatos acerca destes efeitos neste modelo experimental são escassos na literatura. Os prejuízos na contração vascular induzida pela dieta HC não foram modificadas pelo tratamento com o DD, ao contrário do que foi observado com a resposta vasodilatadora.

Está bem estabelecido que o processo inflamatório e especialmente monócitos/macrófagos possuem um papel importante na formação da placa aterosclerótica (Hansson et al., 2006). Macrófagos possuem funções essenciais em todas as fases da aterosclerose, desde o desenvolvimento da estria gordurosa até o processo de ruptura da placa (Li e Glass, 2002). A ativação de macrófagos na parede arterial induzida pela LDL oxidada, leva à liberação de moléculas vasoativas, produção

de EROs e secreção de enzimas proteolíticas que degradam componentes da matriz extracelular (Hansson et al., 2006). Assim, lesões com níveis elevados de células inflamatórias são mais susceptíveis à ruptura e a redução do conteúdo destas células contribui para aumentar sua estabilidade (Libby, 2002).

Moléculas quimioatraentes são responsáveis pela migração de leucócitos para os locais susceptíveis às lesões, possuindo um papel central no desenvolvimento da aterosclerose. MCP-1 e seu receptor CCR2 são mediadores chaves na inflamação vascular, atuando como potentes agentes quimiotáticos para monócitos (Reape e Groot, 1999). Resultados do presente estudo demonstraram que o acúmulo de macrófagos na lesão aterosclerótica foi acompanhado de níveis elevados de MCP-1 circulantes em camundongos LDLr *-/-* alimentados com uma dieta rica em colesterol. Todavia, o tratamento com DD foi capaz de diminuir significativamente a deposição de macrófagos na lesão bem como reduzir os níveis plasmáticos de MCP-1 (Figura 10). Assim, parece plausível inferir que a capacidade do DD em reduzir o acúmulo de macrófagos na lesão aterosclerótica esteja relacionada à redução do recrutamento de monócitos para a parede vascular através da molécula quimiotática MCP-1. A inibição da resposta inflamatória é amplamente reconhecida como benéfica à doença arterial coronariana, especialmente em estágios iniciais da doença (Ross, 1999; Hernandez-Presa et al., 2002). Os achados do presente estudo corroboram estudos prévios que demonstraram o efeito anti-inflamatório do DD em modelos clássicos de inflamação em ratos (Nogueira et al., 2003b).

Nos experimentos *in vivo*, observou-se que o DD protegeu contra a formação de lesões ateroscleróticas e melhorou a função endotelial em camundongos LDLr *-/-*, atenuando importantes vias envolvidas na evolução do processo aterogênico. Demonstramos ainda que o efeito antiaterogênico composto foi relacionado a redução dos marcadores de estresse oxidativo e células inflamatórias no local da lesão, diminuição da produção sistêmica de MCP-1 e a proporção alterada entre as lipoproteínas plasmáticas. Deste modo, podemos sugerir que o efeito antiaterogênico do DD verificado neste estudo se deve em grande parte aos seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. Para tentar elucidar e caracterizar os mecanismos pelos quais o DD promove seus efeitos antiaterogênicos, a etapa seguinte deste trabalho consistiu em avaliar os efeitos do DD, *in vitro*, sobre a toxicidade induzida pela oxLDL em dois tipos celulares extremamente relevantes para esta patologia - células endoteliais e macrófagos.

Conforme descrito anteriormente, a captação e o consequente acúmulo de oxLDL nos macrófagos, constituem estágios iniciais do processo aterosclerótico. Estas lipoproteínas oxidadas são encontradas em áreas ateroscleróticas (Steinberg, 1997) e exibem várias propriedades biológicas envolvidas na aterogênese, entre as quais, a capacidade de induzirem a expressão de moléculas de adesão (com subsequente entrada de células mononucleares); formação de células espumosas, migração e proliferação de células musculares; alterações na matriz extracelular e em vias de coagulação bem como na regulação do tônus arterial (Takei et al., 2001; Chen et al., 2007; Sonoki et al., 2002).

Pesquisas demonstram que as oxLDLs exibem efeitos tóxicos em cultura de células endoteliais, musculares lisas e macrófagos, induzindo apoptose e necrose (Salvayre et al., 2002). A maioria destes estudos foi realizada *in vitro* e utilizou LDL humana isolada, preparada a partir de plasma e oxidada na presença de íons metálicos, tais como  $\text{Cu}^{+2}$  (Galle et al., 2006). Em condições experimentais, a formação da oxLDL é caracterizada por uma sequência de eventos que iniciam com a perda de antioxidantes endógenos da LDL, incluindo o  $\alpha$ -tocoferol, seguido pela conversão da maioria dos ácidos graxos poliinsaturados em seus correspondentes hidroperóxidos. Esses produtos de peroxidação primária, tais como MDA e 4-hidroxinonenal, reagem com resíduos de lisina da apo B-100, provocando a oxidação da parte protéica da lipoproteína (Burkitt, 2001; Stocker e Keaney, 2004).

Na camada íntima do vaso, a oxLDL pode ser captada rapidamente por receptores expressos pelos macrófagos, como o receptor *scavenger* de classe A (SRAI/II) e o CD36, formando células espumosas (Steinberg, 2002; Collot-Teixeira et al., 2007). Nossos dados mostram que o DD reduziu significativamente o conteúdo lipídico no interior dos macrófagos, demonstrando que este composto foi capaz de diminuir a captação de oxLDL e consequentemente a formação de células espumosas (Figura 16). Este fato pode ter acontecido em decorrência da diminuição da ativação dos macrófagos e consequentemente da exposição de seus receptores *scavenger*. Contudo estes efeitos precisam ser esclarecidos em estudos posteriores.

A resposta antioxidante mediada pelo DD, verificada pela oxidação da sonda fluorescente DCFH-AC, frente à produção de EROs induzida pela oxLDL, foi determinada em macrófagos. A exposição dos macrófagos à oxLDL estimulou a produção de EROs por estas células (Figura 17). Da mesma forma, Deng e colaboradores (2008) verificaram que o tratamento de macrófagos U937 com oxLDL aumenta



a produção de  $\bullet\text{NO}$ ,  $\text{O}_2\bullet^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{ONOO}^-$  de maneira tempo-dependente. Uma vez formadas, as EROs/ERNs induzem múltiplos efeitos celulares tais como: a estimulação de genes pró-inflamatórios, eventos apoptóticos e mobilização de cálcio (Bae et al., 2009). Neste estudo, o pré-tratamento com DD foi capaz de diminuir a geração de EROs induzida por oxLDL, o que pode explicar, em parte, os efeitos benéficos do DD neste tipo celular (diminuição da incorporação de oxLDL e da secreção de citocinas inflamatórias).

