

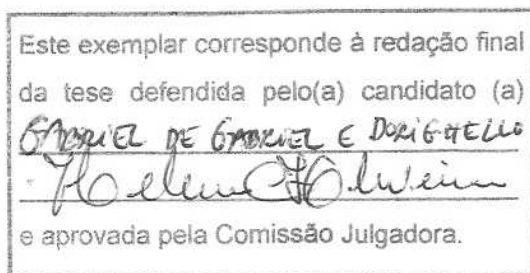
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



GABRIEL DE GABRIEL E DORIGHELLO

**“EFEITO DO TRATAMENTO COM CITRATO E VIMANG® SOBRE A
ATEROSCLEROSE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS
HIPERCOLESTEROLÊMICOS DEFICIENTES DE RECEPTOR DE LDL”**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

D733e	Dorighello, Gabriel de Gabriel e Efeito do tratamento com citrato e Vimang® sobre a aterosclerose experimental em camundongos hipercolesterolêmicos deficientes de receptor de LDL / Gabriel de Gabriel e Dorighello. – Campinas, SP: [s.n.], 2009. Orientadora: Helena Coutinho Franco de Oliveira. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Hipercolesterolemia. 2. Estresse oxidativo. 3. Aterosclerose. 4. Camundongo. 5. Receptores LDL. I. Oliveira, Helena Coutinho Franco de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título. (rcdt/ib)
--------------	---

Título em inglês: Effect of citrate and Vimang® treatment on experimental atherosclerosis in hypercholesterolemic LDL receptor deficient mice.

Palavras-chave em inglês: Hypercholesterolemia; Oxidative stress; Atherosclerosis; Mice; LDL receptors.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Helena Coutinho Franco de Oliveira, Marisa Passarelli, Eliana Cotta de Faria.

Data da defesa: 11/03/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

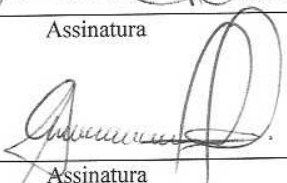
Campinas, 11 de Março de 2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira
(Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Marisa Passarelli


Assinatura

Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria


Assinatura

Profa. Dra. Lúcia Nassi Castilho

Assinatura

Profa. Dra. Luciane Carla Alberici

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer meus pais e irmãos pelo apoio desde início da minha vida acadêmica. Sem a ajuda de vocês tudo seria mais difícil.

À Carolina pelo amor e companheirismo, por escutar minhas reclamações sobre problemas no laboratório, por sempre tentar me animar em momentos difíceis, e por fazer parte diariamente da minha vida. Obrigado meu amor.

A minha orientadora professora Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira por todos os ensinamentos científicos e pelo exemplo profissional a ser seguido. Aos professores Drs. Antonio Carlos Boschero e Everardo Magalhães Carneiro pelos aprendizados adquiridos com a convivência semanal. Às professoras Dras. Lúcia Nassi Castilho e Eliana Cotta de Faria pela ajuda com as dosagens bioquímicas de função renal e hepática e pelos conhecimentos adquiridos semanalmente.

Aos meus amigos do laboratório 15: Alessandro, Helena R., Patrícia, Mariana, Bárbara, Larissa e Maria Lúcia pelo companheirismo diário e pelo espírito de equipe sempre presente. Aos meus colegas do Departamento de Fisiologia e Biofísica e principalmente do laboratório 14 pela convivência sempre muito amigável.

Ao professor Dr Gilberto L. Pardo-Andreu, pelo fornecimento do extrato de Vimang® e pela ajuda inicial na elaboração do projeto. Ao professor Dr Aníbal Vercesi e seus alunos: Bruno, Natália, Ana Catarina pela realização das análises bioenergéticas mitocondriais.

Ao funcionário Léscio pela sua dedicação e competência com os cuidados dos animais, e a todos os outros funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica pela atenção e auxílio dispensados sempre que necessário.

À FAPESP, CNPq e Capes.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIATURAS	12
INTRODUÇÃO	13
Lipoproteínas plasmáticas	13
Hipótese oxidativa da aterosclerose	15
Mitocôndrias, estresse oxidativo e morte celular	16
Antioxidantes e Aterogênese	18
Modelo experimental de aterosclerose: camundongos hipercolesterolêmicos geneticamente deficientes de receptor de LDL	20
JUSTIFICATIVA	22
OBJETIVO	24
MATERIAIS E MÉTODOS	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
I- Estudo da reposição de substrato do ciclo de Krebs	33
II- Estudo dos efeitos do antioxidante Vimang®	36
III- Correlações estatísticas com a área de lesão aterosclerótica	41
CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXOS	79
Autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal	80
Autorização da Comissão Interna de Biossegurança	81

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Características físicas e lipemia de camundongos LDLR0 controles e tratados por 2 semanas com citrato e alimentados com dieta rica em colesterol.	55
Tabela 2: Parâmetros corporais dos camundongos LDLR0 controles, tratados com citrato, pravastatina e citrato+pravastatina durante 3 meses.....	56
Tabela 3: Concentrações plasmáticas de glicose, lipídeos, TBARS, anticorpos anti-LDL oxidada e marcadores de função renal e hepática de camundongos LDLR0 controles, tratados com citrato, pravastatina e citrato+pravastatina durante 3 meses.....	57
Tabela 4: Velocidade de geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de oxidação de nucleotídeos de piridina em mitocôndrias isoladas de fígado e produção de EROS em células linfomonocitárias de baço dos camundongos LDLR0 controles, tratados com citrato, pravastatina e citrato+pravastatina durante 3 meses.....	58
Tabela 5: Parâmetros corporais dos camundongos LDLR0 controles, tratados durante 2 semanas com Vimang® ou antioxidantes (vitamina E, β -caroteno e vitamina C) e alimentados com dieta rica em colesterol na segunda semana.....	59
Tabela 6: Concentrações plasmáticas de glicose, lipídeos, TBARS, anticorpos anti-LDL oxidada e marcadores de função renal e hepática dos camundongos LDLR0 controles, tratados durante 2 semanas com Vimang® ou antioxidantes (vitamina E, β -caroteno e vitamina C) e alimentados com dieta rica em colesterol na segunda semana.....	60
Tabela 7: Velocidade de geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de oxidação de nucleotídeos de piridina em mitocôndrias isoladas de fígado e produção de EROS em células linfomonocitárias de baço dos camundongos LDLR0 controles, tratados durante 2 semanas com Vimang® ou antioxidantes (vitamina E, β -caroteno e vitamina C), e alimentados com dieta rica em colesterol na segunda semana.	61
Tabela 8: Parâmetros corporais dos camundongos LDLR0 controles, tratados durante 3 meses com Vimang® ou antioxidantes (vitamina E, β -caroteno e vitamina C).	62
Tabela 9: Concentrações plasmáticas de glicose, lipídeos, TBARS, anticorpos anti-LDL oxidada e marcadores de função renal e hepática dos camundongos LDLR0 controles, tratados durante 3 meses com Vimang® ou antioxidantes (vitamina E, β -caroteno e vitamina C).....	63
Tabela 10: Velocidade de geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de oxidação de nucleotídeos de piridina em mitocôndrias isoladas de fígado e produção de EROS em células linfomonocitárias de baço dos camundongos LDLR0 controles, tratados durante 3 meses com Vimang® ou antioxidantes (vitamina E, β -caroteno e vitamina C).	64
Tabela 11: Correlações não-paramétricas (Spearman, r) entre área de lesão aterosclerótica da raiz da aorta e parâmetros plasmáticos e mitocondriais dos camundongos LDLR0 tratados com citrato e/ou pravastatina e com Vimang® ou antioxidante.....	65
Tabela 12: Coeficiente de determinação (r^2 , regressão linear multivariada) das variáveis independentes (concentração plasmática de colesterol, triglicérides, TBARS, ALT, ALP, a produção de EROS e oxidação de NADPH mitocondrial no fígado) sobre a área de lesão aterosclerótica da raiz da aorta (variável dependente) em camundongos LDLR0 tratados com citrato, pravastatina, Vimang® ou antioxidantes.....	66

Tabela 13: Correlação parcial (ajustada por colesterol e triglicérides plasmáticos) entre área de lesão aterosclerótica da raiz da aorta e a concentração plasmática de TBARS, ALT, ALP, a produção de EROS e oxidação de NADPH mitocondrial no fígado dos camundongos LDLR0 tratados com citrato, pravastatina, Vimang® ou antioxidantes.....	67
Figura 1: Área de lesão aterosclerótica na raiz da aorta de camundongos LDLR0 controles e tratados por 2 semanas com citrato.....	68
Figura 2: Área de lesão aterosclerótica na raiz da aorta de camundongos LDLR0 controles e tratados por 2 semanas com citrato.....	69
Figura 3: Fotografia com aumento de 5 vezes e 10 vezes da raiz da aorta de camundongos LDLR0 controle, tratado com citrato, pravastatina e citrato+pravastatina durante 3 meses.....	70
Figura 4: Área de lesão aterosclerótica na raiz da aorta de camundongos LDLR0 controles, tratados durante 2 semanas com Vimang® e antioxidantes (vitamina E, β -caroteno e vitamina C), e alimentados com dieta rica em colesterol na segunda semana.	71
Figura 5: Fotografia com aumento de 5 vezes e 10 vezes da raiz da aorta de camundongos LDLR0 controle, tratado durante 2 semanas com vimang® e antioxidantes (vitamina E, β -caroteno e vitamina C), e alimentados com dieta rica em colesterol na segunda semana.....	72
Figura 6: Área de lesão aterosclerótica na raiz da aorta de camundongos LDLR0 controles, tratados durante 3 meses com Vimang® e antioxidantes (vitamina E, β -caroteno e vitamina C).....	73
Figura 7: Fotografia com aumento de 5 vezes e 10 vezes da raiz da aorta de camundongos LDLR0 controle, tratado durante 3 meses com Vimang® e antioxidantes (vitamina E, β -caroteno e vitamina C).....	74
Figura 8: Correlação entre área de lesão da raiz da aorta e a concentração de colesterol e triglicérides plasmático em camundongos LDLR0 provenientes de dois estudos: Efeito da reposição de substratos e inibição da esteroidogênese e efeito antioxidante do Vimang®, sobre o desenvolvimento espontâneo da aterosclerose.....	75
Figura 9: Correlação entre área de lesão da raiz da aorta e a concentração de TBARS plasmáticos em camundongos LDLR0 provenientes de dois estudos: Efeito da reposição de substratos e inibição da esteroidogênese e efeito antioxidante do Vimang®, sobre o desenvolvimento espontâneo da aterosclerose.....	76
Figura 10: Correlação entre área de lesão da raiz da aorta e a concentração plasmática de alanina aminotransferase e com fosfatase alcalina no plasma dos camundongos LDLR0 provenientes de dois estudos: Efeito da reposição de substratos e inibição da esteroidogênese e efeito antioxidante do Vimang® sobre o desenvolvimento espontâneo da aterosclerose.....	77
Figura 11: Correlação entre área de lesão da raiz da aorta e a produção de EROS e oxidação de NADPH em mitocôndrias de fígados dos camundongos LDLR0 provenientes de dois estudos: Efeito da reposição de substratos e inibição da esteroidogênese e efeito antioxidante do Vimang®, sobre o desenvolvimento espontâneo da aterosclerose.....	78

RESUMO

A aterosclerose é uma das principais doenças causadoras de morbidade e mortalidade nas populações ocidentais. Uma das teorias mais consistentes para explicar os mecanismos celulares e moleculares da aterogênese é a chamada “hipótese oxidativa”, que aponta a oxidação da LDL como evento central na gênese e no desenvolvimento das lesões. Recentemente demonstramos que camundongos geneticamente deficientes do receptor de LDL (LDLR0), modelo da hipercolesterolemia familiar humana, apresentam disfunção mitocondrial em vários tecidos, o que pode ser altamente relevante para o processo aterosclerótico. As mitocôndrias destes animais apresentam aumento de geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) devido à diminuição de seu conteúdo de NADPH, principal poder redutor para reconstituição de seu sistema enzimático antioxidante. Propusemos que o consumo deste poder redutor do NADPH era consequência de uma esteroidogênese aumentada nos tecidos dos camundongos LDLR0. A deficiência mitocondrial de substratos dependentes de NADPH foi confirmada e tratamentos *in vitro* com isocitrato e *in vivo* com citrato corrigiram parcialmente o estresse oxidativo mitocondrial destes animais. Neste projeto investigamos, se o aumento de produção de EROS mitocondrial e a severidade da aterosclerose em camundongos LDLR0 poderiam ser corrigidos ou reduzidos por: 1- reposição de substratos dependentes de NADPH (citrato), e 2- tratamento com o antioxidante Vimang®, o qual tem efeito protetor em mitocôndrias desafiadas com pró-oxidantes. Em ambos os estudos utilizamos 2 protocolos de investigação das lesões ateroscleróticas: lesão induzida por dieta rica em colesterol e lesão espontânea (dieta comercial livre de colesterol). Os animais tratados com alta concentração de citrato (120 mM) e dieta com colesterol apresentaram aumento na área das lesões

ateroscleróticas da raiz da aorta. Com relação às lesões espontâneas, tratamentos por longo prazo com citrato diluído (2.44 mM) ou pravastatina (10 mg/Kg), isoladamente, não tiveram efeito, enquanto a combinação de citrato+pravastatina aumentou o tamanho médio das lesões ateroscleróticas (4 vezes em relação ao grupo não tratado, $p<0.05$). A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) não diferiu em mitocôndrias de fígado dos 4 grupos, e foi mais elevada nos linfócitos de baço do grupo tratado com pravastatina. Os camundongos tratados por 2 semanas com o antioxidante Vimang® e alimentados com dieta enriquecida com colesterol, apresentaram diminuição nas concentrações plasmáticas e hepáticas de colesterol, no entanto a área de lesão aterosclerótica não diminuiu significativamente. Nos estudos com Vimang® em longo prazo e dieta isenta de colesterol foram verificados efeitos benéficos de redução de colesterolemia e da produção de EROS pelos linfócitos. No entanto, houve aumento do tamanho das lesões ateroscleróticas espontâneas. Análises de correlação univariadas com o estudo citrato, Vimang® e o conjunto de dados de ambos estudos mostraram que o tamanho médio das lesões aórticas se correlaciona positivamente com as concentrações plasmáticas de colesterol, de triglicérides, da enzima hepática fosfatase alcalina, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e com velocidade de oxidação de NADPH e de produção de EROS pelas mitocôndrias hepáticas, mas não com a produção de EROS pelos linfócitos do baço. Análises multivariadas demonstraram a importância dos lipídeos plasmáticos e da produção de EROS mitocondrial hepático na severidade da aterosclerose em relação aos outros parâmetros. Análise de correlação ajustada pelos valores de colesterol e triglicérides evidenciou a contribuição significativa e independente dos parâmetros indicadores de estresse oxidativo mitocondrial hepático na formação da lesão de aterosclerose. A partir destes resultados, propusemos como hipótese que o estresse oxidativo hepático tem um

papel central no mecanismo de formação da lesão vascular neste modelo. Tal conexão se daria através da secreção hepática de fatores pró-aterogênicos, os quais poderiam ser de natureza inflamatória ou metabólica.

ABSTRACT

Atherosclerosis is a major cause of morbidity and mortality in the Western World. One of the main theories to explain atherogenesis is named “oxidative hypothesis”. Accordingly, LDL oxidation is a central event in the genesis and development of atherosclerotic lesions. Recently, we demonstrated that LDL receptor deficient mice (LDLR0) present mitochondrial dysfunction in several tissues, which may be relevant to atherogenesis. The mitochondria of these animals present increased reactive oxygen species (ROS) generation due to decreased NADPH content, the main reducing power for the antioxidant enzymatic system. We proposed that consumption of NADPH (in the reduced state) content was a consequence of elevated steroidogenesis in the LDLR0 mice tissues. The mitochondrial deficiency of NADPH dependent substrates was directly confirmed, and isocitrate (*in vitro*) and citrate (*in vivo*) treatments partially corrected the mitochondrial oxidative stress in this model. In this project we studied whether the increase of mitochondrial ROS production and the atherosclerosis severity in the LDLR0 mice could be corrected or diminished by: 1- NADPH dependent substrates replacement (citrate), and 2- treatment with the antioxidant Vimang®, which has protective effect against pro-oxidants in mitochondria. In both studies we used 2 protocols to study atherosclerotic lesions: high cholesterol diet-induced lesion and spontaneous developed lesions (diet without cholesterol). Animals treated with high concentration of citrate (120 mM) and high cholesterol diet presented increased aorta atherosclerotic lesion areas. Regarding the spontaneous lesions study, chronic treatments

with diluted citrate (2.44 mM) or pravastatin (10 mg/Kg) isolated did not affect, while the citrate+pravastatin combination increased the mean atherosclerotic lesion size (4 fold, $p<0,05$). The liver mitochondrial ROS production was similar among the 4 groups, and was elevated in the spleen lymphocytes of pravastatin treated group. Mice treated during 2 weeks with Vimang® and fed with high cholesterol diet presented decreased plasma and liver cholesterol levels; however the atherosclerotic lesion area was not reduced. In the Vimang® chronic studies with no dietary cholesterol, beneficial effects were verified, i.e., reduction in the plasma cholesterol and lymphocytes ROS production rate. However, the spontaneous atherosclerotic lesions were significantly enhanced. Univariate correlation analysis showed that the aorta lesion size was positive and significantly correlated with plasma cholesterol, triglycerides, alkaline phosphatase, TBARS and hepatic mitochondrial NADPH oxidation and ROS production, but not with lymphocyte ROS production. By multivariate analysis only plasma lipids and hepatic mitochondrial ROS production were significantly related with atherosclerotic lesion area. Partial (adjusted for cholesterol and triglycerides) correlation analysis evidenced that hepatic mitochondrial oxidative stress was independently correlated with atherosclerosis development. Thus, we hypothesize that the hepatic oxidative stress has a central role in the mechanism of vascular lesion formation in this animal model. The connection could occur through hepatic secretion of pro-atherogenic inflammatory or metabolic factors.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
bHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i>
DCF	Diclorofluoresceína
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
EROS	Espécies reativas de oxigênio
H2-DCFDA	Diacetato de diclorodihidrofluoresceína
HDL	Lipoproteína de densidade alta
HMG-CoA reductase	<i>3-hydroxyl-3-methyl-glutaryl-CoA reductase</i>
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
INSIG	<i>Insulin-induced gene</i>
LDL	Lipoproteína de densidade baixa
LDLR0	Camundongos deficientes do receptor de LDL
LP	Lipoproteínas plasmáticas
LPL	Lipoproteína-lipase
LRP	<i>LDL receptor related protein</i>
MPT	Transição de permeabilidade mitocondrial
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor type 1</i>
PBS	Tampão fosfato salina
PL	Fosfolípidos
QM	Quilomícrons
SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
SCAP	<i>SREBP cleavage-activating protein</i>
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TMP	1,1,3,3- tetrametoxipropano
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

INTRODUÇÃO

Lipoproteínas plasmáticas

O colesterol (COL) e os ésteres de colesterol, assim como os triglicérides (TG) e os fosfolípidos (PL), provenientes da dieta ou sintetizados pelos tecidos são transportados na circulação sanguínea complexados com proteínas formando as lipoproteínas e são distribuídos para os diferentes tecidos por processos mediados por receptores ou transportadores.

Há cinco classes principais de lipoproteínas plasmáticas (LP) transportadoras de lipídeos, classificadas de acordo com a sua densidade: as LP de densidade alta, baixa, intermediária e muito baixa, respectivamente, HDL, LDL, IDL, VLDL, e os quilomícrons (QM). As várias LP diferem entre si em termos de densidade, tamanho e migração eletroforética, já que têm composição lipídica e protéica distintas. QM e VLDL são as chamadas LP ricas em triglicérides, de origem intestinal (lipídeos da dieta) e hepática, respectivamente. Essas LP são metabolizadas no compartimento vascular pela lipoproteína-lipase (LPL) que hidrolisa seus TG gerando partículas remanescentes de quilomícrons e de VLDL enriquecidas em colesterol. As IDL são os produtos intermediários e as LDL os produtos finais do catabolismo intravascular das VLDL. A LDL é a LP que transporta a maior parte do colesterol (cerca de 70%) do plasma dos seres humanos. As IDL e LDL são removidas da circulação sanguínea via receptores de LDL, amplamente expressos em tecidos em proliferação, tecidos esteroideogênicos (gônadas e adrenal) e principalmente fígado (Brown e Goldstein, 1986). Os remanescentes de QM e as IDL são também rapidamente captados por outros receptores hepáticos chamados LRP (*LDL receptor related protein*) (Herz et al., 1988). Uma vez dentro da célula, o colesterol derivado das LP exerce várias ações

regulatórias, incluindo a supressão da expressão da enzima que catalisa a etapa limitante da biossíntese do colesterol, a HMG-CoA reductase, e a supressão da transcrição do gene do receptor da LDL. Desta forma, as células tornam-se protegidas de um aumento excessivo da concentração de colesterol. Por outro lado, na deprivação de colesterol, as células aumentam a expressão da HMG-CoA reductase estimulando a síntese *de novo* de colesterol e aumentam também a expressão dos receptores de LDL, promovendo captação do colesterol exógeno. Os mecanismos moleculares envolvidos nesta fina regulação da concentração intracelular de colesterol foram elucidados graças aos trabalhos pioneiros dos agraciados com o Prêmio Nobel de 1985, Michael Brown e Joseph Goldstein (Brown e Goldstein, 1997). Quando as concentrações intracelulares de colesterol estão altas, uma proteína de membrana do retículo endoplasmático denominada SREBP (*sterol regulatory element-binding protein*) encontra-se inativa e ligada a outra proteína chamada SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*), a qual atua como um sensor da quantidade de colesterol nas membranas. Quando a concentração de colesterol nas membranas diminui ocorre uma mudança conformacional na proteína SCAP que permite que o complexo SCAP-SREBP se desligue da proteína INSIG (*insulin-induced gene*) e se associe a vesículas contendo COPII, as quais migram para o complexo de Golgi. No complexo de Golgi, a SREBP é clivada sequencialmente por duas diferentes proteases. A primeira clivagem é catalizada por uma serina-protease (S1P) ligada à membrana que cliva a SREBP no lado luminal. Em seguida, uma metaloprotease também ligada à membrana (S2P) cliva o primeiro domínio transmembrana da SREBP próximo a interface com o citoplasma, liberando a porção amino-terminal da SREBP que pertence a família de fatores de transcrição bHLH (*basic helix-loop-helix*). Esse domínio constitui a SREBP ativa que

transloca-se para o núcleo e estimula a transcrição dos genes do receptor da LDL, da HMCCoA redutase e outros genes responsivos ao colesterol (Gimpl et al, 2002).

A concentração de LDL no plasma varia em função do número de receptores de LDL nos tecidos, principalmente no fígado. Estes podem estar diminuídos por defeito genético ou por excesso de colesterol na dieta, que aumenta o aporte de lipoproteínas de origem intestinal (QM e remanescente) para o fígado.

Anormalidades no metabolismo das lipoproteínas plasmáticas, principalmente elevação da concentração das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e redução das lipoproteínas de alta densidade (HDL), são fatores de risco primários para aterosclerose (Assmann, 2001; Gordon e Rifkind, 1989). A aterosclerose, principal responsável pela patogênese do infarto do miocárdico e cerebral, e outras doenças vasculares periféricas, permanece como principal causa de morbidade e mortalidade nas populações ocidentais (Libby, 2005).

Hipótese oxidativa da aterogênese

A hipótese oxidativa é uma das teorias mais aceita atualmente para explicar o processo da aterogênese (para revisão ver Chisolm e Steinberg, 2000). Concentrações elevadas de LDL plasmática resultam em aumento de infiltração de LDL no espaço subendotelial e maior retenção desta lipoproteína neste microambiente (Madamanchi et al., 2005). Neste compartimento, as LDL são susceptíveis a diversas alterações químicas tais como, clivagem enzimática e principalmente oxidação, tanto de seus componentes lipídicos como protéicos, através da ação de espécies reativas de oxigênio (EROS) geradas pelas células da parede arterial (Ting et al., 1997). As LDL podem apresentar diversos graus de oxidação e se diferenciam estruturalmente e funcionalmente das LDL nativas (Frei, 1999; Steinberg e Witztum, 2002). Uma vez modificada quimicamente, a LDL estimula as células

endoteliais a expressarem moléculas de adesão facilitando a adesão e transmigração de células linfomonocitárias circulantes para o espaço subendotelial (Nedeljkovic et al., 2003). Os monócitos proliferam-se e diferenciam-se em macrófagos que captam as LDL modificadas via receptores *scavenger*. Diferentemente dos receptores de LDL, os receptores *scavenger* não são regulados pelo conteúdo intracelular de colesterol e os macrófagos captam as LDL modificadas de maneira contínua transformando-se em células espumosas. As principais propriedades aterogênicas das LDL oxidadas podem ser assim resumidas: 1- estímulo ao recrutamento de monócitos circulantes para camada íntima da artéria, 2- inibição da habilidade dos macrófagos residentes de deixarem o espaço subendotelial, 3- aumento da taxa de captação de lipoproteína modificada pelos macrófagos que levam a formação de *foam cell*, 4- citotoxicidade e indução de disfunção endotelial (Stocker e Keaney, 2004).

Com a evolução do processo, as células espumosas morrem, tanto por necrose como por apoptose, e vão constituir o núcleo necrótico da lesão aterosclerótica avançada. Células musculares lisas também migram da camada adventícia para íntima, proliferam-se e eventualmente transformam-se em células espumosas. O processo ocorre em progressão geométrica com a participação de um grande número de fatores de crescimento, citocinas e moléculas vasoregulatorias (Libby, 2000; Lusis, 2000; Ross, 1993).

Mitocôndrias, estresse oxidativo e morte celular

As mitocôndrias são responsáveis pelo metabolismo energético oxidativo celular. Durante a transferência de elétrons provenientes dos substratos do ciclo de Krebs, através da cadeia respiratória mitocondrial até o aceptor final oxigênio, ocorre liberação de energia, primeiramente conservada na forma de um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna e, posteriormente, na forma de ATP, gerado pela ATP

sintetase que utiliza o gradiente eletroquímico de prótons para fosforilação de ADP (Mitchell, 1966). Medidas *in vitro* mostram que, em condições fisiológicas e dependendo do tipo de tecido, até 2% do O₂ consumido pela mitoncôndria pode ser convertido no radical ânion superóxido (Boveris, 1977) durante o transporte eletrônico pela cadeia respiratória. Isso ocorre pela redução monoeletrônica do O₂ pelas óxido-redutases principalmente do complexo respiratório I e III (Kowaltowski e Vercesi, 1999). O radical livre superóxido apresenta reatividade química moderada em solução aquosa, e pode sofrer diversas reações na mitocôndria, gerando outros produtos reativos, como o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil, aqui chamados coletivamente de espécies reativas de oxigênio (EROS). Como a produção do superóxido é um processo fisiológico e contínuo, a mitocôndria possui também um eficiente sistema antioxidante formado por enzimas, nucleotídeos de piridina e vitaminas. Em situações em que a geração de superóxido supera a capacidade antioxidante da mitocôndria levando ao acúmulo de EROS, danos oxidativos ocorrem em DNA, lipídeos e proteínas das próprias mitocôndrias (Kowaltowski et al., 2001). O aumento da geração de EROS na mitocôndria induz uma permeabilização não específica da membrana mitocondrial interna, um fenômeno conhecido como transição de permeabilidade mitocondrial (MPT), que resulta em inchamento da organela, perda de componentes da matriz e comprometimento da função mitocondrial. A liberação de fatores pró-apoptóticos e a eventual ruptura da membrana externa das mitocôndrias podem levar a morte celular, seja por apoptose ou necrose (Green e Kroemer, 2004; Kowaltowski et al., 2001; Skulachev, 2000).

Na última década acumularam-se evidências do envolvimento de disfunções mitocondriais em várias doenças metabólicas e degenerativas (Lemasters e Nieminen, 2001). Dislipidemias primárias repercutem na função mitocondrial (Vercesi et al., 2007;

Vercesi et al., 2006). Camundongos geneticamente hipercolesterolêmicos apresentaram uma elevada produção de EROS mitocondrial devido à diminuição na capacidade do sistema antioxidante glutatona e tioredoxina redutase/peroxidase causada por depleção mitocondrial de NADPH (Oliveira et al., 2005; Paim et al., 2008). Por outro lado, em camundongos geneticamente hipertrigliceridêmicos, com aumento severo na concentração de triglicérides e ácidos graxos circulantes ocorre ativação do canal de potássio (K^+) mitocondrial, resultando em um brando desacoplamento mitocondrial. Este processo resulta em aumento da taxa metabólica hepática e corporal (Alberici et al., 2006).

Antioxidantes e aterogênese

Muitos antioxidantes têm sido estudados com finalidade terapêutica contra aterosclerose. Diversos estudos em humanos (Hertog et al., 1993; Kritchevsky et al., 1995; Stephens et al., 1996; Street et al., 1994), e em modelos animais (Koga et al., 2004; Kurosawa et al., 2005; Nakata e Maeda, 2002) relacionaram o uso de antioxidantes com diminuição de doenças cardiovasculares. Por outro lado, inúmeros estudos em humanos e em modelos animais foram surpreendentemente negativos. Tratamentos com probucol em camundongos deficientes do receptor de LDL ou de apolipoproteína E alimentados com dieta aterogênica (Bird et al., 1998; Zhang et al., 1997) causaram aumento do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. Coelhos alimentados com dieta rica em colesterol e tratados com resveratrol (polifenol extraído de uva) apresentaram lesões ateroscleróticas maiores que os não-tratados (Wilson et al., 1996). A suplementação com vitamina E isoladamente promoveu um aumento de três vezes na produção de radicais superóxido por macrófagos peritoneais de camundongos (Sanchez et al., 2000). Estudos em humanos também demonstraram a ineficiência da suplementação com vitamina E, isolada ou combinada com outros antioxidantes, contra as doenças cardiovasculares (Stocker e

Keaney, 2004). Inclusive, alguns estudos associaram a suplementação de vitamina E com o aumento de mortalidade (Bjelakovic et al., 2007; Miller et al., 2005). O tratamento com vitamina E promoveria a eliminação dos radicais livres do organismo podendo interferir em mecanismos de defesa essenciais como a apoptose, fagocitose e desintoxicação. A vitamina E, em altas doses, pode deslocar outros antioxidantes lipossolúveis presentes no organismo, modificando o balanço dos sistemas antioxidantes endógenos e, na ausência de mecanismos eficientes para sua remoção, aumenta a vulnerabilidade ao dano oxidativo (Bjelakovic et al., 2007; Miller et al., 2005).

Intervenções farmacológicas com antioxidantes não-seletivos são freqüentemente ineficientes. A distinção entre oxidantes de um elétron (1e) e dois elétrons (2e) desemparelhados é de particular importância, já que a maioria dos estudos utiliza antioxidantes com ação efetiva contra oxidantes-1e (Stocker e Keaney, 2004). Recentemente demonstramos que as mitocôndrias dos camundongos deficientes do receptor de LDL apresentam acúmulo de H_2O_2 , mas não do radical superóxido (Paim et al., 2008). Esses achados ressaltam a importância dos oxidantes-2e na suscetibilidade à aterosclerose. Reações envolvendo H_2O_2 não são inibidas por antioxidantes clássicos como a vitamina E (Stocker e Keaney, 2004). Como consequência, o excesso da produção de H_2O_2 não seria alterado pela maioria dos antioxidantes vitamínicos estudados. *In vitro*, Vimang® teve ação contra oxidantes-1e (radicais hidroxil) e oxidantes-2e (ácido hipocloroso). Além disso, apresentou ação quelante de ferro *in vitro* (Nunez-Selles et al., 2007) e *in vivo* (Pardo-Andreu et al., 2008a). Portanto, os resultados da ação de compostos antioxidante variam muito em função dos tipos, doses e da composição dos microambientes biológicos onde estes se localizam. Assim, é importante testar novos compostos com potencial antioxidante e estudar sua ação específica sobre a mitocôndria.

O extrato aquoso da casca da *Maginfera indica* L. (mangueira), da família das *Anacardiaceaes*, denominado Vimang®, composto por uma mistura que inclui polifenóis, terpenóides, esteróides, ácidos graxos e microelementos (Nunez Selles et al., 2002) apresenta efeitos antioxidantes (Martinez et al., 2000; Sanchez et al., 2000), analgésicos e antiinflamatórios (Garrido et al., 2001; Garrido et al., 2004). Ingestão diária de Vimang® (900 mg) diminuiu marcadores de estresse oxidativo no soro de seres humanos idosos (Pardo-Andreu et al., 2006b). Rodeiro et al (2006) demonstraram que tratamento de camundongos com doses de até 150 mg/Kg de Vimang®, por dois dias, não causou mutagênese e genotoxicidade, e tratamentos *in vitro* com 1,5 mg/mL de Vimang®, durante 48 horas em cultura primária de linfócitos humanos não foram citóxicos.

Modelo experimental de aterosclerose: camundongos hipercolesterolêmicos por deficiência genética (*knockout* do gene) do receptor de LDL

Uma das principais vias de entrada do colesterol nas células é o receptor de LDL. Defeitos genéticos neste receptor levam à hipercolesterolemia e aterosclerose precoce em seres humanos (Brown e Goldstein, 1986). A hipercolesterolemia familiar é uma doença genética com alta frequência na forma heterozigótica (1:500) na população ocidental (Pauciullo e Mancini, 1998), e caracterizada pela deficiência genética total ou parcial dos receptores de LDL. Ishibashi et al (1993) empregaram a técnica da recombinação homóloga em células embrionárias para produzir camundongos com o gene do receptor de LDL inativado e assim reproduziram o fenótipo da hipercolesterolemia familiar. Camundongos machos e fêmeas que não expressam receptor de LDL (camundongos LDLR0) são viáveis e férteis. Sob dieta pobre em gordura e colesterol, a concentração de colesterol plasmático destes animais é 2 a 4 vezes maior que dos camundongos selvagens, devido a um aumento de sete a nove vezes nas concentrações IDL e LDL, sem significativa alteração das HDL. O

turnover de IDL e LDL nos camundongos LDLR0 está aumentado em 30 vezes e 2 vezes, respectivamente, mas de HDL é normal. Quando submetidos à dieta rica em gordura, esses animais desenvolvem aterosclerose e xantomatose severas (Ishibashi et al., 1994).

JUSTIFICATIVA

Em resultados recentemente publicados por nosso grupo, demonstramos que há uma importante contribuição das mitocôndrias no estabelecimento de um estresse oxidativo em tecidos de camundongos geneticamente hipercolesterolêmicos (LDLR0) (Oliveira et al., 2005), o que pode ser altamente relevante para a aterogênese destes animais. O aumento de geração de EROS mitocondrial observado foi devido à redução da capacidade antioxidante das mitocôndrias, as quais apresentaram uma diminuição de seu conteúdo de NADPH, principal poder redutor para reconstituição do sistema enzimático glutathione redutase/peroxidase. Como também demonstramos que havia aumento da lipogênese e esteroidogênese hepática, propusemos que estes processos biossintéticos eram responsáveis pelo consumo de grandes quantidades de NADPH, depletando o teor de NADPH mitocondrial (Oliveira et al., 2005). A contraprova de que o aumento da esteroidogênese é de fato o agente causal da redução da capacidade antioxidante mitocondrial poderia ser obtida com a inibição deste processo e reversão do estresse oxidativo mitocondrial. No entanto, quando tratamos os animais LDLR0 com doses terapêuticas de lovastatina (100 mg/Kg peso) houve uma piora do estresse oxidativo mitocondrial (Velho et al., 2006). Este efeito se deveu a uma ação tóxica da lovastatina, de maneira dose dependente, diretamente sobre a mitocôndria induzindo transição de permeabilidade mitocondrial. Demonstramos que este efeito foi dose-dependente e menos tóxico para estatinas hidrofílicas. Assim, seria interessante repetir os estudos *in vivo* com doses menores de estatinas hidrofílicas, por exemplo, a pravastatina.