A oxLDL pode estimular macrófagos a produzirem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias. De acordo com a literatura, a oxLDL pode ativar NF- $\kappa\text{B}$ , que acentua a expressão de genes que codificam TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e MCP-1 em células que participam da formação da lesão aterosclerótica (Hamilton et al., 1990; Terkeltaub et al., 1994). Neste estudo, a incubação de macrófagos com oxLDL por 24 horas induziu a liberação de TNF- $\alpha$  e MCP-1. O tratamento prévio com DD foi capaz de reduzir significativamente o aumento dos níveis destas citocinas inflamatórias induzido pela oxLDL (Figura 18). Consistente com nossos resultados, Shin e colaboradores (2009) demonstraram que outro diaril disseleneto, o bis-(3-hidroxifenil) disseleneto, diminuiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , através da redução da atividade do NF- $\kappa\text{B}$  em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). Considerando que o NF- $\kappa\text{B}$  é um fator de transcrição redox-sensível, podendo ser ativado por EROs (Robbesyn et al., 2004), a redução da produção de citocinas pelo DD poderia ser resultado de suas propriedades antioxidantes. A diminuição de EROs intracelulares, gerados pela oxLDL, levaria a uma diminuição da ativação do NF- $\kappa\text{B}$  e consequentemente da produção de citocinas.

As modificações morfológicas de células endoteliais em cultura associadas com a toxicidade da oxLDL são similares às observadas *in vivo*, nas células endoteliais que recobrem as lesões ateroscleróticas (Salvayre et al., 2002). Células endoteliais expostas a oxLDL, *in vitro* ou *in vivo*, apresentam aumento da permeabilidade, produção aumentada de EROs e são induzidas a apoptose (Liao et al., 1995; Cominacini et al., 2000). No presente trabalho, verificamos que a exposição de células endoteliais de aorta bovina (BAECs) a concentrações crescentes de oxLDL, leva à formação intracelular de EROs (Figura 12). Kugiyama e colaboradores (1999) verificaram que produtos da peroxidação lipídica da LDL aumentam a formação de  $\text{O}_2\bullet^-$  em células endoteliais humanas. As fontes geradoras de EROs e ERNs

nas células endoteliais expostas à oxLDL são múltiplas, incluindo sistemas enzimáticos como a ativação da NADPH oxidase (Heinloth et al., 2000), o desacoplamento da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Fleming et al., 2005) e a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (Zmijewski et al., 2005). Esta produção pode ainda ser desencadeada pela ligação da oxLDL a seu receptor, LOX-1, neste tipo celular (Galle et al., 2006). Estratégias terapêuticas para o tratamento da aterosclerose não devem incluir apenas antioxidantes extracelulares que previnem a oxidação da LDL, mas também antioxidantes permeantes da membrana que possam inibir a geração de espécies reativas no interior da célula. Em parte, a falta de eficácia dos antioxidantes em estudos clínicos pode estar relacionada à sua incapacidade de influenciar a geração intracelular de EROs/ERNs em resposta à oxLDL (Levitan et al., 2010). Nossos resultados mostraram que o DD, um composto altamente lipofílico, diminui a produção intracelular de EROs induzida por oxLDL em células endoteliais (Figura 12). Estes resultados confirmam as propriedades antioxidantes deste composto orgânico de selênio, observadas anteriormente em outros modelos experimentais (Barbosa et al., 2006; de Bem et al., 2008). Considerando que a sonda fluorescente DCFH-DA, utilizada para estes ensaios, é capaz de detectar ambos peróxido de hidrogênio e peroxinitrito (Crow, 1997; Myhre et al., 2003), acreditamos que os efeitos antioxidantes do DD podem, ao menos em parte, serem atribuídos a sua atividade GPx mimética, responsável pela detoxificação de peróxidos gerados pela oxLDL.

A glutationa reduzida (GSH) possui um importante papel no estado redox da célula e sua concentração intracelular é diminuída frente a uma situação de estresse oxidativo (Pastore et al., 2003). Dados da literatura reportam que a oxLDL, e frações lipídicas oxidadas desta lipoproteína exercem citotoxicidade em células endoteliais, sendo este efeito associado à depleção de GSH (Therond et al., 2000). Cho e colaboradores (Cho et al., 1999) demonstraram que a incubação de células endoteliais umbilicais humanas com oxLDL reduz a concentração de GSH, e que este efeito ocorre até 3 horas após a estimulação. Concordando com estes dados, nossos resultados mostraram que a exposição de BAECs à oxLDL, promoveu uma redução nas concentrações de GSH, a qual foi acompanhada pela geração de EROs e disfunção mitocondrial. O pré-tratamento com DD foi capaz de prevenir a depleção deste importante antioxidante, bem como a geração de espécies oxidantes (Figuras 12 e 13). Neste sentido, acreditamos que os efeitos protetores do DD frente à toxicidade da oxLDL vão além de sua atividade mimética da GPx. Como já

demonstrado recentemente para o ebselen (Tamasi et al., 2004; Kim et al., 2009), acreditamos que o DD possa ser capaz de promover a translocação do fator nrf-2, sinalizando diversas respostas celulares vinculadas à ativação dos elementos de resposta antioxidante (ARE), entre elas o aumento nos níveis de GSH e na atividade de enzimas antioxidantes. A hipótese para este mecanismo é que o DD, da mesma forma que o ebselen, reage com grupamentos sulfidríla da proteína inibitória Keap-1, liberando o nrf-2 e ativando vias de sinalização vinculadas ao sistema redox (Zhao e Holmgren, 2002; Tamasi et al., 2004). No caso das células endoteliais, o pré-tratamento com DD por 24 horas poderia levar à ativação da via de síntese de GSH, incrementando os níveis deste antioxidante e desta forma protegendo a célula dos efeitos nocivos da oxLDL. Estudos anteriores verificaram um aumento na concentração de GSH em diferentes tecidos, em animais tratados com DD expostos a danos oxidativos (de Bem et al., 2007; Borges et al., 2006; Stralioetto et al., 2010).

As mitocôndrias são ao mesmo tempo alvos e fontes biologicamente importantes de EROs/ERNs (Kowaltowski et al., 2001; Zmijewski et al., 2005). A cadeia transportadora de elétrons consome oxigênio molecular através da fosforilação oxidativa para formar ATP. No entanto, a disfunção mitocondrial pode intensificar a produção de EROs, por elétrons que escapam dos complexos I e III durante o transporte e consequentemente comprometer a síntese energética celular (Balaban et al., 2005). Recentemente, Xie e colaboradores (2010) demonstraram que a oxLDL compromete a respiração mitocondrial em células endoteliais por diminuir o potencial de membrana e a atividade de importantes enzimas mitocondriais. Da mesma forma, nossos resultados demonstraram a ação nociva da oxLDL sobre a função mitocondrial através da redução do potencial de membrana, acompanhada pelo aumento da produção de EROs e consumo de GSH. O tratamento com DD foi efetivo na manutenção da integridade mitocondrial o que pode explicar em parte, a redução da produção de EROs em células endoteliais estimuladas com oxLDL (Figura 14).