Resultados recentemente publicados de nosso grupo confirmam que este estresse oxidativo mitocondrial nos tecidos dos animais LDLR0 deve-se a diminuição de substratos dependentes de NADP⁺, por exemplo, o isocitrato, pois o aumento da oxidação de NADPH

e da produção de EROS mitocondrial foram corrigidos por administração de isocitrato *in vitro* ou por tratamento *in vivo* dos animais com uma mistura de citrato de sódio e ácido cítrico (Paim et al., 2008).

Por outro lado, um combate ao EROS mitocondrial por agentes antioxidantes também pode ser uma estratégia efetiva na prevenção da aterogênese. Recentemente foi demonstrado que o extrato Vimang® tem poder de neutralizar o dano mitocondrial produzido por agentes pró-oxidantes, por exemplo, impedindo a peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} em mitocôndrias isoladas (Pardo Andreu et al., 2005). Foi sugerido que o componente mangiferina do Vimang®, forma complexo com o ferro inibindo a formação de oxirradicais induzida por ferro (Pardo-Andreu et al., 2006a). A produção de EROS por mitocôndrias isoladas do fígado de camundongos deficientes do receptor de LDL tratados com Vimang® por 1 semana estava reduzida em relação aos controles (Pardo-Andreu et al., 2008b). Deste modo, conhecendo as propriedades antioxidantes do extrato Vimang® e seus efeitos sobre as mitocôndrias pretendemos utiliza-lo *in vivo* para verificar um potencial benefício sobre o desenvolvimento de aterosclerose.

OBJETIVOS

Estudar os efeitos de tratamentos com substrato mitocondrial (citrato), combinado ou não com inibidores de esteroidogênese, e do antioxidante Vimang® sobre a geração de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria hepática e sobre o desenvolvimento da aterosclerose em camundongos hipercolesterolêmicos por deficiência completa de receptor de LDL.

MATERIAIS E MÉTODOS

Camundongos hipercolesterolêmicos deficientes do receptor de LDL (LDLR0)

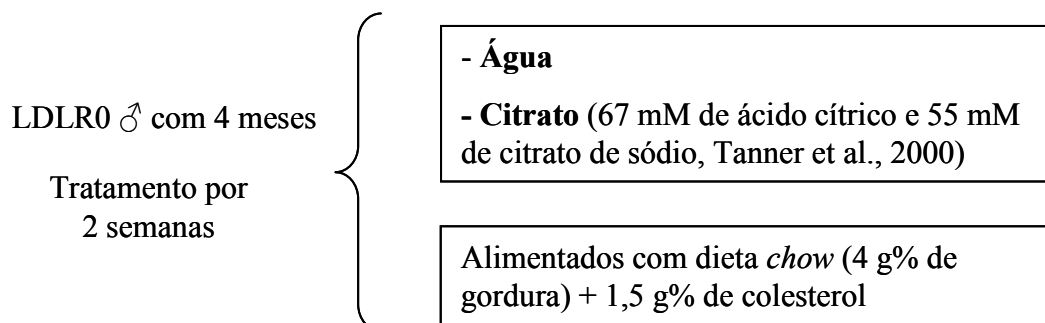
Os camundongos deficientes do receptor de LDL fundadores da colônia foram obtidos no Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Todos os experimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Unicamp – Protocolo nº 1101-2 (CEEAA/UNICAMP). Os camundongos tiveram acesso à dieta padrão para roedores (Nuvital CR1, Colombo, Paraná) e água *ad libitum*, e foram mantidos em câmaras com temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e ciclos de 12 h de claro-escuro. Os fenótipos dos filhotes descendentes dos cruzamentos realizados entre camundongos LDLR0 (*intercrosses*) foram confirmados através da dosagem de colesterol plasmático, por ensaio enzimático-colorimétrico (colesterol superior a 200 mg/dl). Para controle interno, alguns animais também foram genotipados por PCR.

Protocolos experimentais

Foram realizados dois estudos, sendo cada um com dois protocolos diferentes de investigação das lesões ateroscleróticas, induzida por dieta e espontânea:

I- Estudo da reposição de substratos mitocondriais

Aterosclerose induzida por dieta:



Aterosclerose espontânea:

LDLR0 ♀ com 1 mês

Tratamento por
3 meses

- **Água**

- **Citrato** (1,34 mM de ácido cítrico e 1,1 mM de citrato de sódio)

- **Pravastatina** (10 mg/Kg de peso corporal) (Kwak et al., 2003)

- **Citrato + Pravastatina**

Alimentados com dieta *chow* (4 g% de gordura)

II. Estudo dos antioxidante Vimang®

Aterosclerose induzida por dieta:

LDLR0 ♂ 4 meses

Tratados por
2 semanas

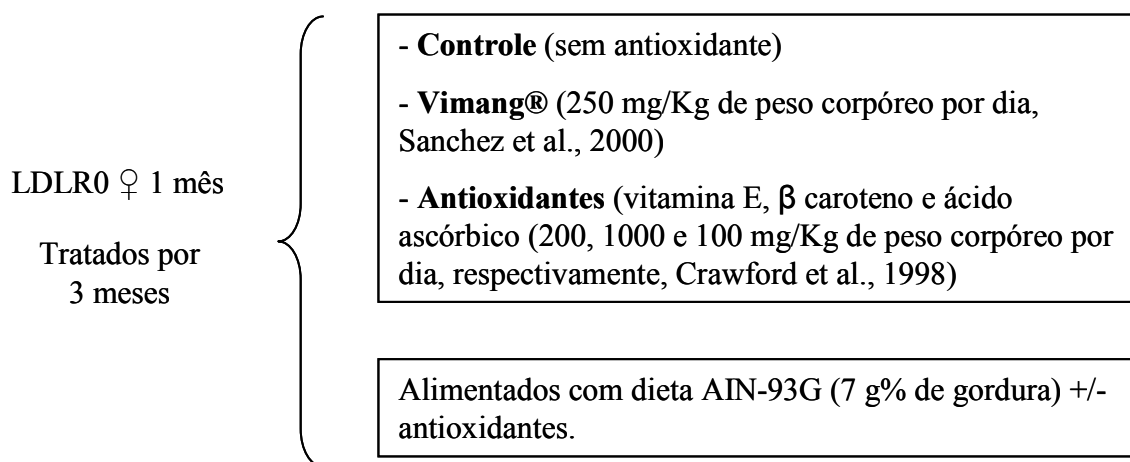
- **Controle** (sem antioxidante)

- **Vimang®** (250 mg/Kg de peso corpóreo por dia, Sanchez et al., 2000)

- **Antioxidantes** (vitamina E, β caroteno e ácido ascórbico (200, 1000 e 100 mg/Kg de peso corpóreo por dia, respectivamente, Crawford et al., 1998)

Alimentados com dieta AIN-93G (7 g% de gordura) +/- antioxidantes. 0,21 g% de colesterol adicionado na dieta na segunda semana.

Aterosclerose espontânea:



Dietas:

As dietas foram preparadas manualmente, sem a presença de água, e acondicionadas em frascos escuros dentro do freezer a temperatura de -20°C . Os antioxidantes foram misturados com os outros ingredientes. A ração em pó era adicionada em pequenos frascos no fundo da gaiola diariamente no período da tarde. A dosagem dos antioxidantes e do Vimang® foi calculada considerando o consumo alimentar de 3 gramas de ração por animal por dia.

Determinações bioquímicas plasmáticas:

Colesterol total e triglicérides plasmáticos foram determinados utilizando-se kits enzimáticos da Roche® (Alemanha), conforme instruções do fabricante. Ácidos graxos livres foram determinados usando o kit enzimático da Wako (Alemanha). A glicemia foi medida com auxílio de glicosímetro (Roche-Accu-Chek, Suíça).

Massa corporal, adiposa e hepática:

As massas do corpo, dos depósitos visíveis de gordura visceral e do fígado foram determinadas por gravimetria.

Determinação de lipídeos do fígado:

Os lipídeos totais do fígado foram extraídos utilizando o método de Folch (Folch et al., 1957). Cerca de 50 mg de fígado foram extraídos com 4 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol durante 16 horas. O extrato total obtido foi filtrado com papel de filtro Frama e seco sob fluxo de nitrogênio. O extrato lipídico seco foi ressuspensão em 400 µL de isopropanol onde se determinou as concentrações de colesterol e triglicérides através de kits enzimáticos da Roche (Alemanha), conforme instruções do fabricante.

Análise histológica das lesões ateroscleróticas:

Os camundongos foram anestesiados e tiveram seus corações perfundidos *in situ* com tampão fosfato (PBS) e em seguida com PBS-formaldeído 10%. Em seguida, os corações foram removidos e fixados em PBS-formaldeído 10% por dois dias no mínimo. O processamento e coloração da raiz da aorta foram realizados de acordo com Paigen et al (1987). Os lipídeos das lesões ateroscleróticas foram corados com *oil red* e quantificados como descrito por Rubin et al (1991), usando Image Pro Plus Software (versão 3.0) para análise da imagem (Media Cybernetics Silver Spring, MD). As lâminas foram analisadas sem o conhecimento da sua identificação. A área média de lesão de cada animal refere-se a soma das áreas das lesões de sete secções de 10 µm, distantes 80 µm umas das outras, em um total de 560 µm de comprimento da aorta, a partir dos folhetos da válvula aórtica.

Mensuração de anticorpos anti-LDLox

Os anticorpos contra LDL oxidada (LDL-ox) foram mensurados através do método de ELISA (Damasceno et al., 2001; Zaratin et al., 2002). Uma placa de 96 poços foi

sensibilizada com 7,5 µg/ml de oxLDL. A LDL humana foi obtida de plasma fresco de voluntários normolipidêmicos por ultracentrifugação (100.000 g a 4°C) (Havel et al., 1955). Em seguida, a LDL foi dialisada durante 48 h contra PBS. A oxidação foi induzida pela incubação de 1 mL de LDL (7-8 mg/mL de proteína) com CuSO₄ (20 mM de CuSO₄) por 18 h a 37°C, e a reação finalizada com adição de EDTA (1,0 mM). A placa de ELISA foi mantida com LDL oxidada *overnight* a 4°C. Após este período, a placa foi lavada quatro vezes com 150 µL de PBS, e bloqueada com 150 µL de gelatina 1% diluída em PBS por 48 horas em temperatura ambiente. As amostras de plasma diluídas 1:200 (50 µL) foram adicionadas aos poços e a placa mantida por 2 horas em temperatura ambiente, e em seguida lavada com PBS contendo Tween 20. Um anticorpo de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (50 µL; 1:1.500) foi adicionado, e depois de uma hora em temperatura ambiente, a placa foi lavada. Finalmente, 75 µL da solução de substratos (250 mg de tetrametilbenzeno diluído em 50 mL de DMSO, 10 µL de 30% H₂O₂, 12 mL tampão citrato, pH 5.5) foi adicionada, e depois de 15 minutos de incubação a temperatura ambiente a reação foi parada com a adição de 25 µL de ácido sulfúrico 2 M. A leitura da densidade óptica foi realizada a 450 nm.

Teste de função hepática e renal:

Uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP) plasmáticos foram determinados em um analisador automático modular PP (Hitachi) usando reagentes de diagnósticos Roche® (Alemanha).

Concentração de TBARS plasmáticos induzida por CuSO₄:

Para determinar as substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), o plasma foi oxidado em banho a 37°C por 5 horas com sulfato de cobre 0,5 mM (20 µL de plasma +

100 μL CuSO_4). Após a incubação, foram transferidos para o tubo de reação 100 μL da solução do plasma oxidado + 200 μL ácido tiobarbitúrico (TBA 0,67% em NaOH 0,05M). Após agitação, foi adicionado 60 μL de TCA 50%. O tubo foi agitado novamente e deixado em banho de água fervente por 30 minutos. Com a amostra já resfriada, o tubo foi agitado e centrifugado por 15 minutos a 2500 rpm. A curva padrão foi feita com diferentes diluições de 1,1,3,3- tetrametoxipropano (TMP) 0,05 mM. E por fim, a curva e as amostras foram lidas no comprimento de onda $\lambda = 532 \text{ nm}$.

Isolamento de linfócitos a partir de baço:

O baço, retirado após exsanguinação total, foi lavado e colocado em 16 mL de tampão PBS 1% e foi homogeneizado. A suspensão de células foi então transferida para 2 tubos de 15 ml contendo 2 ml de Ficoll-Hypaque e centrifugadas a $1350 \times g$ por 25 minutos, à temperatura ambiente. Os linfócitos foram removidos da interfase, lavados duas vezes com 10 mL de tampão PBS e ressuspensos em 0,5 ml do mesmo tampão. A quantificação das células viáveis foi feita na câmara de Newbauer.

Isolamento de mitocôndrias hepáticas:

Mitocôndrias foram isoladas de fígado dos camundongos utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial segundo (Schneider et al., 1950). O fígado foi lavado em solução de sacarose 250 mM contendo tampão HEPES 5,0 mM, pH 7,2 e EGTA 0,5 mM, picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. O material foi centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em sacarose 250 mM, HEPES 5,0 mM, pH 7,2 e EGTA 0,3 mM, e novamente centrifugado na condição anterior. A fração mitocondrial foi ressuspensa na mesma

solução, porém isenta de EGTA, numa concentração de aproximadamente 50 mg de proteína por mL.

Consumo de oxigênio:

O consumo de oxigênio por mitocôndria e linfócitos foi medido utilizando-se um eletrodo do tipo Clark (Hansatech Instruments Ltd conectado ao software OXIGRAPH V1.10, England) em uma câmara de 1 mL equipada com agitador magnético. A concentração de oxigênio inicial no meio de reação foi de 225 nmol/ml (Robinson e Cooper, 1970) a 28°C.

Cinética da oxidação dos nucleotídeos de piridina:

O estado redox dos nucleotídeos de piridina nas suspensões mitocondriais foi acompanhado em um espectrofluorímetro Hitachi (Hitachi (F-4010), Ltd., Tokyo, Japão) operando nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 366 e 450 nm, respectivamente, com a largura da fenda de 5 nm.

Produção de espécies reativas de oxigênio (EROS)

A geração de EROS foi monitorada espectrofluorimetricamente, usando a sonda que atravessa membranas H₂-DCFDA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína, 1μM) (Garcia-Ruiz et al., 1997; LeBel et al., 1992). A fluorescência foi monitorada em 488 nm para excitação e 525 nm para emissão, com a largura da fenda de 3 nm. Calibração foi feita pela adição de concentrações conhecidas de diclorofluoresceína (DCF), o produto da oxidação do H₂-DCF, que apresenta fluorescência.

Análises estatísticas:

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (epm). Foi utilizado o teste Mann-Whitney para comparação de dois grupos ou Kruskal-Wallis para

comparações múltiplas. Para as análises univariadas foi utilizado o teste de Spearman (coeficiente de correlação de Spearman) e a correlação parcial (ajustada). Para as análises multivariadas foi utilizada a regressão linear múltipla. O programa *SPSS Statistics* foi utilizado para o teste de correlação parcial, os outros testes foram analisados no programa *GraphPad InStat*. Em todos os experimentos realizados, consideramos diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

I- Estudo da reposição de substratos mitocondriais e inibição da esteroidogênese

Uma vez que os camundongos LDLR0 tratados por uma semana com citrato concentrado apresentaram diminuição da produção de EROS mitocondrial (Paim et al., 2008), investigamos se esta dose de citrato seria capaz de prevenir ou reduzir a formação de lesões ateroscleróticas desses animais alimentados com dieta enriquecida em colesterol. Os camundongos assim tratados apresentaram uma diminuição estatística de 11% no peso corporal e de 23 % na massa adiposa visceral, e elevação significativa dos lipídeos plasmáticos ($P < 0,001$) de 49%, 77% e 55%, para colesterol, triglicérides e ácidos graxos, respectivamente (**Tab. 1**). A área média de lesão aterosclerótica nos camundongos tratados com citrato foi 81% maior que nos animais não-tratados (**Fig. 1**). Esse resultado está de acordo com a elevação das concentrações plasmáticas de lipídeos e indica que o citrato foi utilizado para biossíntese de lipídeos, incluindo colesterol, agravando a doença. Verificamos ainda que este tratamento com citrato na vigência de dieta com colesterol não causou nenhuma proteção sobre os parâmetros mitocondriais de produção de EROS e velocidade de oxidação de nucleotídeos de piridina (resultados não mostrados). Assim, podemos concluir que a presença do colesterol na dieta, associado com suplementação de citrato, prejudica o perfil lipídico e aumenta a formação de lesões ateroscleróticas dos camundongos LDLR0.

A partir desses resultados, decidimos diminuir a concentração da suplementação oral de citrato em 50 vezes, eliminar o colesterol da dieta, associar um inibidor da esteroidogênese, a pravastatina, e prolongar o tempo de tratamento para 3 meses para verificar o aparecimento de lesões espontâneas. Os camundongos LDLR0 foram divididos

em 4 grupos: controle, citrato, pravastatina e citrato+pravastatina, tratados durante 3 meses a partir do desmame, com 30 dias de idade, e alimentados com dieta isenta de colesterol (*chow*). Os animais tratados com citrato ou pravastatina apresentaram uma diminuição significativa do peso corporal em relação aos animais controle, porém essa diminuição não influenciou a composição corporal relativa, já que os quatro grupos apresentaram valores semelhantes de tecido adiposo visceral e subcutâneo, massa magra, fígado e baço (**Tab. 2**). Houve uma queda de 19% do peso relativo do tecido adiposo visceral no grupo pravastatina em relação ao grupo controle, porém não estatisticamente significativa. Esta poderia ser explicada pelo efeito da pravastatina em diminuir a secreção de VLDL, que fornece ácidos graxos aos tecidos periféricos (Stancu e Sima, 2001).