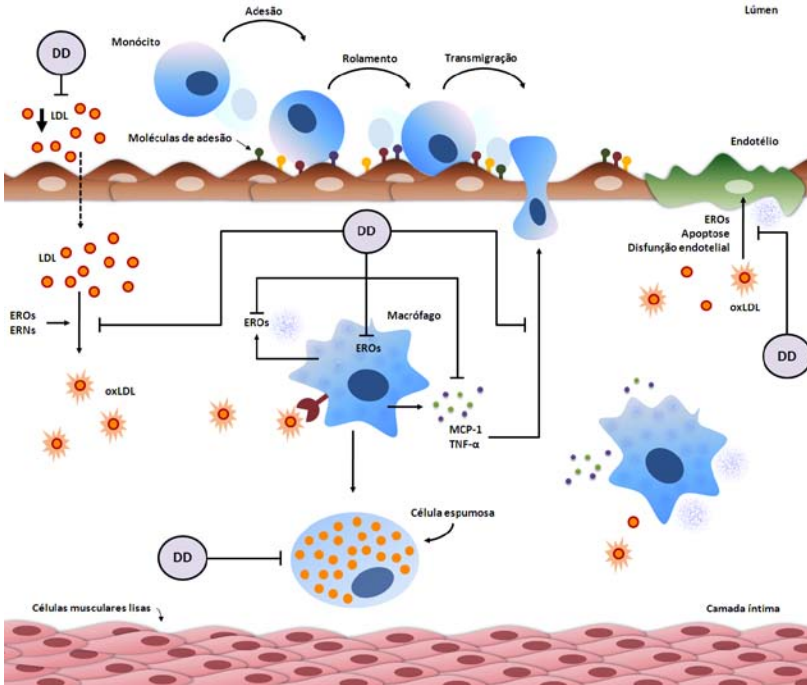
Por outro lado, conforme já descrito anteriormente, a ativação dos receptores LOX-1 pela oxLDL induz produção de EROs por diferentes processos. Estas espécies reativas, em particular o radical  $\cdot\text{OH}$  e o  $\text{ONOO}^-$  podem danificar moléculas, incluindo proteínas da cadeia transportadora de elétrons. Isto leva ao comprometimento da função mitocondrial, que resulta em perda da capacidade energética da mitocôndria, além de acentuar a produção de EROs (Crompton, 1999;

Kroemer et al., 2007). Como consequência deste processo, pode ocorrer ainda um colapso da membrana mitocondrial que leva à formação de poros, ativando proteínas pró-apoptóticas e a liberação do citocromo c para o citoplasma (Skulachev, 2000). Neste contexto, a perda do potencial de membrana mitocondrial, observada durante a exposição das células endoteliais à oxLDL, pode ser resultado do dano oxidativo promovido por EROs. Assim, o efeito protetor do DD sobre a integridade da função mitocondrial pode ser atribuído também a sua capacidade de reduzir a formação de EROs e os danos oxidativos induzidos pela oxLDL sobre a estrutura mitocondrial.

A oxLDL é indutora de apoptose de células endoteliais, potencializando a disfunção endotelial, podendo levar à ruptura ou erosão da placa e eventos aterotrombóticos subsequentes (Salvayre et al., 2002; Napoli, 2003). Neste caso, a apoptose pode ser desencadeada tanto pela via extrínseca, mediada por receptores de morte (Fas) e/ou receptores para fator de necrose tumoral (TNFR), quanto pela via intrínseca, envolvendo membros da família bcl-2, citocromo c e caspase-3 (Sata e Walsh, 1998; Vindis et al., 2005). Neste trabalho, o ensaio de incorporação de anexina V-FITC demonstrou que a oxLDL aumenta o número de células apoptóticas, enquanto as células pré-tratadas com DD apresentaram uma redução significativa na indução da apoptose mediada pela oxLDL (Figura 15). A via de indução de apoptose não foi investigada neste trabalho, porém, podemos sugerir que o DD pode estar prevenindo a ativação da via intrínseca da apoptose, tendo em vista a prevenção da diminuição do potencial de membrana mitocondrial induzido pela oxLDL nas células pré-tratadas com DD. Desta forma, o efeito antiapoptótico do DD, observado em células endoteliais estimuladas com oxLDL, pode ser atribuído à redução da produção de EROs, prevenção da depleção de GSH e manutenção do potencial de membrana mitocondrial. Este conjunto de efeitos reduz a morte celular e poderia estar implicado na manutenção da funcionalidade das células endoteliais, também observada nos experimentos *in vivo*.

A figura 19 mostra uma representação esquemática do efeito protetor do DD sobre o processo aterosclerótico. Em conclusão, esse estudo demonstra o importante papel do composto DD na prevenção da formação de lesões ateroscleróticas e aponta alguns mecanismos pelos quais exerce seus efeitos. O tratamento com DD reduziu marcadores de estresse oxidativo, preveniu o dano endotelial, reduziu a migração de células inflamatórias e diminuiu a produção da quimiocina MCP-1, bem como a razão LDL/HDL em camundongos hipercolesterolêmicos. Esse

conjunto de fatores pode ter culminado para a redução da lesão aterosclerótica. Além disso, em cultura de macrófagos, demonstramos que o DD foi capaz de diminuir a formação de células espumosas, a concentração de EROs e a produção de citocinas inflamatórias que contribuem para seu efeito *in vivo*. Ao inibir a produção de EROs, o composto pode atenuar a ativação dos macrófagos e diminuir a produção de quimiocinas que tem como consequência a redução do recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão. Os estudos *in vitro* contribuíram para avaliar alguns efeitos específicos deste composto sobre células endoteliais estimuladas com oxLDL, demonstrando a sua capacidade de diminuir a geração de EROs, manter a integridade do potencial de membrana mitocondrial e os níveis de GSH, e por fim reduzir a apoptose. Estes efeitos protetores do DD sobre as células endoteliais podem contribuir para a melhora da resposta vasodilatadora dependente do endotélio observada nos ensaios funcionais *ex vivo*. Finalmente, os resultados obtidos neste estudo contribuem para um melhor entendimento das bases moleculares e farmacológicas da aplicabilidade clínica do DD na prevenção e/ou tratamento da aterosclerose.



**Figura 19: Possíveis mecanismos de ação do disseleneto de difenila (DD) sobre a aterosclerose.** O DD pode atuar em diferentes alvos durante o desenvolvimento da aterosclerose. Na luz vascular, o composto é capaz de diminuir as concentrações plasmáticas de colesterol e de LDL, reduzindo a passagem destas lipoproteínas para o espaço subendotelial. Na camada íntima, o DD inibe a oxidação da LDL, reduzindo seus efeitos tóxicos sobre as células endoteliais e macrófagos. Nos macrófagos, o DD reduz a formação de células espumosas, a geração de EROs e inibe a síntese de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , MCP-1). A diminuição da síntese de moléculas quimioatraentes reduz a migração de monócitos para a íntima, limitando o processo inflamatório local. Nas células endoteliais, o DD reduz o estresse oxidativo, induzido pela oxLDL, diminuindo o processo de apoptose e levando a uma melhora no processo de disfunção endotelial. O somatório destes efeitos leva a diminuição do tamanho da lesão aterosclerótica.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que:

- A exposição de camundongos adultos LDLr  $-/-$  a uma dieta rica em colesterol por 30 dias, produziu um quadro de dislipidemia associado ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas e prejuízo da reatividade vascular;
- O tratamento com disseleneto de difenila (0,1 e 1 mg/kg/dia, via oral) reduziu a extensão da área de lesão aterosclerótica em camundongos LDLr  $-/-$  submetidos à dieta hipercolesterolêmica;
- Os efeitos do disseleneto de difenila sobre a aterosclerose experimental em camundongos LDLr  $-/-$  foram associados à redução do estresse oxidativo, atenuação do processo inflamatório e melhora do prejuízo da vasodilatação dependente do endotélio e redução da razão do colesterol não-HDL/HDL;
- Em cultivo primário de células endoteliais, o composto foi capaz de reduzir a apoptose induzida pela LDL oxidada através da prevenção da geração de EROs e da depleção de GSH, e da manutenção da integridade mitocondrial;
- O pré-tratamento com disseleneto de difenila reduziu a formação de células espumosas, a geração de EROs e a produção de citocinas inflamatórias em cultivo de macrófagos estimulados com LDL oxidada.

## REFERÊNCIAS

Acker CI; Luchese C; Prigol M; Nogueira CW. Antidepressant-like effect of diphenyl diselenide on rats exposed to malathion: involvement of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase activity. **Neurosci Lett**, 455(3): 168-72, 2009.

Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. **J Am Coll Cardiol**, 34(3): 631-8, 1999.

Arteel GE; Mostert V; Oubrahim H; Briviba K; Abel J; Sies H. Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. **Biol Chem**, 379(8-9): 1201-5, 1998.

Babaei S; Stewart DJ; Picard P; Monge JC. Effects of VasoCare therapy on the initiation and progression of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 162(1): 45-53, 2002.

Bae YS; Lee JH; Choi SH; Kim S; Almazan F; Witztum JL; Miller YI. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2. **Circ Res**, 104(2): 210-8, 21p following 218, 2009.

Balaban RS; Nemoto S; Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell**, 120(4): 483-95, 2005.

Barbosa NB; Nogueira CW; Guecheva TN; Bellinaso Mde L; Rocha JB. Diphenyl diselenide supplementation delays the development of N-nitroso-N-methylurea-induced mammary tumors. **Arch Toxicol**, 82(9): 655-63, 2008.

Barbosa NB; Rocha JB; Wondracek DC; Perottoni J; Zeni G; Nogueira CW. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. **Chem Biol Interact**, 163(3): 230-8, 2006.

Bialecki RA; Tulenko TN; Colucci WS. Cholesterol enrichment increases basal and agonist-stimulated calcium influx in rat vascular smooth muscle cells. **J Clin Invest**, 88(6): 1894-900, 1991.



Blankenberg S; Rupprecht HJ; Bickel C; Torzewski M; Hafner G; Tiret L; Smieja M; Cambien F; Meyer J; Lackner KJ. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. **N Engl J Med**, 349(17): 1605-13, 2003.

Bonetti PO; Lerman LO; Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 23(2): 168-75, 2003.

Borges LP; Borges VC; Moro AV; Nogueira CW; Rocha JB; Zeni G. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. **Toxicology**, 210(1): 1-8, 2005.

Borges LP; Nogueira CW; Panatieri RB; Rocha JB; Zeni G. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chem Biol Interact**, 160(2): 99-107, 2006.

Brandao R; Acker CI; Leite MR; Barbosa NB; Nogueira CW. Diphenyl diselenide protects against glycerol-induced renal damage in rats. **J Appl Toxicol**, 29(7): 612-8, 2009.

Brigelius-Flohe R; Kluth D; Banning A. Is there a future for antioxidants in atherogenesis? **Mol Nutr Food Res**, 49(11): 1083-9, 2005.

Brito C; Naviliat M; Tiscornia AC; Vuillier F; Gualco G; Dighiero G; Radi R; Cayota AM. Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. **J Immunol**, 162(6): 3356-66, 1999.

Briviba K; Roussyn I; Sharov VS; Sies H. Attenuation of oxidation and nitration reactions of peroxynitrite by selenomethionine, selenocystine and ebselen. **Biochem J**, 319 ( Pt 1)(13-5, 1996.

Broderick R; Bialecki R; Tulenko TN. Cholesterol-induced changes in rabbit arterial smooth muscle sensitivity to adrenergic stimulation. **Am J Physiol**, 257(1 Pt 2): H170-8, 1989.

Brodsky SV; Gealekman O; Chen J; Zhang F; Togashi N; Crabtree M; Gross SS; Nasjletti A; Goligorsky MS. Prevention and reversal of

premature endothelial cell senescence and vasculopathy in obesity-induced diabetes by ebselen. **Circ Res**, 94(3): 377-84, 2004.

Brown MS; Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. **Annu Rev Biochem**, 52(223-61, 1983.

Burger M; Fachinetto R; Calegari L; Paixao MW; Braga AL; Rocha JB. Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. **Brain Res Bull**, 64(4): 339-45, 2004.

Burkitt MJ. A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin. **Arch Biochem Biophys**, 394(1): 117-35, 2001.

Cai H; Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ Res**, 87(10): 840-4, 2000.

Catanozi S; Rocha JC; Passarelli M; Guzzo ML; Alves C; Furukawa LN; Nunes VS; Nakandakare ER; Heimann JC; Quintao EC. Dietary sodium chloride restriction enhances aortic wall lipid storage and raises plasma lipid concentration in LDL receptor knockout mice. **J Lipid Res**, 44(4): 727-32, 2003.

Champe PC; Harvey RA. *Bioquímica Ilustrada*. 446, 1997.

Chen Y; Rollins J; Paigen B; Wang X. Genetic and genomic insights into the molecular basis of atherosclerosis. **Cell Metab**, 6(3): 164-79, 2007.

Chew P; Yuen DY; Koh P; Stefanovic N; Febbraio MA; Kola I; Cooper ME; de Haan JB. Site-specific antiatherogenic effect of the antioxidant ebselen in the diabetic apolipoprotein E-deficient mouse. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 29(6): 823-30, 2009.

Chew P; Yuen DY; Stefanovic N; Pete J; Coughlan MT; Jandeleit-Dahm KA; Thomas MC; Rosenfeldt F; Cooper ME; de Haan JB. Antiatherosclerotic and renoprotective effects of ebselen in the diabetic apolipoprotein E/GPx1-double knockout mouse. **Diabetes**, 59(12): 3198-207, 2010.

Cho S; Hazama M; Urata Y; Goto S; Horiuchi S; Sumikawa K; Kondo T. Protective role of glutathione synthesis in response to oxidized low density lipoprotein in human vascular endothelial cells. **Free Radic Biol Med**, 26(5-6): 589-602, 1999.

Collot-Teixeira S; Martin J; McDermott-Roe C; Poston R; McGregor JL. CD36 and macrophages in atherosclerosis. **Cardiovasc Res**, 75(3): 468-77, 2007.