A concentração de triglicérides (TG) no fígado foi cerca de 20% maior nos dois grupos tratados com citrato em relação aos controles (**Tab. 2**). Entretanto, esse aumento não foi estatisticamente significativo, mesmo quando analisamos um *pool* dos dados dos animais tratados com citrato (citrato e citrato+pravastatina) e comparamos com os grupos que não receberam citrato (controle e pravastatina). A concentração de colesterol (COL) no fígado dos animais dos 4 grupos também não diferiu estatisticamente (**Tab. 2**). Somando-se COL+TG hepático de cada grupo e comparando-se os grupos que receberam citrato vs. não suplementados com citrato obtivemos um valor de 105 ± 12 e 78 ± 9 mg de lípidos/g de tecido, respectivamente, um aumento de 35% que é marginalmente significativo ($p=0.10$). Um maior conteúdo de lípidos no fígado poderia ocorrer, uma vez que o citrato é precursor tanto da síntese de esteróides, como de ácidos graxos.

Em contraste ao aumento marcante da concentração dos lípidos plasmáticos observado no estudo anterior (citrato concentrado + dieta rica em colesterol, durante duas

semanas), nestes experimentos não houve alteração significativa das concentrações plasmáticas de colesterol, triglicérides, ácidos graxos livres e glicose nos 4 grupos de camundongos LDLR0: controles, citrato, pravastatina e citrato+pravastatina (**Tab. 3**). O tratamento com pravastatina (10 mg/Kg) não foi efetivo em reduzir a colesterolemia.

Verificamos também se os tratamentos empregados por longo prazo poderiam afetar a função hepática e renal, através das provas convencionais das concentrações plasmáticas de enzimas amino-transferases hepáticas e uréia e creatinina (**Tab. 3**). Os camundongos tratados com pravastatina apresentaram um aumento significativo de 22% na concentração de uréia no plasma em relação ao controle (**Tab. 3**). Agarwal, (2006) publicou uma revisão, na qual foram citadas algumas evidências de disfunção renal causada por estatinas. Os outros marcadores de função hepática e renal apresentaram-se similares nos 4 grupos.

Analisamos dois indicadores de estresse oxidativo sistêmicos: formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma induzida por sulfato de cobre e presença de anticorpos anti-LDL oxidada (**Tab. 3**). Todos os grupos apresentaram valores semelhantes de TBARS. Entretanto, a quantidade de anticorpos anti-LDL oxidada dos camundongos tratados com citrato e citrato+pravastatina apresentaram valores 60% maiores que os controles, porém a significância foi apenas marginal ($p=0,10$ e $p=0,08$, respectivamente), o que sugere que a suplementação com citrato, isoladamente ou em conjunto com a pravastatina, aumentou a concentração de LDL oxidada, fator fortemente implicado na gênese da aterosclerose (Steinberg et al., 1989; Witztum e Steinberg, 1991).

Quanto aos parâmetros mitocondriais (experimentos realizados no laboratório do Prof Aníbal Vercesi), não observamos diferenças significativas na velocidade de oxidação de nucleotídeos e produção de EROS em mitocôndrias hepáticas nos quatro grupos de camundongos LDLR0 (**Tab. 4**). Esses resultados diferem do estudo anterior com citrato

concentrado (Paim et al., 2008), mostrando que a diluição da concentração de citrato no presente tratamento não foi efetiva para reverter o estresse oxidativo mitocondrial destes animais LDLR0. A produção de EROS em linfócitos intactos também estava semelhante nos grupos controle, citrato e citrato+pravastatina. No entanto, a produção de EROS estava marcadamente aumentada (226%) no grupo pravastatina em relação aos controles (**Tab. 4**). Takahashi et al., (2005) demonstraram aumento de produção das citocinas pró-inflamatórias IL-18 e TNF- α em monócitos de humanos tratados com pravastatina e fluvastatina. Como o TNF- α induz a produção de EROS (Goossens et al., 1999), isso provavelmente explicaria o aumento de EROS nos linfócitos dos camundongos tratados com pravastatina.

Os resultados da análise morfométrica da área de lesão de aterosclerose na raiz da aorta dos quatro grupos estão apresentados na **Figura 2** e as imagens representativas são mostradas na **Figura 3**. Os grupos citrato e pravastatina apresentaram áreas médias de lesão 40% e 90%, respectivamente, maiores que o grupo controle, porém estes valores não atingiram significância estatística. Surpreendentemente, a área média de lesão aterosclerótica nos camundongos tratados com citrato+pravastatina estava cerca de 4 vezes aumentada em relação aos camundongos controles ($p < 0.01$). Desta forma, os tratamentos com o substrato do ciclo de Krebs e inibidor da esteroidogênese, além de não reduzirem o desenvolvimento da aterosclerose em nenhum grupo, quando combinados, aumentam marcadamente a área de lesão aterosclerótica. Estes resultados podem estar relacionados à elevação de anticorpos anti-LDL oxidada nos grupos tratados com citrato associado a algum efeito deletério da estatina.

II. Estudo dos efeitos do antioxidantes Vimang®

Aterosclerose induzida por dieta:

Trabalhos prévios demonstraram que o Vimang® possui propriedades antioxidantes (Martinez et al., 2000; Sanchez et al., 2000). A mangiferina, componente majoritário do Vimang®, é capaz de se complexar com o ferro e inibir a formação de oxirradicais em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (Pardo-Andreu et al., 2006a). Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos LDLR0 tratados com Vimang® apresentaram melhora na sua capacidade antioxidante, evidenciada pela diminuição da velocidade de oxidação de nucleotídeos de piridina (NADPH) e da produção de EROS (Pardo-Andreu et al., 2008b). A partir disso, investigamos um possível benefício sobre o desenvolvimento da aterosclerose em camundongos LDLR0 tratados com Vimang®.

Os camundongos LDLR0 foram divididos em 3 grupos: controle, tratados com Vimang® e com uma combinação de antioxidantes vitamínicos conhecidos, durante 2 semanas e alimentados com dieta enriquecida com colesterol na segunda semana para induzir lesões de aterosclerose. Os 3 grupos apresentaram valores semelhantes no peso corporal, tecido adiposo visceral, fígado e baço (**Tab. 5**). Os animais tratados com Vimang® e antioxidantes apresentaram uma diminuição de 20% na concentração de colesterol hepático em relação aos animais controles. As concentrações de triglicérides hepáticos estavam semelhantes entre os 3 grupos (**Tab. 5**).

Os camundongos tratados com Vimang® tiveram uma redução significativa de 15% do colesterol plasmático em relação aos controles. O tratamento com os antioxidantes também promoveu uma redução de 13% no colesterol plasmático em relação aos controles, no entanto, essa redução não foi estatisticamente significativa. As concentrações plasmáticas de glicose e de triglicérides estavam similares entre os 3 grupos (**Tab. 6**). A redução da colesterolemia por tratamento com antioxidantes não é incomum na literatura. Efeito hipocolesterolêmico do Vimang® também foi encontrado por Muruganandan et al (2005)

em um estudo com ratos diabéticos tratados com mangiferina, que é o principal componente do extrato Vimang®. Camundongos deficientes de apolipoproteína E tratados com vitamina C e E apresentaram diminuição nas concentrações plasmáticas de colesterol (Nespereira et al., 2003) e ratos hipertensos suplementados com β -caroteno, também tiveram redução de colesterol plasmático (Tsai et al., 1992). Com isso, a diminuição na concentração de colesterol hepático pode ser facilmente compreendida, já que o fígado é o principal órgão modulador das concentrações de colesterol plasmático.

Averiguamos também se os tratamentos empregados poderiam afetar a função hepática e renal (**Tab. 6**). Os marcadores sistêmicos de função hepática e renal apresentaram-se similares entre os grupos, mostrando que a suplementação com Vimang® e antioxidantes não foi tóxica para o fígado e os rins dos camundongos.

Analisamos dois indicadores de estresse oxidativo sistêmicos nos animais LDLR0 tratados com Vimang® e antioxidantes, a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma induzida por sulfato de cobre, e a presença de anticorpos anti-LDL oxidada (**Tab. 6**). O tratamento com Vimang® não modificou a concentração de TBARS em relação aos não-tratados (controles), porém, como esperado, o tratamento com antioxidantes diminuiu em 23% a concentração de TBARS em relação aos tratados com Vimang® e não-tratados. A diminuição de TBARS plasmáticos também foi observada em camundongos deficientes da apoE tratados com vitamina C e E (Nespereira et al., 2003) e em humanos suplementados com vitamina E (Motoyama et al., 1998). Com isso, conclui-se que os camundongos tratados com Vimang® não tiveram modificações na capacidade antioxidante plasmática, diferentemente dos animais tratados com antioxidantes. Surpreendentemente, a quantidade de anticorpos anti-LDL oxidada estava aumentada nos camundongos tratados com Vimang® (**Tab. 6**), indicando elevação da concentração de

LDL oxidada, parâmetro fortemente implicado na gênese da aterosclerose (Steinberg et al., 1989; Witztum e Steinberg, 1991).

Os efeitos da suplementação *in vivo* de Vimang® sobre a produção de EROS e oxidação de nucleotídeos de piridina em fígado e linfócitos do baço são mostrados na Figura 8 e 9. Não houve diferenças significativas entre os 3 grupos de camundongos LDLR0 quanto à velocidade de oxidação de nucleotídeos de piridina e produção de EROS por mitocôndrias hepáticas (**Tab. 7**). Esses resultados diferem do estudo anterior (Pardo-Andreu et al., 2008b) que mostrou que o tratamento com Vimang® por 7 dias, na ausência de colesterol na dieta, normalizou completamente a velocidade de oxidação dos nucleotídeos de piridina e de produção de EROS nas mitocôndrias dos animais LDLR0, tornando-as semelhantes aos valores das mitocôndrias de camundongos *wild type*. Portanto, em nosso estudo, a presença de colesterol na dieta prejudicou o efeito benéfico do Vimang® de reduzir a velocidade de oxidação de NADPH e de produção de EROS mitocondria (Pardo-Andreu et al., 2008b). A produção de EROS em linfócitos intactos estava 40% e 30% menor nos camundongos tratados com Vimang® e antioxidantes, respectivamente, em relação aos camundongos não-tratados. No entanto, a redução encontrada no atual trabalho, não foi estatisticamente significativa (**Tab. 7**).

Os resultados da análise da área de lesão de aterosclerose na raiz da aorta estão apresentados na **Figura 4** e imagens representativas de cada grupo são mostradas na **Figura 5**. A área média de lesão aterosclerótica dos 3 grupos de camundongos foram estatisticamente semelhantes. Apesar da diminuição do colesterol plasmático e hepático e redução de TBARS plasmático no grupo tratado com os antioxidantes, não houve redução da área média de lesão aterosclerótica. No grupo Vimang®, os efeitos de redução de

colesterol no plasma e fígado devem ter sido neutralizados pelo aumento de LDL oxidadas, também resultando em nenhum benefício para a manifestação das lesões aórticas.

Aterosclerose espontânea:

Os camundongos LDLR0 foram tratados durante 3 meses, a partir do desmame, com dieta livre de colesterol contendo Vimang® ou antioxidantes e comparados aos controles (só dieta livre de colesterol). Os 3 grupos apresentaram valores semelhantes no peso corporal, tecido adiposo visceral, fígado e baço (**Tab. 8**). As concentrações hepáticas de triglicérides e colesterol também foram semelhantes nos 3 grupos. (**Tab. 8**).

As concentrações plasmáticas de triglicérides e de glicose estavam similares entre os 3 grupos. A concentração de colesterol plasmático dos camundongos tratados com Vimang® foi similar aos controles e 17% maior que os camundongos tratados com antioxidantes (**Tab. 9**). Todos os grupos também apresentaram valores semelhantes para os marcadores de função hepática e renal (**Tab. 9**).

Analizamos também dois indicadores de estresse oxidativo sistêmicos, como a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma induzida por sulfato de cobre, e a presença de anticorpos anti-LDL oxidada, foram analisados (**Tab. 9**). O tratamento com Vimang® não modificou a concentração de TBARS em relação ao controle, no entanto, estava 12% aumentada estatisticamente em relação ao grupo que recebeu antioxidantes. A quantidade de anticorpos anti-LDL oxidada estava similar nos três grupos (**Tab. 9**).

Quanto aos parâmetros mitocondriais, também não foram observadas diferenças significativas entre os 3 grupos de camundongos LDLR0 na velocidade de oxidação de nucleotídeos e de produção de EROS por mitocôndrias hepáticas (**Tab. 10**). Esses resultados diferem do estudo de Pardo-Andreu et al., (2008b), que tratou os camundongos

LDLR0 oralmente durante 7 dias, por gavagem. Por outro lado, a produção de EROS em linfócitos intactos foi 20% e 40% menor nos camundongos tratados com Vimang® e antioxidantes, respectivamente, em relação aos camundongos controles. Porém, essa redução não foi estatisticamente significativa (**Tab. 10**).

Os resultados da análise da área de lesão de aterosclerose na raiz da aorta estão apresentados na **Figura 6** e imagens representativas de cada grupo são mostradas na **Figura 7**. A área média de lesão aterosclerótica dos camundongos tratados com Vimang® estava 35% aumentada em relação aos camundongos controles e tratados com antioxidantes ($P = 0,01$). Esse aumento não era esperado, uma vez que, o Vimang® na literatura é descrito por possuir ações antioxidantes (Martinez et al., 2000; Sanchez et al., 2000).

A falta de efeito sobre os parâmetros redox mitocondriais, elevação de TBARS no plasma e da área de lesão aterosclerótica nos animais tratados com Vimang® por longo prazo nos leva a pensar que este extrato pode ter tido uma ação pró-oxidante. Os antioxidantes presentes na ração poderiam ter sofrido modificações químicas durante seu armazenamento ou exposição ao ar quando ofertados na gaiola dos animais, ou ainda, ter se tornado endogenamente um pró-oxidante. Rietjens et al (2002) apresentam uma excelente revisão sobre a química pró-oxidante e toxicidade de antioxidantes naturais como as vitaminas C, E, carotenóides e os flavonóides.

III. Análises de correlações com a área de lesão aterosclerótica

Realizamos análises de correlação para identificar possíveis variáveis implicadas na formação das lesões ateroscleróticas. Utilizamos os dados dos dois estudos de lesão espontânea (dieta livre de colesterol) que incluem os tratamentos com citrato e/ou

pravastatina e tratamentos com Vimang® ou antioxidantes, e respectivos controles, analisados separadamente e em conjunto.

Nas correlações univariadas, observamos que o aumento da área de lesão de aterosclerose foi diretamente relacionado com as concentrações plasmáticas de colesterol, triglicérides, ALP e produção de EROS mitocondrial no fígado no estudo com citrato e/ou pravastatina (**Tab 11**). No estudo com Vimang® ou antioxidantes apenas o colesterol e o triglicérides plasmático se correlacionaram com a aterosclerose (**Tab. 11**). Ao analisar os dados dos estudos em conjunto verificamos que a lesão de aterosclerose estava correlacionada positivamente com as concentrações plasmáticas de colesterol e triglicérides (**Fig. 8**), de TBARS (**Fig. 9**), de ALP (**Fig. 10**) e com a produção de EROS e oxidação de nucleotídeos de piridina em mitocôndrias hepáticas (**Fig. 11**), mas não se correlacionou com a produção de EROS pelos linfócitos do baço (**Tab. 11**).

Como os lipídeos plasmáticos são parâmetros comprovadamente ligados à gênese da aterosclerose, realizamos análise de correlação parcial ajustada pelas concentrações de colesterol e triglicérides plasmáticos (**Tab. 12**). Nesta análise ajustada, verificamos no estudo com citrato que apenas a produção de EROS mitocondrial no fígado correlaciona-se significativamente com a área de lesão de aterosclerose. No estudo com Vimang®, apenas a velocidade de oxidação de NADPH estava positivamente correlacionada com a aterosclerose. Quando os dois estudos foram analisados em conjunto, a concentração plasmática de ALT e a oxidação mitocondrial de NADPH estavam correlacionadas positivamente com a área de lesão (**Tab. 12**).

Para confirmar os resultados das análises univariadas fizemos uma análise de regressão linear multivariada. Os coeficientes de determinação das variáveis independentes (colesterol, triglicérides, TBARS, ALT e ALP plasmático, produção de EROS a oxidação

de NADPH mitocondrial no fígado) sobre a variável dependente (área de lesão aterosclerótica) estão mostrados na **Tabela. 13**. Para o estudo com citrato e/ou pravastatina, somente o colesterol e triglicérides plasmático, e a produção de EROS mitocondrial apresentaram contribuição significativa para a área de lesão aterosclerótica. No estudo com Vimang® a regressão multivariada não revelou contribuição significativa de nenhuma das variáveis analisadas. Quando os dois estudos foram analisados em conjunto, a regressão multivariada indicou contribuição significante somente do colesterol plasmático (**Tab. 13**).

Em conjunto, estes resultados sugerem que existe uma dependência entre a função hepática e a severidade das lesões ateroscleróticas na aorta. Isso foi evidenciado pelas correlações com estado redox mitocondrial, fosfatase alcalina e alanina aminotransferase plasmática, seja nas análises univariadas ou multivariadas. A correlação ajustada pelos lipídeos demonstrou que o estresse oxidativo hepático é um fator independente para o desenvolvimento da aterosclerose nestes animais. Com isso, mecanismos metabólicos que ocorrem precocemente no fígado dos animais LDLR0 poderiam repercutir no desenvolvimento da lesão vascular aórtica. Assim, propomos como hipótese que esta conexão com a severidade da aterosclerose deve ser mediada por fatores pró-aterogênicos de origem hepática. Estes poderiam ser de natureza inflamatória, por exemplo, proteína C reativa ou PAI-1, e/ou de natureza metabólica como secreção de VLDL já oxidadas, os quais cronicamente resultam em disfunção endotelial e formação de células espumosas. Futuramente, essa hipótese deverá ser confirmada comparando-se o perfil de componentes oxidados da VLDL, a sua suscetibilidade à oxidação e o teor de marcadores inflamatórios hepáticos dos camundongos LDLR0 em relação aos camundongos selvagens.