Cominacini L; Pasini AF; Garbin U; Davoli A; Tosetti ML; Campagnola M; Rigoni A; Pastorino AM; Lo Cascio V; Sawamura T. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. **J Biol Chem**, 275(17): 12633-8, 2000.

Cossarizza A; Baccarani-Contri M; Kalashnikova G; Franceschi C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochem Biophys Res Commun**, 197(1): 40-5, 1993.

Cotgreave IA; Duddy SK; Kass GE; Thompson D; Moldeus P. Studies on the anti-inflammatory activity of ebselen. Ebselen interferes with granulocyte oxidative burst by dual inhibition of NADPH oxidase and protein kinase C? **Biochem Pharmacol**, 38(4): 649-56, 1989.

Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. **Biochem J**, 341 ( Pt 2)(233-49, 1999.

Crow JP. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. **Nitric Oxide**, 1(2): 145-57, 1997.

Cyrus T; Sung S; Zhao L; Funk CD; Tang S; Pratico D. Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Circulation**, 106(10): 1282-7, 2002.

Cyrus T; Yao Y; Rokach J; Tang LX; Pratico D. Vitamin E reduces progression of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice with established vascular lesions. **Circulation**, 107(4): 521-3, 2003.

Cyrus T; Yao Y; Tung LX; Pratico D. Stabilization of advanced atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by aspirin. **Atherosclerosis**, 184(1): 8-14, 2006.

da Rocha JT; Speranca A; Nogueira CW; Zeni G. Hypolipidaemic activity of orally administered diphenyl diselenide in Triton WR-1339-induced hyperlipidaemia in mice. **J Pharm Pharmacol**, 61(12): 1673-9, 2009.

Dal Bó S. Mecanismos envolvidos na vasodilatação induzida pela Fração Rica em Proantocianidinas (FRP) obtida a partir das cascas da *Croton celtidifolius* (euphorbiaceae) – Estudo da atividade antiaterogênica. **Tese de doutorado em Farmacologia**, 2009.

Daugherty A. Mouse models of atherosclerosis. **Am J Med Sci**, 323(1): 3-10, 2002.

de Bem AF; de Lima Portella R; Farina M; Perottoni J; Paixao MW; Nogueira CW; Teixeira Rocha JB. Low toxicity of diphenyl diselenide in rabbits: a long-term study. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 101(1): 47-55, 2007.

de Bem AF; de Lima Portella R; Perottoni J; Becker E; Bohrer D; Paixao MW; Nogueira CW; Zeni G; Rocha JB. Changes in biochemical parameters in rabbits blood after oral exposure to diphenyl diselenide for long periods. **Chem Biol Interact**, 162(1): 1-10, 2006.

de Bem AF; Farina M; Portella Rde L; Nogueira CW; Dinis TC; Laranjinha JA; Almeida LM; Rocha JB. Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation in vitro. **Atherosclerosis**, 201(1): 92-100, 2008.

de Bem AF; Portella Rde L; Colpo E; Duarte MM; Frediane A; Taube PS; Nogueira CW; Farina M; da Silva EL; Teixeira Rocha JB. Diphenyl diselenide decreases serum levels of total cholesterol and tissue

oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 105(1): 17-23, 2009.

Deng T; Xu K; Zhang L; Zheng X. Dynamic determination of Ox-LDL-induced oxidative/nitrosative stress in single macrophage by using fluorescent probes. **Cell Biol Int**, 32(11): 1425-32, 2008.

Dhingra S; Bansal MP. Modulation of hypercholesterolemia-induced alterations in apolipoprotein B and HMG-CoA reductase expression by selenium supplementation. **Chem Biol Interact**, 161(1): 49-56, 2006.

Dupasquier CM; Weber AM; Ander BP; Rampersad PP; Steigerwald S; Wigle JT; Mitchell RW; Kroeger EA; Gilchrist JS; Moghadasian MM; Lukas A; Pierce GN. Effects of dietary flaxseed on vascular contractile function and atherosclerosis during prolonged hypercholesterolemia in rabbits. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 291(6): H2987-96, 2006.

Espinola-Klein C; Rupprecht HJ; Bickel C; Schnabel R; Genth-Zotz S; Torzewski M; Lackner K; Munzel T; Blankenberg S. Glutathione peroxidase-1 activity, atherosclerotic burden, and cardiovascular prognosis. **Am J Cardiol**, 99(6): 808-12, 2007.

Fischer H; Terlinden R; Lohr JP; Romer A. A novel biologically active selenoorganic compound. VIII. Biotransformation of ebselen. **Xenobiotica**, 18(12): 1347-59, 1988.

Fleming I; Mohamed A; Galle J; Turchanowa L; Brandes RP; Fisslthaler B; Busse R. Oxidized low-density lipoprotein increases superoxide production by endothelial nitric oxide synthase by inhibiting PKC $\alpha$ . **Cardiovasc Res**, 65(4): 897-906, 2005.

Forgione MA; Weiss N; Heydrick S; Cap A; Klings ES; Bierl C; Eberhardt RT; Farber HW; Loscalzo J. Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 282(4): H1255-61, 2002.

Galkina E; Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (\*). **Annu Rev Immunol**, 27(165-97), 2009.

Galle J; Hansen-Hagge T; Wanner C; Seibold S. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. **Atherosclerosis**, 185(2): 219-26, 2006.

Garcia JA; dos Santos L; Moura AL; Ricardo KF; Wanschel AC; Shishido SM; Spadari-Bratfisch RC; de Souza HP; Krieger MH. S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) prevents myocardial alterations in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice by antiinflammatory action. **J Cardiovasc Pharmacol**, 51(1): 78-85, 2008.

Gaut JP; Heinecke JW. Mechanisms for oxidizing low-density lipoprotein. Insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis. **Trends Cardiovasc Med**, 11(3-4): 103-12, 2001.

Ghisleni G; Kazlauckas V; Both FL; Pagnussat N; Mioranza S; Rocha JB; Souza DO; Porciuncula LO. Diphenyl diselenide exerts anxiolytic-like effect in Wistar rats: putative roles of GABAA and 5HT receptors. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 32(6): 1508-15, 2008.

Ghisleni G; Porciuncula LO; Cimarosti H; Batista TRJ; Salbego CG; Souza DO. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immuncontent. **Brain Res**, 986(1-2): 196-9, 2003.

Glass CK; Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. **Cell**, 104(4): 503-16, 2001.

Gleason MM; Medow MS; Tulenko TN. Excess membrane cholesterol alters calcium movements, cytosolic calcium levels, and membrane fluidity in arterial smooth muscle cells. **Circ Res**, 69(1): 216-27, 1991.

Gotto AM, Jr.; Grundy SM. Lowering LDL cholesterol: questions from recent meta-analyses and subset analyses of clinical trial DataIssues from the Interdisciplinary Council on Reducing the Risk for Coronary Heart Disease, ninth Council meeting. **Circulation**, 99(8): E1-7, 1999.

Guo Z; Ran Q; Roberts LJ, 2nd; Zhou L; Richardson A; Sharan C; Wu D; Yang H. Suppression of atherogenesis by overexpression of glutathione peroxidase-4 in apolipoprotein E-deficient mice. **Free Radic Biol Med**, 44(3): 343-52, 2008.