CONCLUSÕES:

1- Os tratamentos para suplementar a dieta com substrato mitocondrial, inibidor de esteroidogênese ou antioxidantes não foram eficazes contra o desenvolvimento da aterosclerose, seja induzida pela dieta ou espontânea.

2- A suplementação com citrato e/ou pravastatina não causou benefício sistêmico, hepático ou vascular. Ao contrário, verificou-se aumento de TG hepático e de LDL oxidada no plasma dos animais tratados com citrato, aumento da concentração de uréia plasmática e de EROS nos linfócitos dos animais tratados com pravastatina e aumento de lesão aórtica nos animais tratados com citrato + pravastatina.

3- O tratamento com Vimang® e antioxidantes vitamínicos produziu efeitos benéficos de redução de colesterolemia e da produção de EROS pelos linfócitos. Nos grupos tratados com os antioxidantes vitamínicos houve também redução de suscetibilidade à lipoperoxidação. No entanto, não houve nenhuma redução na área de lesão aterosclerótica destes animais, ao contrário, houve aumento do tamanho das lesões espontâneas no grupo Vimang®.

4- Análises de correlações com o conjunto de dados dos diversos parâmetros sistêmicos e mitocondriais apontaram possíveis fatores determinantes da extensão da área de lesão aterosclerótica. A severidade da aterosclerose foi correlacionada positivamente com as concentrações de colesterol e triglicérides plasmáticos, como esperado. Além disso, encontramos correlações positivas significantes com parâmetros mitocondriais hepáticos, como a velocidade de oxidação de NADPH e de produção mitocondrial de EROS. Pela regressão linear multivariada ficou confirmada a importância dos lipídeos plasmáticos e da produção de EROS mitocondrial hepático na aterosclerose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, R. (2006). Effects of statins on renal function. *Am J Cardiol* 97, 748-755.
- Alberici, L. C., Oliveira, H. C., Patricio, P. R., Kowaltowski, A. J., and Vercesi, A. E. (2006). Hyperlipidemic mice present enhanced catabolism and higher mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity. *Gastroenterology* 131, 1228-1234.
- Assmann, G. (2001). Pro and con: high-density lipoprotein, triglycerides, and other lipid subfractions are the future of lipid management. *Am J Cardiol* 87, 2B-7B.
- Bird, D. A., Tangirala, R. K., Fruebis, J., Steinberg, D., Witztum, J. L., and Palinski, W. (1998). Effect of probucol on LDL oxidation and atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Lipid Res* 39, 1079-1090.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L. L., Simonetti, R. G., and Gluud, C. (2007). Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *Jama* 297, 842-857.
- Boveris, A. (1977). Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol* 78, 67-82.
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47.
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-340.
- Chisolm, G. M., and Steinberg, D. (2000). The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 28, 1815-1826.
- Crawford, R. S., Kirk, E. A., Rosenfeld, M. E., LeBoeuf, R. C., and Chait, A. (1998). Dietary antioxidants inhibit development of fatty streak lesions in the LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 1506-1513.

Damasceno, N. R., Gidlund, M. A., Goto, H., Dias, C. T., Okawabata, F. S., and Abdalla, D. S. (2001). Casein and soy protein isolate in experimental atherosclerosis: influence on hyperlipidemia and lipoprotein oxidation. *Ann Nutr Metab* 45, 38-46.

Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497-509.

Frei, B. (1999). On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. *Proc Soc Exp Biol Med* 222, 196-204.

Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Mari, M., Morales, A., and Fernandez-Checa, J. C. (1997). Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* 272, 11369-11377.

Garrido, G., Gonzalez, D., Delporte, C., Backhouse, N., Quintero, G., Nunez-Selles, A. J., and Morales, M. A. (2001). Analgesic and anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Phytother Res* 15, 18-21.

Garrido, G., Gonzalez, D., Lemus, Y., Garcia, D., Lodeiro, L., Quintero, G., Delporte, C., Nunez-Selles, A. J., and Delgado, R. (2004). In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). *Pharmacol Res* 50, 143-149.

Gimpl, G., Burger, K., Fahrenholz, F. (2002). A closer look at the cholesterol sensor. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 27, 596-598.

Goossens, V., De Vos, K., Vercammen, D., Steemans, M., Vancompernelle, K., Fiers, W., Vandenabeele, P., and Grooten, J. (1999). Redox regulation of TNF signaling. *Biofactors* 10, 145-156.

Gordon, D. J., and Rifkind, B. M. (1989). High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 321, 1311-1316.

Green, D. R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629.

Havel, R. J., Eder, H. A., and Bragdon, J. H. (1955). The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 34, 1345-1353.

Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B., and Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342, 1007-1011.

Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H., and Stanley, K. K. (1988). Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *Embo J* 7, 4119-4127.

Ishibashi, S., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Gerard, R. D., Hammer, R. E., and Herz, J. (1993). Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 92, 883-893.

Ishibashi, S., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Herz, J., and Burns, D. K. (1994). Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest* 93, 1885-1893.

Koga, T., Kwan, P., Zubik, L., Ameho, C., Smith, D., and Meydani, M. (2004). Vitamin E supplementation suppresses macrophage accumulation and endothelial cell expression of adhesion molecules in the aorta of hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* 176, 265-272.

Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F., and Vercesi, A. E. (2001). Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 495, 12-15.

Kowaltowski, A. J., and Vercesi, A. E. (1999). Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 26, 463-471.

Kritchevsky, S. B., Shimakawa, T., Tell, G. S., Dennis, B., Carpenter, M., Eckfeldt, J. H., Peacher-Ryan, H., and Heiss, G. (1995). Dietary antioxidants and carotid artery wall

thickness. The ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation* 92, 2142-2150.

Kurosawa, T., Itoh, F., Nozaki, A., Nakano, Y., Katsuda, S., Osakabe, N., Tsubone, H., Kondo, K., and Itakura, H. (2005). Suppressive effects of cacao liquor polyphenols (CLP) on LDL oxidation and the development of atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* 179, 237-246.

Kwak, B. R., Veillard, N., Pelli, G., Mulhaupt, F., James, R. W., Chanson, M., and Mach, F. (2003). Reduced connexin43 expression inhibits atherosclerotic lesion formation in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 107, 1033-1039.

LeBel, C. P., Ali, S. F., and Bondy, S. C. (1992). Deferoxamine inhibits methyl mercury-induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. *Toxicol Appl Pharmacol* 112, 161-165.

Lemasters, J. J., and Nieminen, A. L. (2001). Mitochondria in pathogenesis (New York: Academic/Penum Publishers).

Libby, P. (2000). Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 247, 349-358.

Libby, P. (2005). The forgotten majority: unfinished business in cardiovascular risk reduction. *J Am Coll Cardiol* 46, 1225-1228.

Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241.

Madamanchi, N. R., Vendrov, A., and Runge, M. S. (2005). Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 29-38.

Martinez, G., Delgado, R., Perez, G., Garrido, G., Nunez Selles, A. J., and Leon, O. S. (2000). Evaluation of the in vitro antioxidant activity of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Phytother Res* 14, 424-427.

Miller, E. R., 3rd, Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R. A., Appel, L. J., and Guallar, E. (2005). Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 142, 37-46.

Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc* 41, 445-502.

Motoyama, T., Kawano, H., Kugiyama, K., Hirashima, O., Ohgushi, M., Tsunoda, R., Moriyama, Y., Miyao, Y., Yoshimura, M., Ogawa, H., and Yasue, H. (1998). Vitamin E administration improves impairment of endothelium-dependent vasodilation in patients with coronary spastic angina. *J Am Coll Cardiol* 32, 1672-1679.

Muruganandan, S., Srinivasan, K., Gupta, S., Gupta, P. K., and Lal, J. (2005). Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 97, 497-501.

Nakata, Y., and Maeda, N. (2002). Vulnerable atherosclerotic plaque morphology in apolipoprotein E-deficient mice unable to make ascorbic Acid. *Circulation* 105, 1485-1490.

Nedeljkovic, Z. S., Gokce, N., and Loscalzo, J. (2003). Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgrad Med J* 79, 195-199; quiz 198-200.

Nespereira, B., Perez-Ilzarbe, M., Fernandez, P., Fuentes, A. M., Paramo, J. A., and Rodriguez, J. A. (2003). Vitamins C and E downregulate vascular VEGF and VEGFR-2 expression in apolipoprotein-E-deficient mice. *Atherosclerosis* 171, 67-73.

Nunez-Selles, A. J., Delgado-Hernandez, R., Garrido-Garrido, G., Garcia-Rivera, D., Guevara-Garcia, M., and Pardo-Andreu, G. L. (2007). The paradox of natural products as pharmaceuticals. Experimental evidences of a mango stem bark extract. *Pharmacol Res* 55, 351-358.

Nunez Selles, A. J., Velez Castro, H. T., Agüero-Aguero, J., Gonzalez-Gonzalez, J., Naddeo, F., De Simone, F., and Rastrelli, L. (2002). Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark

aqueous decoction used in Cuba as a nutritional supplement. *J Agric Food Chem* 50, 762-766.

Oliveira, H. C., Cosso, R. G., Alberici, L. C., Maciel, E. N., Salerno, A. G., Dorighello, G. G., Velho, J. A., de Faria, E. C., and Vercesi, A. E. (2005). Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. *Faseb J* 19, 278-280.

Paigen, B., Morrow, A., Holmes, P. A., Mitchell, D., and Williams, R. A. (1987). Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 68, 231-240.

Paim, B. A., Velho, J. A., Castilho, R. F., Oliveira, H. C., and Vercesi, A. E. (2008). Oxidative stress in hypercholesterolemic LDL (low-density lipoprotein) receptor knockout mice is associated with low content of mitochondrial NADP-linked substrates and is partially reversed by citrate replacement. *Free Radic Biol Med* 44, 444-451.

Pardo-Andreu, G. L., Barrios, M. F., Curti, C., Hernandez, I., Merino, N., Lemus, Y., Martinez, I., Riano, A., and Delgado, R. (2008a). Protective effects of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron-induced oxidative damage to rat serum and liver. *Pharmacol Res* 57, 79-86.

Pardo-Andreu, G. L., Delgado, R., Nunez-Selles, A. J., and Vercesi, A. E. (2006a). Dual mechanism of mangiferin protection against iron-induced damage to 2-deoxyribose and ascorbate oxidation. *Pharmacol Res* 53, 253-260.

Pardo-Andreu, G. L., Paim, B. A., Castilho, R. F., Velho, J. A., Delgado, R., Vercesi, A. E., and Oliveira, H. C. (2008b). *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and its main polyphenol mangiferin prevent mitochondrial oxidative stress in atherosclerosis-prone hypercholesterolemic mouse. *Pharmacol Res* 57, 332-338.

Pardo-Andreu, G. L., Philip, S. J., Riano, A., Sanchez, C., Viada, C., Nunez-Selles, A. J., and Delgado, R. (2006b). *Mangifera indica* L. (Vimang) protection against serum oxidative stress in elderly humans. *Arch Med Res* 37, 158-164.

- Pardo Andreu, G., Delgado, R., Velho, J., Inada, N. M., Curti, C., and Vercesi, A. E. (2005). *Mangifera indica* L. extract (Vimang) inhibits Fe²⁺-citrate-induced lipoperoxidation in isolated rat liver mitochondria. *Pharmacol Res* 51, 427-435.
- Pauciullo, P., and Mancini, M. (1998). Treatment challenges in hypercholesterolemia. *Cardiovasc Drugs Ther* 12, 325-337.
- Rietjens, I. M. C. M., Boersma, M. G., Haan, d. L., Spenkelink, B., Awad, H. M., Cnubben, N. H. P., van Zanden, J. J., van der Woude, H., Alink, G. M., and Koeman, J. H. (2002). The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11, 321-333.
- Robinson, J., and Cooper, J. M. (1970). Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. *Anal Biochem* 33, 390-399.
- Rodeiro, I., Cancino, L., Gonzalez, J. E., Morffi, J., Garrido, G., Gonzalez, R. M., Nunez, A., and Delgado, R. (2006). Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. *Food Chem Toxicol* 44, 1707-1713.
- Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 801-809.
- Rubin, E. M., Krauss, R. M., Spangler, E. A., Verstuyft, J. G., and Clift, S. M. (1991). Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature* 353, 265-267.
- Sanchez, G. M., Re, L., Giuliani, A., Nunez-Selles, A. J., Davison, G. P., and Leon-Fernandez, O. S. (2000). Protective effects of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacol Res* 42, 565-573.

Schneider, W. C., Hogeboom, G. H., and Ross, H. E. (1950). Intracellular distribution of enzymes. VII. The distribution of nucleic acids and adenosinetriphosphatase in normal mouse liver and mouse hepatoma. *J Natl Cancer Inst* 10, 977-982.

Skulachev, V. P. (2000). How proapoptotic proteins can escape from mitochondria? *Free Radic Biol Med* 29, 1056-1059.

Stancu, C., and Sima, A. (2001). Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med* 5, 378-387.

Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., and Witztum, J. L. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320, 915-924.

Steinberg, D., and Witztum, J. L. (2002). Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* 105, 2107-2111.

Stephens, N. G., Parsons, A., Schofield, P. M., Kelly, F., Cheeseman, K., and Mitchinson, M. J. (1996). Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 347, 781-786.

Stocker, R., and Keaney, J. F., Jr. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 84, 1381-1478.

Street, D. A., Comstock, G. W., Salkeld, R. M., Schuep, W., and Klag, M. J. (1994). Serum antioxidants and myocardial infarction. Are low levels of carotenoids and alpha-tocopherol risk factors for myocardial infarction? *Circulation* 90, 1154-1161.

Takahashi, H. K., Mori, S., Iwagaki, H., Yoshino, T., Tanaka, N., Weitz-Schmidt, G., and Nishibori, M. (2005). Differential effect of LFA703, pravastatin, and fluvastatin on production of IL-18 and expression of ICAM-1 and CD40 in human monocytes. *J Leukoc Biol* 77, 400-407.

- Tanner, G. A., Vijayalakshmi, K., and Tanner, J. A. (2000). Effects of potassium citrate/citric acid intake in a mouse model of polycystic kidney disease. *Nephron* 84, 270-273.
- Ting, H. H., Timimi, F. K., Haley, E. A., Roddy, M. A., Ganz, P., and Creager, M. A. (1997). Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. *Circulation* 95, 2617-2622.
- Tsai, A. C., Mazeedi, H. A., and Mameesh, M. S. (1992). Dietary beta-carotene reduces serum lipid concentrations in spontaneously hypertensive rats fed a vitamin A-fortified and cholesterol-enriched diet. *J Nutr* 122, 1768-1771.
- Velho, J. A., Okanobo, H., Degasperi, G. R., Matsumoto, M. Y., Alberici, L. C., Cosso, R. G., Oliveira, H. C., and Vercesi, A. E. (2006). Statins induce calcium-dependent mitochondrial permeability transition. *Toxicology* 219, 124-132.
- Vercesi, A. E., Castilho, R. F., Kowaltowski, A. J., and Oliveira, H. C. (2007). Mitochondrial energy metabolism and redox state in dyslipidemias. *IUBMB Life* 59, 263-268.
- Vercesi, A. E., Kowaltowski, A. J., Oliveira, H. C., and Castilho, R. F. (2006). Mitochondrial Ca²⁺ transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. *Front Biosci* 11, 2554-2564.
- Wilson, T., Knight, T. J., Beitz, D. C., Lewis, D. S., and Engen, R. L. (1996). Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sci* 59, PL15-21.
- Witztum, J. L., and Steinberg, D. (1991). Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88, 1785-1792.
- Zaratin, A., Gidlund, M., Boschov, P., Castilho, L., and de Faria, E. C. (2002). Antibodies against oxidized low-density lipoprotein in normolipidemic smokers. *Am J Cardiol* 90, 651-653.

Zhang, S. H., Reddick, R. L., Avdievich, E., Surles, L. K., Jones, R. G., Reynolds, J. B., Quarfordt, S. H., and Maeda, N. (1997). Paradoxical enhancement of atherosclerosis by probucol treatment in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest* 99, 2858-2866.

Tab. 1: Características físicas e lipemia de camundongos LDLR0 controles e tratados por 2 semanas com citrato e alimentados com dieta rica em colesterol .

Parâmetros	Controle	Citrato
Corpo (g)	21,1 ± 0,42	19,0 ± 0,41*
T. Adiposo Visceral (%)	1,31 ± 0,05	1,01 ± 0,06*
Fígado (%)	4,41 ± 0,28	4,52 ± 0,07
Colesterol (mg/dL)	584 ± 38,4	870 ± 45,2*
Triglicérides (mg/dL)	158 ± 19,8	279 ± 16,5*
Ácidos Graxos (mmol/L)	0,87 ± 0,05	1,35 ± 0,09*

Média ± epm (n = 14-16). Dieta contém 1.5 g% de colesterol adicionado à dieta chow (4 g% de gordura). Citrato foi adicionado à água de beber (67 mM de ácido cítrico + 55 mM citrato de sódio).

* P< 0,05 em relação ao controle.

Tab. 2: Parâmetros corporais dos camundongos LDLR0 controles, tratados com citrato, pravastatina e citrato+pravastatina durante 3 meses.