Haddad el B; McCluskie K; Birrell MA; Dabrowski D; Pecoraro M; Underwood S; Chen B; De Sanctis GT; Webber SE; Foster ML; Belvisi MG. Differential effects of ebselen on neutrophil recruitment, chemokine, and inflammatory mediator expression in a rat model of lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation. **J Immunol**, 169(2): 974-82, 2002.

Halliwell B; Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 1999.

Hamilton TA; Ma GP; Chisolm GM. Oxidized low density lipoprotein suppresses the expression of tumor necrosis factor-alpha mRNA in stimulated murine peritoneal macrophages. **J Immunol**, 144(6): 2343-50, 1990.

Hansson GK; Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. **Nat Rev Immunol**, 6(7): 508-19, 2006.

Hansson GK; Robertson AK; Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. **Annu Rev Pathol**, 1(297-329, 2006.

Harrison D; Griendling KK; Landmesser U; Hornig B; Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. **Am J Cardiol**, 91(3A): 7A-11A, 2003.

Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. **Clin Cardiol**, 20(11 Suppl 2): II-11-7, 1997.

Heinloth A; Heermeier K; Raff U; Wanner C; Galle J. Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells. **J Am Soc Nephrol**, 11(10): 1819-25, 2000.

Hernandez-Presa MA; Martin-Ventura JL; Ortego M; Gomez-Hernandez A; Tunon J; Hernandez-Vargas P; Blanco-Colio LM; Mas S; Aparicio C; Ortega L; Vivanco F; Gerique JG; Diaz C; Hernandez G; Egido J. Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, 160(1): 49-58, 2002.

Hill MF; Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. **Am J Pathol**, 148(1): 291-300, 1996.

Hissin PJ; Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem**, 74(1): 214-26, 1976.

Ineu RP; Pereira ME; Aschner M; Nogueira CW; Zeni G; Rocha JB. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. **Food Chem Toxicol**, 46(9): 3023-9, 2008.

Insull W, Jr. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. **Am J Med**, 122(1 Suppl): S3-S14, 2009.

Ishibashi S; Brown MS; Goldstein JL; Gerard RD; Hammer RE; Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **J Clin Invest**, 92(2): 883-93, 1993.

Jawien J; Nastalek P; Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. **J Physiol Pharmacol**, 55(3): 503-17, 2004.

Kadar A; Glasz T. Development of atherosclerosis and plaque biology. **Cardiovasc Surg**, 9(2): 109-21, 2001.

Khatri JJ; Johnson C; Magid R; Lessner SM; Laude KM; Dikalov SI; Harrison DG; Sung HJ; Rong Y; Galis ZS. Vascular oxidant stress enhances progression and angiogenesis of experimental atheroma. **Circulation**, 109(4): 520-5, 2004.

Kim SJ; Park C; Han AL; Youn MJ; Lee JH; Kim Y; Kim ES; Kim HJ; Kim JK; Lee HK; Chung SY; So H; Park R. Ebselen attenuates cisplatin-induced ROS generation through Nrf2 activation in auditory cells. **Hear Res**, 251(1-2): 70-82, 2009.

Kondo T; Hirose M; Kageyama K. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. **J Atheroscler Thromb**, 16(5): 532-8, 2009.



Kowala MC; Recce R; Beyer S; Gu C; Valentine M. Characterization of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice: macrophage accumulation correlates with rapid and sustained expression of aortic MCP-1/JE. **Atherosclerosis**, 149(2): 323-30, 2000.

Kowaltowski AJ; Castilho RF; Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett**, 495(1-2): 12-5, 2001.

Krieger MH; Santos KF; Shishido SM; Wanschel AC; Estrela HF; Santos L; De Oliveira MG; Franchini KG; Spadari-Bratfisch RC; Laurindo FR. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. **Nitric Oxide**, 14(1): 12-20, 2006.

Kroemer G; Galluzzi L; Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiol Rev**, 87(1): 99-163, 2007.

Kugiyama K; Sugiyama S; Ogata N; Oka H; Doi H; Ota Y; Yasue H. Burst production of superoxide anion in human endothelial cells by lysophosphatidylcholine. **Atherosclerosis**, 143(1): 201-4, 1999.

Lapenna D; de Gioia S; Ciofani G; Mezzetti A; Ucchino S; Calafiore AM; Napolitano AM; Di Ilio C; Cuccurullo F. Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques. **Circulation**, 97(19): 1930-4, 1998.

Levitan I; Volkov S; Subbaiah PV. Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. **Antioxid Redox Signal**, 13(1): 39-75, 2010.

Li AC; Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. **Nat Med**, 8(11): 1235-42, 2002.

Li JM; Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 287(5): R1014-30, 2004.

Liao L; Aw TY; Kvietys PR; Granger DN. Oxidized LDL-induced microvascular dysfunction. Dependence on oxidation procedure. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 15(12): 2305-11, 1995.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, 420(6917): 868-74, 2002.

Libby P; Geng YJ; Aikawa M; Schoenbeck U; Mach F; Clinton SK; Sukhova GK; Lee RT. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. **Curr Opin Lipidol**, 7(5): 330-5, 1996.

Lloyd-Jones D; Adams RJ; Brown TM; Carnethon M; Dai S; De Simone G; Ferguson TB; Ford E; Furie K; Gillespie C; Go A; Greenlund K; Haase N; Hailpern S; Ho PM; Howard V; Kissela B; Kittner S; Lackland D; Lisabeth L; Marelli A; McDermott MM; Meigs J; Mozaffarian D; Mussolino M; Nichol G; Roger VL; Rosamond W; Sacco R; Sorlie P; Thom T; Wasserthiel-Smoller S; Wong ND; Wylie-Rosett J. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, 121(7): e46-e215, 2010.

Lowry OH; Rosebrough NJ; Farr AL; Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193(1): 265-75, 1951.

Luchese C; Brandao R; de Oliveira R; Nogueira CW; Santos FW. Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. **Toxicol Lett**, 173(3): 181-90, 2007.

Ludmer PL; Selwyn AP; Shook TL; Wayne RR; Mudge GH; Alexander RW; Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. **N Engl J Med**, 315(17): 1046-51, 1986.

Lum H; Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. **Am J Physiol Cell Physiol**, 280(4): C719-41, 2001.

Lusis AJ. Atherosclerosis. **Nature**, 407(6801): 233-41, 2000.

Margis R; Dunand C; Teixeira FK; Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. **FEBS J**, 275(15): 3959-70, 2008.

Masumoto H; Sies H. The reaction of ebselen with peroxyntirite. **Chem Res Toxicol**, 9(1): 262-7, 1996.

Meotti FC; Borges VC; Zeni G; Rocha JB; Nogueira CW. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. **Toxicol Lett**, 143(1): 9-16, 2003.

Meotti FC; Stangerlin EC; Zeni G; Nogueira CW; Rocha JB. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environ Res**, 94(3): 276-82, 2004.