Parâmetros	Controle	Citrato	Pravastatina	Citrato+Prava.
Corpo (g)	19,7 ± 0,25	17,7 ± 0,27*	17,3 ± 0,41*	18,2 ± 0,24
T. Adiposo Subcutâneo				
%	3,0 ± 0,2	3,8 ± 0,5	3,3 ± 0,2	3,1 ± 0,5
mg	627 ± 32,8	675 ± 87,1	568 ± 43,4	567 ± 108,2
T. Adiposo Visceral				
%	0,91 ± 0,08	0,93 ± 0,11	0,74 ± 0,07	0,84 ± 0,12
mg	169,8 ± 15,0	167,0 ± 19,9	130,3 ± 15,5	154,7 ± 24,9
Massa magra (%)	65,4 ± 0,9	64,5 ± 0,5	63,8 ± 0,6	64,9 ± 0,7
Fígado (%)	4,68 ± 0,09	4,72 ± 0,08	4,63 ± 0,11	4,78 ± 0,04
Baço (%)	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,25 ± 0,00
COL hepático (mg/g)	4,5 ± 0,6	5,1 ± 0,6	4,4 ± 0,6	5,9 ± 0,8
TG hepático (mg/g)	79 ± 13,7	97 ± 17,8	69,3 ± 10,8	102,3 ± 15,6

Média ± epm (n = 8-9). Citrato foi adicionado à água de beber (1.34 mM de ácido cítrico + 1.1 mM citrato de sódio). Pravastatina foi diluída na água de beber equivalente a 10 mg/Kg peso corpóreo (consumo diário de água de 3 ml/dia). * P< 0,05 em relação ao controle.

Tab. 3: Concentrações plasmáticas de glicose, lipídeos, TBARS, anticorpos anti-LDL oxidada e marcadores de função renal e hepática de camundongos LDLR0 controles, tratados com citrato, pravastatina e citrato+pravastatina durante 3 meses.

Parâmetros	Controle	Citrato	Pravastatina	Citrato+Prava.
Glicose (mg/dL)	85 ± 4,1	77 ± 4,1	85 ± 3,3	79 ± 4,2
Triglicérides (mg/dL)	103 ± 6,7	104 ± 6,6	110 ± 8,3	115 ± 8,8
Colesterol (mg/dL)	234 ± 13,3	238 ± 8,4	238 ± 12,1	252 ± 9,1
AGL (mmol/L)	0,80 ± 0,09	0,83 ± 0,06	0,75 ± 0,06	0,76 ± 0,03
Anti-LDLox (ABS)	0,34 ± 0,07	0,54 ± 0,08 ^{&}	0,42 ± 0,09	0,54 ± 0,07 [#]
TBARS (µmol/L)	258,5 ± 10,3	248,6 ± 7,8	234,5 ± 6,6	245,5 ± 15,2
ALT (U/L)	36,0 ± 2,1	48,7 ± 4,2	44,8 ± 4,5	38,7 ± 3,1
AST (U/L)	117,7 ± 11,4	138,1 ± 12,4	155,0 ± 27,9	130,0 ± 14,7
ALP (U/L)	158,1 ± 8	145,6 ± 15,7	173,1 ± 11,2	172,4 ± 7,7
Uréia (mg/dL)	77,0 ± 2,4	84,7 ± 1,5	94,3 ± 5,4*	81,8 ± 4,3
Creatinina (mg/dL)	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01

Média ± epm (n = 7-9). ALT: alanina aminotransferase, ALP- fosfatase alcalina, AST, aspartato aminotransferase. Citrato foi adicionado à água de beber (1.34 mM de ácido cítrico + 1.1 mM citrato de sódio). Pravastatina foi diluída na água de beber equivalente a 10 mg/Kg peso corpóreo (consumo diário de água de 3 ml/dia). * P< 0,05; [&]P = 0,10 e [#]P = 0,08 em relação ao controle

Tab. 4: Velocidade de geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de oxidação de nucleotídeos de piridina em mitocôndrias isoladas de fígado e produção de EROS em células linfomonocitárias de baço dos camundongos LDLR0 controles, tratados com citrato, pravastatina e citrato+pravastatina durante 3 meses.

Parâmetros	Controle	Citrato	Pravastatina	Citrato+Prava.
EROS-mitocondrial hepático				
(η mol DCF/mg/min)	1,71 $\pm$ 0,19	2,02 $\pm$ 0,32	1,66 $\pm$ 0,08	1,83 $\pm$ 0,18
Oxidação de NADPH				
mitochondrial hepático	0,95 $\pm$ 0,13	0,80 $\pm$ 0,2	0,92 $\pm$ 0,21	0,73 $\pm$ 0,22
(η mol NADPH/mg/min)				
EROS- células				
linfomonocitárias	113,6 $\pm$ 15	101,4 $\pm$ 20	309,7 $\pm$ 19*	146 $\pm$ 18
(η mol DCF/10 ⁶ células/min)				

Média $\pm$ epm (n = 5-6). Citrato foi adicionado à água de beber (1.34 mM de ácido cítrico + 1.1 mM citrato de sódio). Pravastatina foi diluída na água de beber equivalente a 10 mg/Kg peso corpóreo (consumo diário de água de 3 ml/dia). * P< 0,05 em relação ao controle.

Tab. 5: Parâmetros corporais dos camundongos LDLR0 controles, tratados durante 2 semanas com Vimang® ou antioxidantes (vitamina E, β-caroteno e vitamina C) e alimentados com dieta rica em colesterol na segunda semana.

Parâmetros	Controle	Vimang®	Antioxidantes
Corpo (g)	23,2 ± 0,7	24,4 ± 0,6	23,3 ± 0,6
Tecido Adiposo Visceral			
%	2,36 ± 0,30	2,58 ± 0,19	2,33 ± 0,20
mg	566 ± 82	638 ± 59	544 ± 51
Fígado (%)	4,39 ± 0,13	4,48 ± 0,11	4,54 ± 0,12
Baço (%)	0,21 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,21 ± 0,01
COL hepático (mg/g)	5,3 ± 0,3	4,26 ± 0,14*	4,32 ± 0,19*
TG hepático (mg/g)	47,6 ± 3,8	42,2 ± 3,5	43,7 ± 4,3

Média ± epm (n = 9-10). Vimang® e os antioxidantes foram adicionados à ração (Vimang® 250 mg/Kg de peso corpóreo por dia) e (antioxidantes: vitamina E 200 mg/Kg, β caroteno 1000 mg/Kg e ácido ascórbico 100 mg/Kg de peso corpóreo por dia). *p<0,05 versus controle.

Tab. 6: Concentrações plasmáticas de glicose, lipídeos, TBARS, anticorpos anti-LDL oxidada e marcadores de função renal e hepática dos camundongos LDLR0 controles, tratados durante 2 semanas com Vimang® ou antioxidantes (vitamina E, β -caroteno e vitamina C) e alimentados com dieta rica em colesterol na segunda semana.

Parâmetros	Controle	Vimang®	Antioxidantes
Glicose (mg/dL)	76,5 $\pm$ 4,1	80,7 $\pm$ 2,7	81,8 $\pm$ 3,4
Triglicérides (mg/dL)	181,6 $\pm$ 21	175,5 $\pm$ 13,1	166,8 $\pm$ 21,1
Colesterol (mg/dL)	738,7 $\pm$ 34,6	628,8 $\pm$ 25,3*	642,1 $\pm$ 49,2
Anti-LDLox (Abs a 450 nm)	0,25 $\pm$ 0,04	0,44 $\pm$ 0,04 [#]	0,28 $\pm$ 0,04
TBARS (μ mol/L)	491,8 $\pm$ 27,5	491,4 $\pm$ 16	377,5 $\pm$ 26,2 ^{&}
ALT (U/L)	48,8 $\pm$ 5,3	54,4 $\pm$ 9,4	45,9 $\pm$ 6,6
ALP (U/L)	88,2 $\pm$ 6,5	81,6 $\pm$ 2,6	85,4 $\pm$ 3,6
AST (U/L)	127,5 $\pm$ 11,2	129 $\pm$ 10,7	125,4 $\pm$ 14,4
Uréia (mg/dL)	71,4 $\pm$ 1,9	72,2 $\pm$ 2,9	73,1 $\pm$ 2,9
Creatinina (mg/dL)	0,09 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01

Média $\pm$ epm (n = 9-10). ALT: alanina aminotransferase, ALP- fosfatase alcalina, AST, aspartato aminotransferase. Vimang® e os antioxidantes foram adicionados à ração (Vimang® 250 mg/Kg de peso corpóreo por dia) e (antioxidantes: vitamina E 200 mg/Kg, β caroteno 1000 mg/Kg e ácido ascórbico 100 mg/Kg de peso corpóreo por dia). * P< 0,05 em relação ao controle, # P< 0,05 em relação ao controle e antioxidantes e & P< 0,05 em relação ao controle e Vimang®.

Tab. 7: Velocidade de geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de oxidação de nucleotídeos de piridina em mitocôndrias isoladas de fígado e produção de EROS em células linfomonocitárias de baço dos camundongos LDLR0 controles, tratados durante 2 semanas com Vimang® ou antioxidantes (vitamina E, β -caroteno e vitamina C), e alimentados com dieta rica em colesterol na segunda semana.

Parâmetros/Tratamento	Controle	Vimang	Antioxidantes
EROS-mitocondrial hepático (η mol DCF/mg/min)	2,65 $\pm$ 0,35	2,7 $\pm$ 0,42	2,5 $\pm$ 0,7
Oxidação de NADPH mitochondrial hepático (η mol NADPH/mg/min)	1,66 $\pm$ 0,1	1,75 $\pm$ 0,11	1,67 $\pm$ 0,16
EROS- células linfomonocitárias (η mol DCF/10 ⁶ células/min)	111,8 $\pm$ 25	68,5 $\pm$ 3,7	80 $\pm$ 13,3

Média $\pm$ epm (n = 4-7). Vimang® e os antioxidantes foram adicionados à ração (Vimang® 250 mg/Kg de peso corpóreo por dia) e (antioxidantes: vitamina E 200 mg/Kg, β caroteno 1000 mg/Kg e ácido ascórbico 100 mg/Kg de peso corpóreo por dia).

Tab. 8: Parâmetros corporais dos camundongos LDLR0 controles, tratados durante 3 meses com Vimang® ou antioxidantes (vitamina E, β-caroteno e vitamina C).

Parâmetros	Controle	Vimang®	Antioxidantes
Corpo (g)	21,6 ± 0,6	21,1 ± 0,5	20,9 ± 0,7
Tec. Adiposo Visceral			
%	1,94 ± 0,30	2,06 ± 0,20	1,85 ± 0,20
mg	434 ± 71	446 ± 60	400 ± 66
Fígado (%)	4,88 ± 0,20	5,20 ± 0,20	4,99 ± 0,17
Baço (%)	0,34 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,37 ± 0,03
COL hepático (mg/g)	4,0 ± 0,32	4,1 ± 0,30	4,2 ± 0,30
TG hepático (mg/g)	28,7 ± 1,60	26,7 ± 1,8	30,8 ± 2,50

Média ± epm (n = 9-11). Vimang® e os antioxidantes foram adicionados à ração (Vimang® 250 mg/Kg de peso corpóreo por dia) e (antioxidantes: vitamina E 200 mg/Kg, β caroteno 1000 mg/Kg e ácido ascórbico 100 mg/Kg de peso corpóreo por dia).

Tab. 9: Concentrações plasmáticas de glicose, lipídeos, TBARS, anticorpos anti-LDL oxidada e marcadores de função renal e hepática dos camundongos LDLR0 controles, tratados durante 3 meses com Vimang® ou antioxidantes (vitamina E, β-caroteno e vitamina C).

Parâmetros	Controle	Vimang®	Antioxidantes
Glicose (mg/dL)	77 ± 4,8	67,7 ± 5,0	76,9 ± 2,8
Triglicérides (mg/dL)	107,8 ± 14,2	142,5 ± 17,1	102,6 ± 14,4
Colesterol (mg/dL)	377,7 ± 23,9	412,8 ± 14,3*	352,7 ± 22,5
Anti-LDLox (ABS)	0,61 ± 0,07	0,55 ± 0,09	0,58 ± 0,07
TBARS (μmol/L)	293,7 ± 11,5	313,1 ± 11,3*	275,5 ± 9,7
ALT (U/L)	52,6 ± 7,9	40,6 ± 3,8	53,5 ± 8,7
ALP (U/L)	96,2 ± 7	94,6 ± 4,4	106 ± 3,6
AST (U/L)	143 ± 11,1	119,5 ± 8,4	128 ± 19,5
Uréia (mg/dL)	62,2 ± 3,3	60,4 ± 2,8	60,5 ± 4,2
Creatinina (mg/dL)	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01

Média ± epm (n = 9-11). ALT: alanina aminotransferase, ALP- fosfatase alcalina, AST, aspartato aminotransferase. Vimang® e os antioxidantes foram adicionados à ração (Vimang® 250 mg/Kg de peso corpóreo por dia) e (antioxidantes: vitamina E 200 mg/Kg, β caroteno 1000 mg/Kg e ácido ascórbico 100 mg/Kg de peso corpóreo por dia). *P< 0,05 em relação aos antioxidantes

Tab. 10: Velocidade de geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de oxidação de nucleotídeos de piridina em mitocôndrias isoladas de fígado e produção de EROS em células linfomonocitárias de baço dos camundongos LDLR0 controles, tratados durante 3 meses com Vimang® ou antioxidantes (vitamina E, β-caroteno e vitamina C).

Parâmetros	Controle	Vimang	Antioxidantes
EROS-mitocondrial hepático (ηmol DCF/mg/min)	2,59 ± 0,50	2,57 ± 0,46	2,47 ± 0,17
Oxidação de NADPH mitochondrial hepático (ηmol NADPH/mg/min)	1,29 ± 0,08	1,29 ± 0,10	1,08 ± 0,24
EROS- células linfomonocitárias (ηmol DCF/10 ⁶ células/min)	207 ± 70	122 ± 22	123 ± 26

Média ± epm (n = 6). Vimang® e os antioxidantes foram adicionados à ração (Vimang® 250 mg/Kg de peso corpóreo por dia) e (antioxidantes: vitamina E 200 mg/Kg, β caroteno 1000 mg/Kg e ácido ascórbico 100 mg/Kg de peso corpóreo por dia).

Tab. 11: Correlações univariadas (Spearman, r) entre área de lesão aterosclerótica da raiz da aorta e parâmetros plasmáticos e mitocondriais dos camundongos LDLR0 tratados com citrato e/ou pravastatina e com Vimang® ou antioxidantes.

Estudo	Variáveis significantes	n	r	p
Citrato	Colesterol	28	0,36	0,06
	Triglicérides	28	0,41	0,03
	EROS mitocondrial	16	0,57	0,02
	ALP	26	0,45	0,02
Vimang®	Colesterol	25	0,57	0,003
	Triglicérides	26	0,53	0,006
Citrato + Vimang®	Colesterol	53	0,80	<0,0001
	Triglicérides	54	0,29	0,03
	TBARS	50	0,58	<0,0001
	EROS mitocondrial	32	0,57	0,02
	Oxidação de NADPH mitocondrial	32	0,53	0,002

EstudoCitrato: Camundongos LDLR0 fêmeas controles (água), tratados com citrato, pravastatina e citrato+pravastatina durante 3 meses a partir do desmame. O Citrato foi adicionado à água de beber (1.34 mM de ácido cítrico + 1.1 mM citrato de sódio). Pravastatina foi diluída na água de beber equivalente a 10 mg/Kg peso corpóreo (consumo diário de água de 3 ml/dia). **Estudo Vimang:** Camundongos LDLR0 fêmeas controles (AIN-93G), tratados com Vimang® ou antioxidantes (vitamina E, β-caroteno e vitamina C) durante 3 meses a partir do desmame. Vimang® e os antioxidantes foram adicionados à ração (Vimang® 250 mg/Kg de peso corpóreo por dia) e (antioxidantes: vitamina E 200 mg/Kg, β caroteno 1000 mg/Kg e ácido ascórbico 100 mg/Kg de peso corpóreo por dia). ALP: Fosfatase alcalina

Tab. 12: Correlação parcial (ajustada por colesterol e triglicérides plasmáticos) entre área de lesão aterosclerótica da raiz da aorta e a concentração plasmática de TBARS, ALT, ALP, a produção de EROS e oxidação de NADPH mitocondrial no fígado dos camundongos LDLR0 tratados com citrato, pravastatina, Vimang® ou antioxidantes.

Estudos	Variáveis significantes	r	P
Citrato	EROS mitocondrial	0,84	0,009
Vimang®	Oxidação de NADPH mitocondrial	0,63	0,03
Citrato + Vimang®	ALT	0,40	0,05
	Oxidação de NADPH mitocondrial	0,46	0,03

EstudoCitrato: Camundongos LDLR0 fêmeas controles (água), tratados com citrato, pravastatina e citrato+pravastatina durante 3 meses a partir do desmame. O Citrato foi adicionado à água de beber (1.34 mM de ácido cítrico + 1.1 mM citrato de sódio). Pravastatina foi diluída na água de beber equivalente a 10 mg/Kg peso corpóreo (consumo diário de água de 3 ml/dia). **Estudo Vimang®:** Camundongos LDLR0 fêmeas controles (AIN-93G), tratados com Vimang® ou antioxidantes (vitamina E, β-caroteno e vitamina C) durante 3 meses a partir do desmame. Vimang® e os antioxidantes foram adicionados à ração (Vimang® 250 mg/Kg de peso corpóreo por dia) e (antioxidantes: vitamina E 200 mg/Kg, β caroteno 1000 mg/Kg e ácido ascórbico 100 mg/Kg de peso corpóreo por dia). ALT: Alanina aminotransferase.

Tab. 13: Coeficiente de determinação (r^2 , regressão linear multivariada) das variáveis independentes (concentração plasmática de colesterol, triglicérides, TBARS, ALT, ALP, a produção de EROS e oxidação de NADPH mitocondrial no fígado) sobre a área de lesão aterosclerótica da raiz da aorta (variável dependente) em camundongos LDLR0 tratados com citrato, pravastatina, Vimang® ou antioxidantes.

Estudo	Variáveis significantes (P)	P	r^2 cumulativo
Citrato	COL (0,03) TG (0,02) EROS mitocondrial (0,02)	0,01	0,99
Vimang®	N.S.	0,21	0,87
Citrato + Vimang®	COL (0,02)	0,002	0,80

EstudoCitrato: Camundongos LDLR0 fêmeas controles (água), tratados com citrato, pravastatina e citrato+pravastatina durante 3 meses a partir do desmame. O Citrato foi adicionado à água de beber (1.34 mM de ácido cítrico + 1.1 mM citrato de sódio). Pravastatina foi diluída na água de beber equivalente a 10 mg/Kg peso corpóreo (consumo diário de água de 3 ml/dia). **Estudo Vimang®:** Camundongos LDLR0 fêmeas controles (AIN-93G), tratados com Vimang® ou antioxidantes (vitamina E, β -caroteno e vitamina C) durante 3 meses a partir do desmame. Vimang® e os antioxidantes foram adicionados à ração (Vimang® 250 mg/Kg de peso corpóreo por dia) e (antioxidantes: vitamina E 200 mg/Kg, β caroteno 1000 mg/Kg e ácido ascórbico 100 mg/Kg de peso corpóreo por dia). COL: Colesterol, TG: Triglicérides, ALT: Alanina aminotransferase, ALP: Fosfatase alcalina.

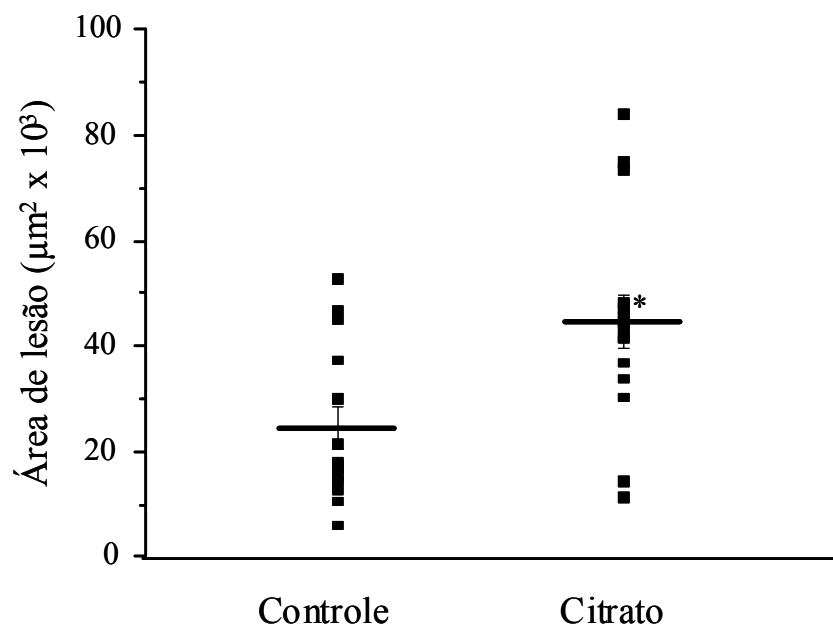


Figura 1: Área de lesão aterosclerótica na raiz da aorta de camundongos LDLR0 controles e tratados por 2 semanas com citrato. Média $\pm$ epm (n = 14-15). Dieta contém 1.5 g% de colesterol adicionado à dieta chow (4 g% de gordura). Citrato foi adicionado à água de beber (67 mM de ácido cítrico + 55 mM citrato de sódio). * P < 0,05 em relação aos controles.

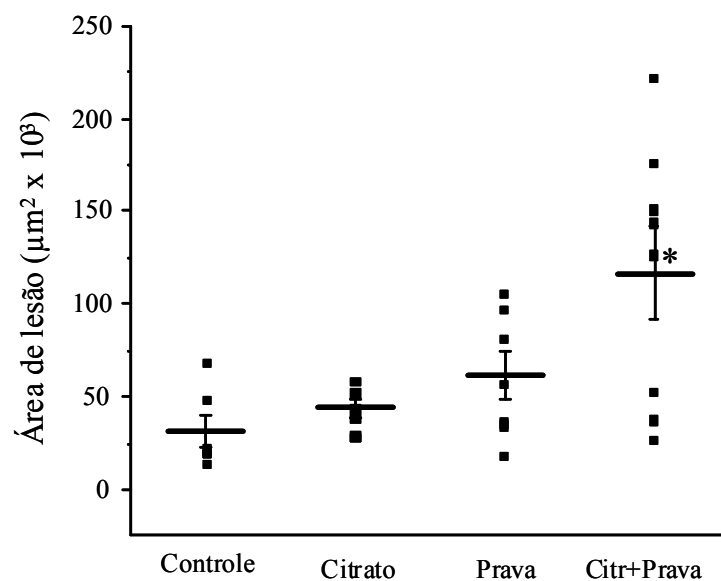


Figura 2: Área de lesão aterosclerótica na raiz da aorta de camundongos LDLR0 controles e tratados com citrato, pravastatina (prava) citrato+pravastatina (citr+prava) durante 3 meses. Citrato foi adicionado à água de beber (1.34 mM de ácido cítrico + 1.1 mM citrato de sódio). Pravastatina foi diluída na água de beber equivalente a 10mg/Kg peso corpóreo (consumo diário de água de 3 ml/dia). * $P < 0,05$ em relação aos controles e tratados com citrato. Média $\pm$ epm (n = 6-7)

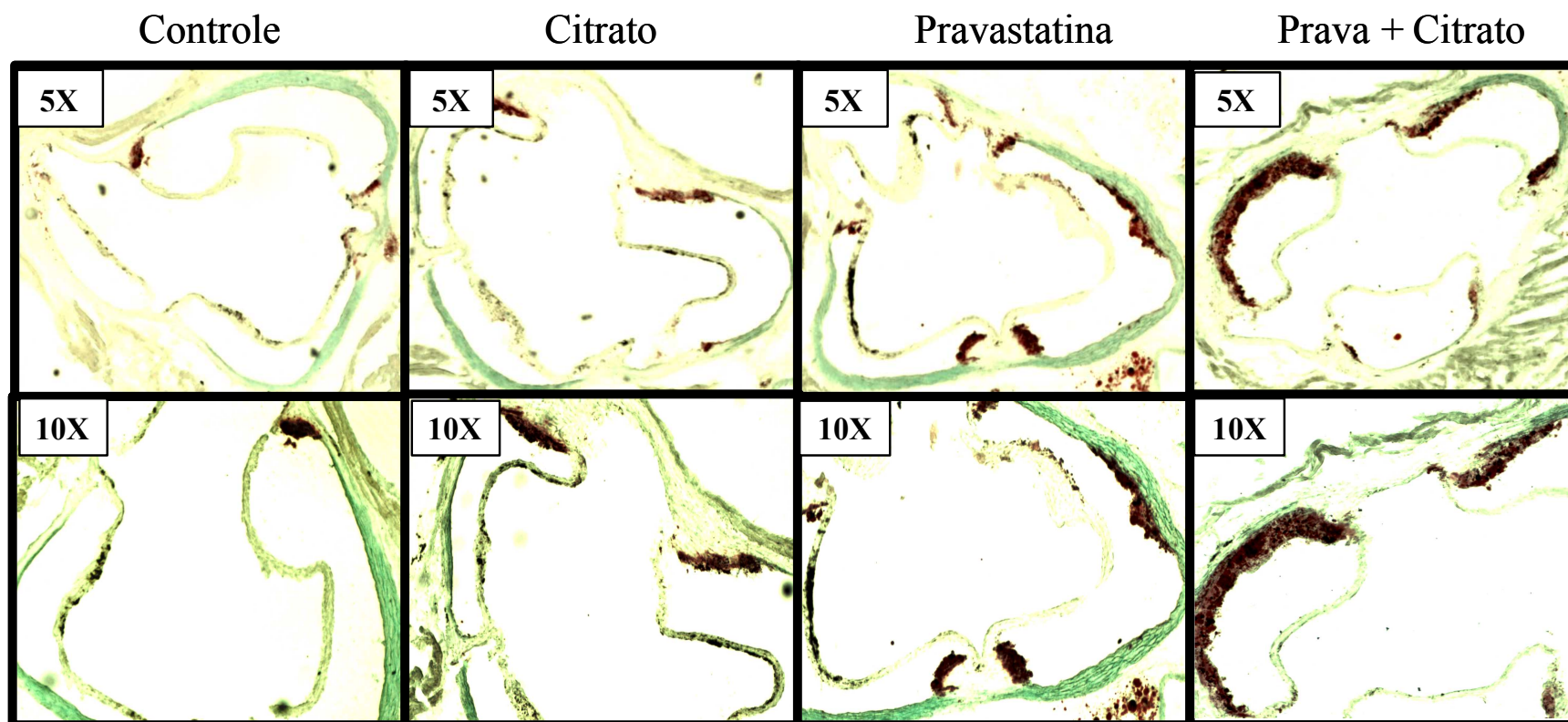


Figura 3: Fotografia com aumento de 5 vezes e 10 vezes da raiz da aorta de camundongos LDLR0 controle, tratado com citrato, tratado com pravastatina e tratado com citrato/pravastatina durante 3 meses. As lesões de aterosclerose foram coradas com oil red e estão representadas na parede interna da aorta. Citrato foi adicionado à água de beber (1.34 mM de ácido cítrico + 1.1 mM citrato de sódio). Pravastatina foi diluída na água de beber equivalente a 10mg/Kg peso corpóreo (consumo diário de água de 3 ml/dia).

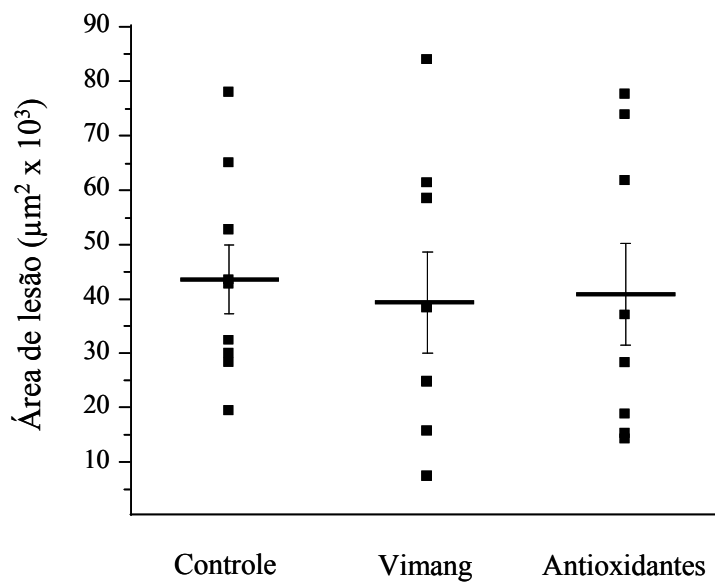


Figura 4: Área de lesão aterosclerótica na raiz da aorta de camundongos LDLR0 controles, tratados durante 2 semanas com Vimang® e antioxidantes (vitamina E, β-caroteno e vitamina C), e alimentados com dieta rica em colesterol na segunda semana. Vimang® e os antioxidantes foram adicionados à ração (Vimang® 250 mg/Kg de peso corpóreo por dia) e (antioxidantes: vitamina E 200 mg/Kg, β caroteno 1000 mg/Kg e ácido ascórbico 100 mg/Kg de peso corpóreo por dia). Média ± epm (n = 8-9)

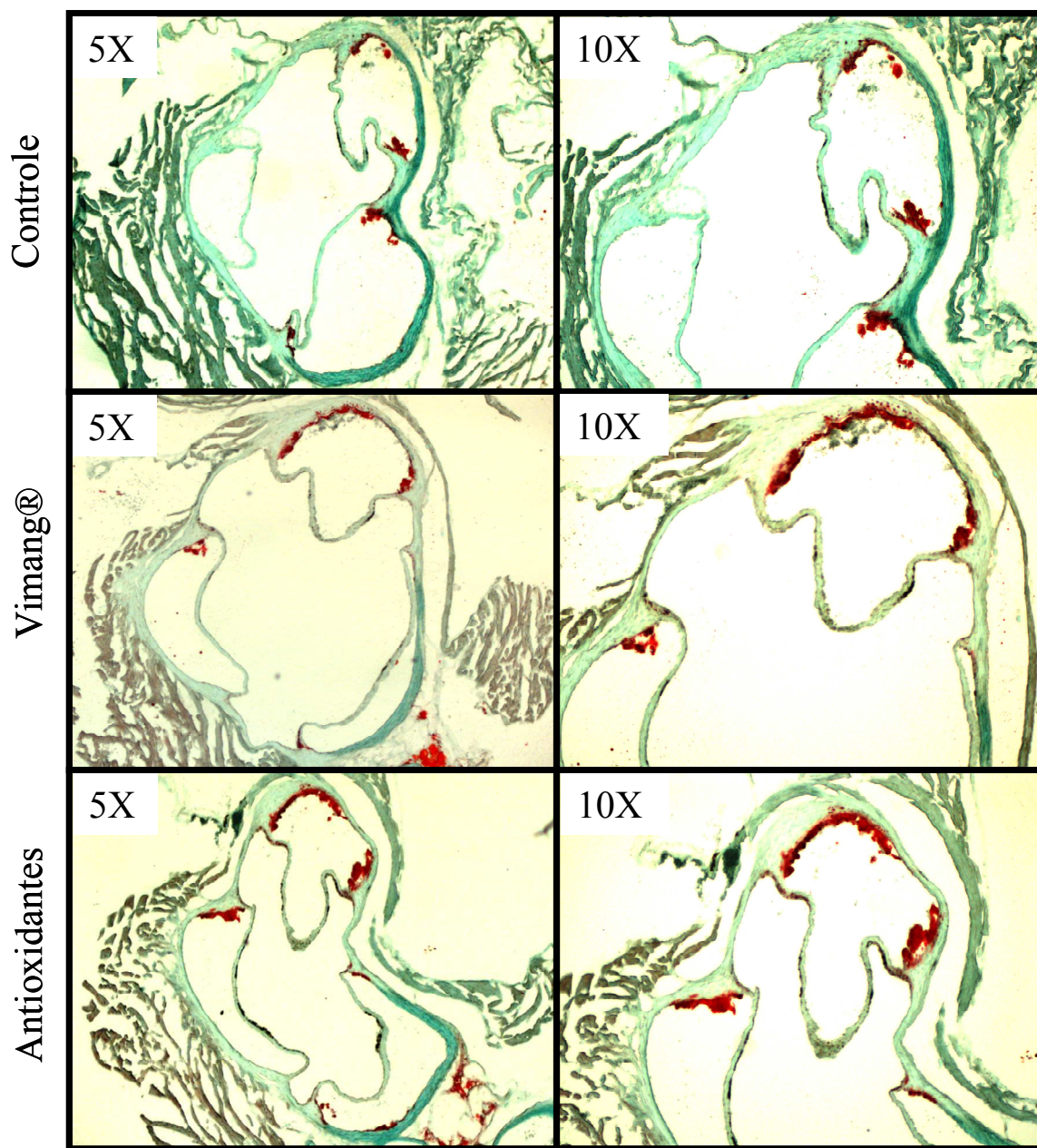


Figura 5: Fotografia com aumento de 5 vezes e 10 vezes da raiz da aorta de camundongos LDLR0 controle, tratado durante 2 semanas com vimang® e antioxidantes (vitamina E, β -caroteno e vitamina C), e alimentados com dieta rica em colesterol na segunda semana. As lesões de aterosclerose foram coradas com oil red e estão representadas na parede interna da aorta. Vimang® e os antioxidantes foram adicionados à ração (Vimang® 250 mg/Kg de peso corpóreo por dia) e (antioxidantes: vitamina E 200 mg/Kg, β caroteno 1000 mg/Kg e ácido ascórbico 100 mg/Kg de peso corpóreo por dia).