Minatti J. O chá verde no processo aterosclerótico em Camundongos KNOCKOUT para receptor de lipoproteína de baixa densidade. **Dissertação de Mestrado em Nutrição**, 2010.

Mohiuddin I; Chai H; Lin PH; Lumsden AB; Yao Q; Chen C. Nitrotyrosine and chlorotyrosine: clinical significance and biological functions in the vascular system. **J Surg Res**, 133(2): 143-9, 2006.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 65(1-2): 55-63, 1983.

Muller A; Cadenas E; Graf P; Sies H. A novel biologically active seleno-organic compound--I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). **Biochem Pharmacol**, 33(20): 3235-9, 1984.

Mulvihill ER; Jaeger J; Sengupta R; Ruzzo WL; Reimer C; Lukito S; Schwartz SM. Atherosclerotic plaque smooth muscle cells have a distinct phenotype. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 24(7): 1283-9, 2004.

Myhre O; Andersen JM; Aarnes H; Fonnum F. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. **Biochem Pharmacol**, 65(10): 1575-82, 2003.

Napoli C. Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis. **Ann N Y Acad Sci**, 1010(698-709), 2003.

Napoli C; Paterno R; Faraci FM; Taguchi H; Postiglione A; Heistad DD. Mildly oxidized low-density lipoprotein impairs responses of

carotid but not basilar artery in rabbits. **Stroke**, 28(11): 2266-71; discussion 2271-2, 1997.

Nogueira CW; Meotti FC; Curte E; Pilissao C; Zeni G; Rocha JB. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology**, 183(1-3): 29-37, 2003a.

Nogueira CW; Quinhones EB; Jung EA; Zeni G; Rocha JB. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflamm Res**, 52(2): 56-63, 2003b.

Nogueira CW; Rocha JB. Diphenyl Diselenide a Janus-Faced Molecule. **J Braz Chem Soc**, 2010.

Nogueira CW; Zeni G; Rocha JB. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem Rev**, 104(12): 6255-85, 2004.

Ohashi R; Mu H; Yao Q; Chen C. Cellular and molecular mechanisms of atherosclerosis with mouse models. **Trends Cardiovasc Med**, 14(5): 187-90, 2004.

Paigen B; Holmes PA; Novak EK; Swank RT. Analysis of atherosclerosis susceptibility in mice with genetic defects in platelet function. **Arteriosclerosis**, 10(4): 648-52, 1990.

Paigen B; Morrow A; Holmes PA; Mitchell D; Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. **Atherosclerosis**, 68(3): 231-40, 1987.

Parnham M; Sies H. Ebselen: prospective therapy for cerebral ischaemia. **Expert Opin Investig Drugs**, 9(3): 607-19, 2000.

Parnham MJ; Kindt S. A novel biologically active seleno-organic compound--III. Effects of PZ 51 (Ebselen) on glutathione peroxidase and secretory activities of mouse macrophages. **Biochem Pharmacol**, 33(20): 3247-50, 1984.

Parthasarathy S; Santanam N; Ramachandran S; Meilhac O. Oxidants and antioxidants in atherogenesis. An appraisal. **J Lipid Res**, 40(12): 2143-57, 1999.

Pastore A; Federici G; Bertini E; Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clin Chim Acta**, 333(1): 19-39, 2003.

Paulmier C. Selenium reagents and intermediates in organic synthesis. **Pergamon Books**, 1986.

Peluffo G; Calcerrada P; Piacenza L; Pizzano N; Radi R. Superoxide-mediated inactivation of nitric oxide and peroxynitrite formation by tobacco smoke in vascular endothelium: studies in cultured cells and smokers. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 296(6): H1781-92, 2009.

Porciuncula LO; Rocha JB; Cimarosti H; Vinade L; Ghisleni G; Salbego CG; Souza DO. Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immunocontent of inducible nitric oxide synthase. **Neurosci Lett**, 346(1-2): 101-4, 2003.

Posser T; Franco JL; dos Santos DA; Rigon AP; Farina M; Dafre AL; Teixeira Rocha JB; Leal RB. Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. **Brain Res**, 1199(138-47), 2008.

Prigol M. Ação convulsivante do Disseleneto de Difenila em ratos: estudo dos mecanismos neuroquímicos e toxicocinéticos. **Tese de doutorado em Bioquímica Toxicológica**, 2010.

Prigol M; Schumacher RF; WayneNogueira C; Zeni G. Convulsant effect of diphenyl diselenide in rats and mice and its relationship to plasma levels. **Toxicol Lett**, 189(1): 35-9, 2009.

Rader DJ; Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. **Nature**, 451(7181): 904-13, 2008.

Radi R; Beckman JS; Bush KM; Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Arch Biochem Biophys**, 288(2): 481-7, 1991.

Reape TJ; Groot PH. Chemokines and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 147(2): 213-25, 1999.

Rizzo M; Kotur-Stevuljevic J; Berneis K; Spinas G; Rini GB; Jelic-Ivanovic Z; Spasojevic-Kalimanovska V; Vekic J. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look. **Transl Res**, 153(5): 217-23, 2009.

Robbesyn F; Salvayre R; Negre-Salvayre A. Dual role of oxidized LDL on the NF-kappaB signaling pathway. **Free Radic Res**, 38(6): 541-51, 2004.

Rosa RM; Flores DG; Appelt HR; Braga AL; Henriques JA; Roesler R. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. **Neurosci Lett**, 341(3): 217-20, 2003.

Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **N Engl J Med**, 340(2): 115-26, 1999.

Rubin EM; Krauss RM; Spangler EA; Verstuyft JG; Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. **Nature**, 353(6341): 265-7, 1991.

Saini HK; Arneja AS; Dhalla NS. Role of cholesterol in cardiovascular dysfunction. **Can J Cardiol**, 20(3): 333-46, 2004.

Salvayre R; Auge N; Benoist H; Negre-Salvayre A. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. **Biochim Biophys Acta**, 1585(2-3): 213-21, 2002.

Sata M; Walsh K. Oxidized LDL activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. **J Clin Invest**, 102(9): 1682-9, 1998.

Savegnago L; Jesse CR; Pinto LG; Rocha JB; Barancelli DA; Nogueira CW; Zeni G. Diphenyl diselenide exerts antidepressant-like and anxiolytic-like effects in mice: involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway in its antidepressant-like action. **Pharmacol Biochem Behav**, 88(4): 418-26, 2008.

Savegnago L; Jesse CR; Pinto LG; Rocha JB; Nogueira CW. Diphenyl diselenide attenuates acute thermal hyperalgesia and persistent inflammatory and neuropathic pain behavior in mice. **Brain Res**, 1175(54-9), 2007.

Schewe T. Molecular actions of ebselen--an antiinflammatory antioxidant. **Gen Pharmacol**, 26(6): 1153-69, 1995.

Shin KM; Shen L; Park SJ; Jeong JH; Lee KT. Bis-(3-hydroxyphenyl) diselenide inhibits LPS-stimulated iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophage cells through the NF-kappaB inactivation. **J Pharm Pharmacol**, 61(4): 479-86, 2009.

Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radic Biol Med**, 27(9-10): 916-21, 1999.

Sigala F; Kotsinas A; Savari P; Filis K; Markantonis S; Iliodromitis EK; Gorgoulis VG; Andreadou I. Oxidized LDL in human carotid plaques is related to symptomatic carotid disease and lesion instability. **J Vasc Surg**, 2010.

Silva EL; Tsushida T; Terao J. Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. **Arch Biochem Biophys**, 349(2): 313-20, 1998.

Siqueira JM; Gazola AC; Farias MR; Volkov L; Rivard N; de Brum-Fernandes AJ; Ribeiro-do-Valle RM. Evaluation of the antitumoral effect of dihydrocucurbitacin-B in both in vitro and in vivo models. **Cancer Chemother Pharmacol**, 64(3): 529-38, 2009.

Skulachev VP. How proapoptotic proteins can escape from mitochondria? **Free Radic Biol Med**, 29(10): 1056-9, 2000.

Sonoki K; Yoshinari M; Iwase M; Iino K; Ichikawa K; Ohdo S; Higuchi S; Iida M. Glycoxidized low-density lipoprotein enhances monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in human umbilical vein endothelial cells: relation to lysophosphatidylcholine contents and inhibition by nitric oxide donor. **Metabolism**, 51(9): 1135-42, 2002.

Sposito AC; Caramelli B; Fonseca FAH; Bertolami MC. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia**, 2007.

Stangherlin EC; Luchese C; Pinton S; Rocha JB; Nogueira CW. Sub-chronical exposure to diphenyl diselenide enhances acquisition and retention of spatial memory in rats. **Brain Res**, 1201(106-13, 2008.

Stary HC. Changes in the cells of atherosclerotic lesions as advanced lesions evolve in coronary arteries of children and young adults. **Pathobiology of Human Atherosclerosis Plaque**, 93-106, 1990.

Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. **Nat Med**, 8(11): 1211-7, 2002.

Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. **J Biol Chem**, 272(34): 20963-6, 1997.

Stocker R; Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev**, 84(4): 1381-478, 2004.

Straliootto MR; Mancini G; de Oliveira J; Nazari EM; Muller YM; Dafre A; Ortiz S; Silva EL; Farina M; Latini A; Rocha JB; de Bem AF. Acute exposure of rabbits to diphenyl diselenide: a toxicological evaluation. **J Appl Toxicol**, 2010.

Takasago T; Peters EE; Graham DI; Masayasu H; Macrae IM. Neuroprotective efficacy of ebselen, an anti-oxidant with anti-inflammatory actions, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion. **Br J Pharmacol**, 122(6): 1251-6, 1997.

Takei A; Huang Y; Lopes-Virella MF. Expression of adhesion molecules by human endothelial cells exposed to oxidized low density lipoprotein. Influences of degree of oxidation and location of oxidized LDL. **Atherosclerosis**, 154(1): 79-86, 2001.

Tamasi V; Jeffries JM; Arteel GE; Falkner KC. Ebselen augments its peroxidase activity by inducing nrf-2-dependent transcription. **Arch Biochem Biophys**, 431(2): 161-8, 2004.

Terkeltaub R; Banka CL; Solan J; Santoro D; Brand K; Curtiss LK. Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity. **Arterioscler Thromb**, 14(1): 47-53, 1994.



Therond P; Abella A; Laurent D; Couturier M; Chalas J; Legrand A; Lindenbaum A. In vitro study of the cytotoxicity of isolated oxidized lipid low-density lipoproteins fractions in human endothelial cells: relationship with the glutathione status and cell morphology. **Free Radic Biol Med**, 28(4): 585-96, 2000.

Thomson MJ; Puntmann V; Kaski JC. Atherosclerosis and oxidant stress: the end of the road for antioxidant vitamin treatment? **Cardiovasc Drugs Ther**, 21(3): 195-210, 2007.

Torzewski M; Ochsenhirt V; Kleschyov AL; Oelze M; Daiber A; Li H; Rossmann H; Tsimikas S; Reifenberg K; Cheng F; Lehr HA; Blankenberg S; Forstermann U; Munzel T; Lackner KJ. Deficiency of glutathione peroxidase-1 accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 27(4): 850-7, 2007.

Vermes I; Haanen C; Steffens-Nakken H; Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J Immunol Methods**, 184(1): 39-51, 1995.

Vindis C; Elbaz M; Escargueil-Blanc I; Auge N; Heniquez A; Thiers JC; Negre-Salvayre A; Salvayre R. Two distinct calcium-dependent mitochondrial pathways are involved in oxidized LDL-induced apoptosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 25(3): 639-45, 2005.

Wang H; Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radic Biol Med**, 27(5-6): 612-6, 1999.

Wassmann S; Wassmann K; Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hypertension**, 44(4): 381-6, 2004.

WHO. Cardiovascular diseases. **World Health Organization**, 2004.

Williams KJ; Feig JE; Fisher EA. Cellular and molecular mechanisms for rapid regression of atherosclerosis: from bench top to potentially achievable clinical goal. **Curr Opin Lipidol**, 18(4): 443-50, 2007.

Williams KJ; Fisher EA. Oxidation, lipoproteins, and atherosclerosis: which is wrong, the antioxidants or the theory? **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 8(2): 139-46, 2005.

Wilson S; Zucker P; Huang R; Spector A. Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity. **J Am Chem Soc** 111(5936-9, 1989.

Xie X; Chowdhury SR; Sangle G; Shen GX. Impact of diabetes-associated lipoproteins on oxygen consumption and mitochondrial enzymes in porcine aortic endothelial cells. **Acta Biochim Pol**, 2010.

Yamamoto K; Niki E. Interaction of alpha-tocopherol with iron: antioxidant and prooxidant effects of alpha-tocopherol in the oxidation of lipids in aqueous dispersions in the presence of iron. **Biochim Biophys Acta**, 958(1): 19-23, 1988.

Yang H; Roberts LJ; Shi MJ; Zhou LC; Ballard BR; Richardson A; Guo ZM. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. **Circ Res**, 95(11): 1075-81, 2004.

Yang H; Zhou L; Wang Z; Roberts LJ, 2nd; Lin X; Zhao Y; Guo Z. Overexpression of antioxidant enzymes in ApoE-deficient mice suppresses benzo(a)pyrene-accelerated atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 207(1): 51-8, 2009.

Yokoyama M. Oxidant stress and atherosclerosis. **Curr Opin Pharmacol**, 4(2): 110-5, 2004.

Zadelaar S; Kleemann R; Verschuren L; de Vries-Van der Weij J; van der Hoorn J; Princen HM; Kooistra T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 27(8): 1706-21, 2007.

Zhao R; Holmgren A. A novel antioxidant mechanism of ebselen involving ebselen diselenide, a substrate of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. **J Biol Chem**, 277(42): 39456-62, 2002.

Zmijewski JW; Moellering DR; Le Goffe C; Landar A; Ramachandran A; Darley-USmar VM. Oxidized LDL induces mitochondrially

associated reactive oxygen/nitrogen species formation in endothelial cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 289(2): H852-61, 2005.