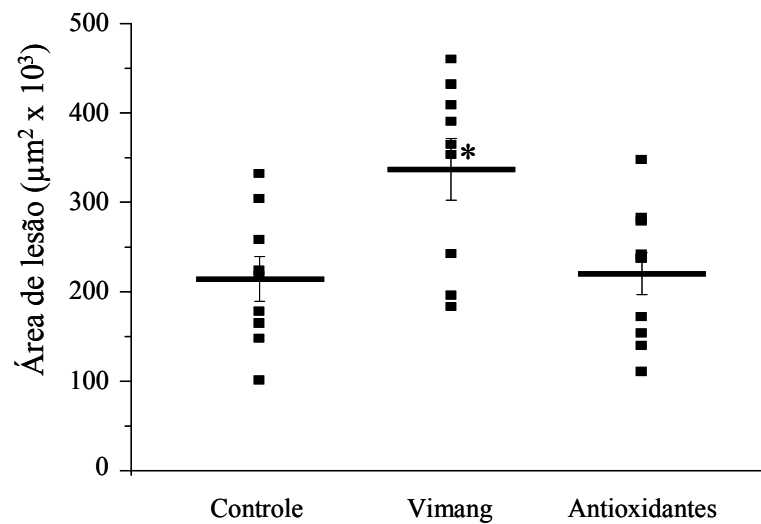


Figura 6: Área de lesão aterosclerótica na raiz da aorta de camundongos LDLR0 controles, tratados durante 3 meses com Vimang® e antioxidantes (vitamina E, β -caroteno e vitamina C). Vimang® e os antioxidantes foram adicionados à ração (Vimang® 250 mg/Kg de peso corpóreo por dia) e (antioxidantes: vitamina E 200 mg/Kg, β caroteno 1000 mg/Kg e ácido ascórbico 100 mg/Kg de peso corpóreo por dia). * $P < 0,05$ em relação aos controles e antioxidantes, Média $\pm$ epm (n = 9-10)

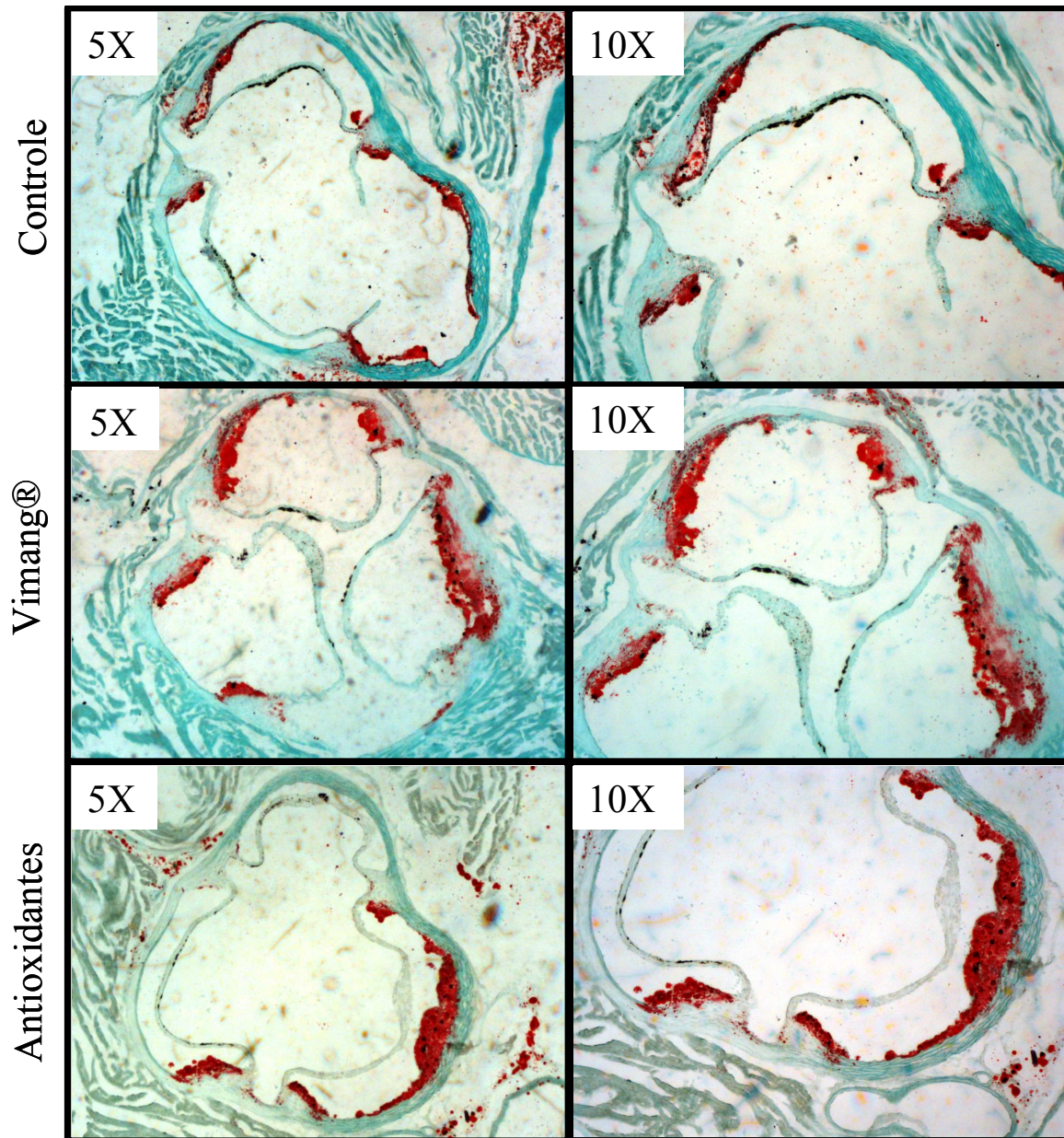


Figura 7: Fotografia com aumento de 5 vezes e 10 vezes da raiz da aorta de camundongos LDLR0 controle, tratado durante 3 meses com vimang® e antioxidantes (vitamina E, β -caroteno e vitamina C). As lesões de aterosclerose foram coradas com oil red e estão representadas na parede interna da aorta. Vimang® e os antioxidantes foram adicionados à ração (Vimang® 250 mg/Kg de peso corpóreo por dia) e (antioxidantes: vitamina E 200 mg/Kg, β caroteno 1000 mg/Kg e ácido ascórbico 100 mg/Kg de peso corpóreo por dia).

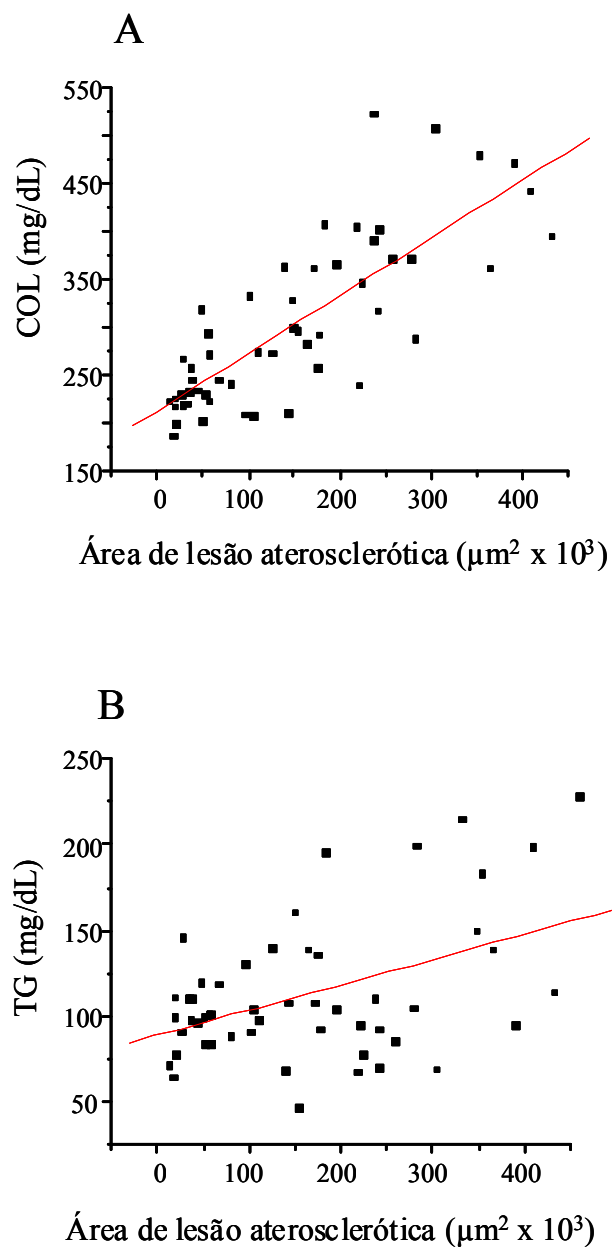


Figura 8: Correlação entre área de lesão da raiz da aorta e a concentração de colesterol (Painel A, $R=0,80$, $P<0,0001$) e triglicérides plasmático (Painel B, $R=0,29$, $P=0,03$) em camundongos LDLR0 provenientes de dois estudos: Efeito da reposição de substratos e inibição da esteroidogênese e efeito antioxidante do Vimang®, sobre o desenvolvimento espontâneo da aterosclerose.

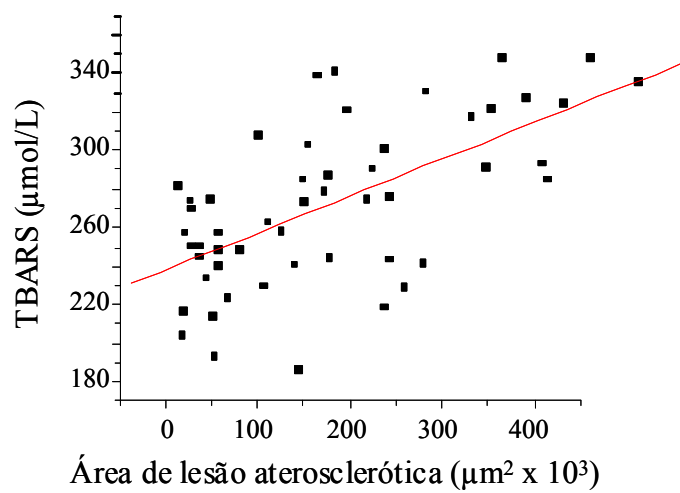


Figura 9: Correlação entre área de lesão da raiz da aorta e a concentração de TBARS plasmáticos ($R=0,58$, $P<0,0001$) em camundongos LDLR0 provenientes de dois estudos: Efeito da reposição de substratos e inibição da esteroidogênese e efeito antioxidante do Vimang®, sobre o desenvolvimento espontâneo da aterosclerose.

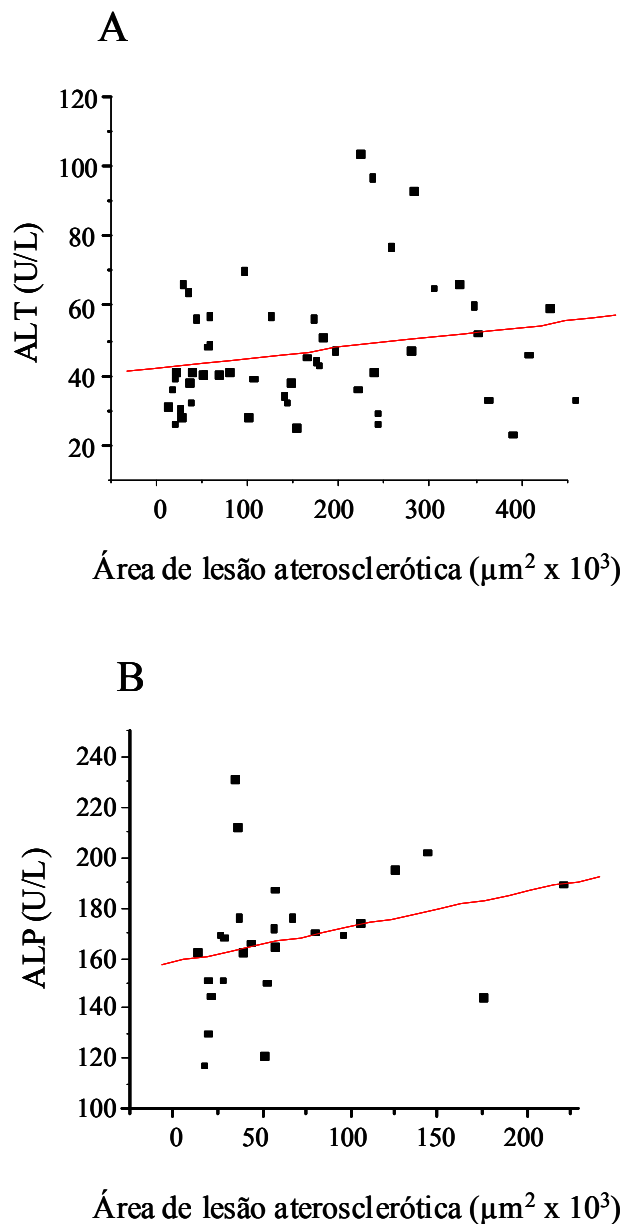


Figura 10: Correlação entre área de lesão da raiz da aorta e a concentração plasmática de alanina aminotransferase (Painel A, ALT, $R = 0,36$, $P = 0,07$) e com fosfatase alcalina (Painel B, ALP, $R = 0,45$, $P = 0,02$) no plasma dos camundongos LDLR0. (Painel A) animais provenientes de dois estudos: Efeito da reposição de substratos e inibição da esteroidogênese e efeito antioxidante do Vimang® sobre o desenvolvimento espontâneo da aterosclerose. Painel B animais provenientes apenas do estudo do efeito da reposição de substratos e inibição da esteroidogênese, pois as concentrações médias de ALP entre os dois estudos foram muito diferentes.

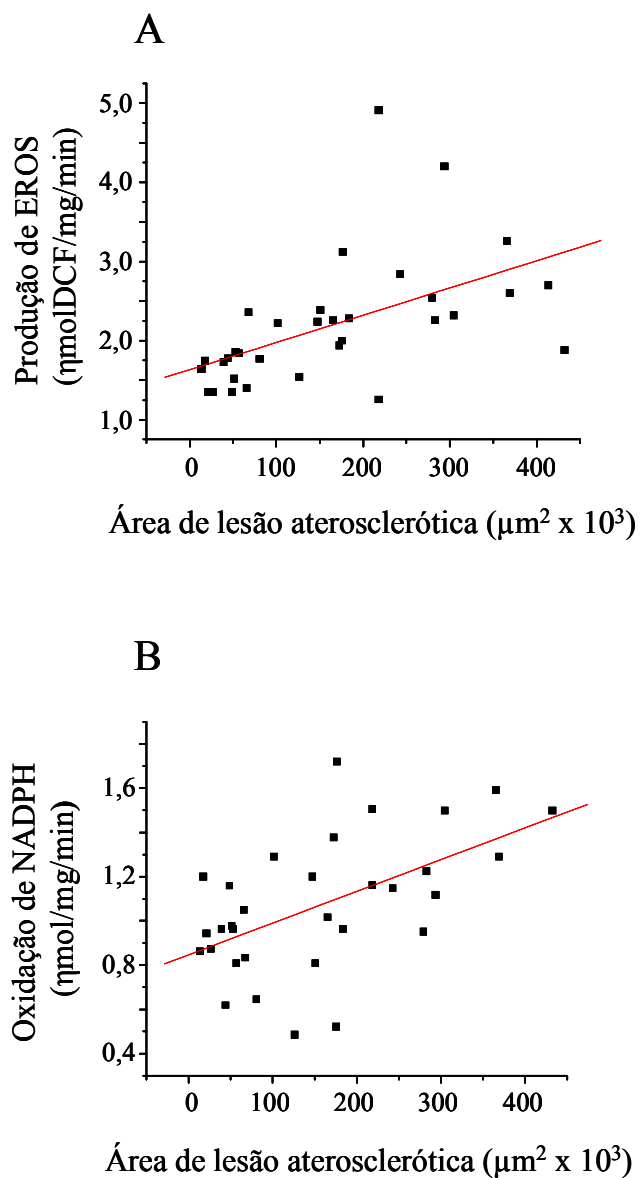


Figura 11: Correlação positiva entre área de lesão da raiz da aorta com produção de EROS (Painel A, $R=0,72$, $P<0,0001$) e oxidação de NADPH (Painel B, $R=0,53$, $P=0,002$) em mitocôndrias de fígados dos camundongos LDLR0 provenientes de dois estudos: Efeito da reposição de substratos e inibição da esteroidogênese e efeito antioxidante do Vimang®, sobre o desenvolvimento espontâneo da aterosclerose.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada *Efeito do tratamento com citrato e vimang sobre a aterosclerose experimental em camundongos hipercolesterolêmicos deficientes de receptor de LDL:*

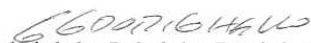
() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

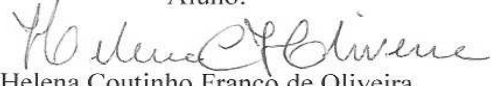
(X) está inserido no **Projeto CIBio/IB/UNICAMP** (Protocolo nº 2008/02), intitulado Repercussão de modificações da expressão de proteínas envolvidas no transporte de lípidos sobre o metabolismo de lípidos e carboidratos, estresse oxidativo e adiposidade e camundongos geneticamente modificados

(X) tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP** (Protocolo nº 1101-2); aprovado 04/10/06

() tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº _____);

() tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.
Especificar: _____


Gabriel de Gabriel e Dorighello
Aluno:


Helena Coutinho Franco de Oliveira
Orientador:

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Nome: _____
Função: _____



Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEa/IB - UNICAMP

Profa. Dra. HELENACOUTINHO F. DE OLIVEIRA
Presidente
Comissão Interna de Biossegurança
CIBio/IB - UNICAMP



**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP**

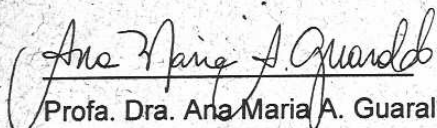
CERTIFICADO

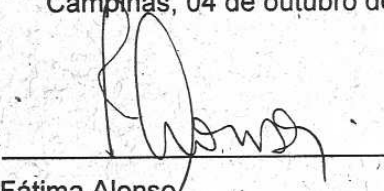
Certificamos que o Protocolo nº 1101-2, sobre "**ATEROSCLEROSE E ADIPOSIDADE EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES DO RECEPTOR DE LDL**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira / Gabriel de Gabriel e Dorighello**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em 04 de outubro de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1101-2, entitled "**ATHEROSCLEROSIS AND ADIPOSITY IN LDL RECEPTOR- DEFICIENT MICE**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on October 4, 2006.

Campinas, 04 de outubro de 2006.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva



UNICAMP

Of. CIBio/IB 06/2008

Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
26 de maio de 2008.

Prof. Dr. EVERARDO MAGALHÃES CARNEIRO
Chefe do Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Biologia
Unicamp

Prezado Professor:

Informamos que o projeto abaixo relacionado, envolvendo OGM do tipo I, sob responsabilidade da **Profa. Dra. Helena C. F. Oliveira**, protocolado sob o número **2008/02**, foi aprovado pela CIBio-IB/Unicamp em Reunião Ordinária realizada no dia 26 de maio de 2008 e para ser desenvolvido nas dependências do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Unicamp:

No. Projeto (data da aprovação)	Data de recepção	Nome do Projeto	Prazo para envio de relatório à CIBio
CIBio 2008/02 (26/05/2008)	22/04/2008	Repercussão de modificações da expressão de proteínas envolvidas no transporte de lípidos sobre o metabolismo de lípidos e carboidratos, estresse oxidativo e adiposidade em camundongos geneticamente modificados	Fevereiro de 2009 (ref. período 1/1/2008 a 31/12/2008)

Recomendamos que sejam observadas as instruções normativas referentes a transporte e contenção da OGMs, disponíveis na webpage da CTNBio <www.ctnbio.gov.br>.

Atenciosamente,

Cordiais Saudações,


Profa. Dra. **MARIA SILVIA VICCARI GATTI**
CIBio/IB-Unicamp

CÓPIA

Cópias: *Profa. Dra. Helena C. F. Oliveira*