

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

Gianni Mancini

**A HIPERCOLESTEROLEMIA E O ENVELHECIMENTO
COMO MODULADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM
MODELO DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Dra. Andreza Fabro de Bem
Departamento de Bioquímica

FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mancini, Gianni

A HIPERCOLESTEROLEMIA E O ENVELHECIMENTO COMO
MODULADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO DE
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR / Gianni Mancini ;
orientadora, Andreza Fabro de Bem - Florianópolis, SC,
2013.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Hipercolesterolemia. 3. Estresse
Oxidativo. 4. Glutathiona. 5. Difenil disseleneto. I. Fabro
de Bem, Andreza . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha família. Principalmente ao meu pai Ivo Mancini (*in memoriam*) e à minha mãe Elizabeth Lemos Mancini por terem me ensinado a viver, e pelo incentivo, o tempo todo, para seguir meus ideais.

À minha avó Ceci Rocha de Lemos e ao meu avô João Benedito Lemos (*in memoriam*), por terem também me incentivado para seguir minha carreira e todo apoio possível.

Ao meu Tio Elder Rocha Lemos, que me serve de inspiração pela sua dedicação ao trabalho e aos estudos, além de, ser meu principal incentivador.

À minha esposa, mulher e companheira Maria de Lourdes Gomes da Silva, pela paciência, compreensão e amor durante todo os estudos.

À minha irmã Anna Mancini e seu marido Roberto, por fazerem parte de minha família e me acompanharem nessa trajetória.

Um agradecimento especial à minha orientadora prof.^a Dra. Andreza Fabro de Bem, pelo seu exemplo de profissionalismo e amor ao trabalho. Por todo momento junto, incentivando, apoiando, compreendendo e principalmente ensinando.

À minha co-orientadora, prof.^a Dra. Alexandra Latini, pelo apoio e conhecimentos repassados durante todo o mestrado e toda a iniciação científica.

Ao prof. Dr. Marcelo Farina, por ter me apresentado à pesquisa científica, pela amizade, aprendizado e conhecimento.

À prof.^a Dra. Rosa Maria Ribeiro-do-Valle, pela importante colaboração na realização deste trabalho.

Aos colegas que participaram ativamente neste trabalho, Eduardo, Jade, Mari e Marcos, pela amizade, aprendizado e auxílio durante a realização deste trabalho. Em especial à Jade pela parceria, apoio e incentivo durante todo o meu mestrado.

Aos grandes amigos Wagner, Fritz, Paulo, Adalba e Tchola que conheci e compartilham grandes momentos e ficaram para sempre.

Aos colegas do Laboratório Aline, Karina, Roberta, Viviane, Ana Júlia Alessandra, Danubia, Bianca, Dirleise, Luciana e demais colegas, pela amizade e companheirismo.

Aos técnicos do LAMEB, Bibiana e Denis, pela amizade, disponibilidade e auxílio na utilização de equipamentos.

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

Aos professores do curso de Pós-graduação em Bioquímica, pelos conhecimentos e exemplos passados durante o mestrado.

À CAPES, CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro.

A todos os amigos, que direta ou indiretamente participaram nesta fase da minha vida, meu muito obrigado.

RESUMO

A hipercolesterolemia, principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, é uma condição que afeta 1 a cada 20 indivíduos e é comum a muitas doenças graves como a doença do fígado gorduroso não alcoólica e demência. Estresse oxidativo e disfunção mitocondrial estão relacionados com os níveis altos de colesterol plasmático e são processos chave na fisiopatologia de doenças relacionadas à hipercolesterolemia. Camundongos deficientes para o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr^{-/-}) são um ótimo modelo para o estudo da hipercolesterolemia, suas consequências e sequelas. Neste contexto, nosso objetivo primeiramente foi avaliar o efeito de hipercolesterolemia e do envelhecimento, um fator de risco inalterado para doenças crônicas, sobre os parâmetros de estresse oxidativo no sistema cardiovascular e tecido hepático de camundongos C57BL/6 e LDLr^{-/-}. Ademais, avaliamos os possíveis mecanismos do efeito antiaterogênico do disseleneto de difenila (PhSe)₂ no sistema cardiovascular em camundongos LDLr^{-/-}. Além disso, foi avaliado o efeito de uma dieta rica em colesterol nos parâmetros de estresse oxidativo e função mitocondrial em camundongos C57BL/6 e LDLr^{-/-}. Quanto ao sistema cardiovascular, os camundongos LDLr^{-/-} apresentaram menor conteúdo de glutatona reduzida (GSH) na aorta, e isso foi correlacionado com os altos níveis de colesterol plasmático. Já o tratamento com (PhSe)₂ provocou uma melhora no ambiente redox no sistema cardiovascular pelo aumento no conteúdo de GSH nos animais velhos, aumento na atividade da glutatona redutase (GR) e da tioredoxina redutase (TrxR), além de, diminuir a peroxidação lipídica no coração de camundongos LDLr^{-/-} jovens. Quanto à aorta, o (PhSe)₂ aumentou a atividade da glutatona peroxidase (GPx) nos jovens e velhos e a GR somente nos camundongos LDLr^{-/-} velhos. No tecido hepático, foi observado um efeito da hipercolesterolemia nos parâmetros de estresse oxidativo e função mitocondrial, o conteúdo de GSH e a atividade da GR foram diminuídas no grupo LDLr^{-/-}. Além disso, a peroxidação lipídica e o acúmulo de lipídios no fígado foram maiores no grupo LDLr^{-/-}. Este estado de estresse oxidativo foi ainda mais acentuado quando esses camundongos LDLr^{-/-} receberam uma dieta rica em colesterol. Esses dados estão fortemente correlacionados com os níveis plasmáticos de colesterol. O envelhecimento diminuiu o conteúdo de GSH e aumentou a peroxidação lipídica na fração citoplasmática de fígado de camundongos LDLr^{-/-}. Já na fração mitocondrial desse tecido o envelhecimento causou a diminuição da GR e aumentou da

peroxidação lipídica. Quanto a função mitocondrial, a dieta rica em colesterol causou uma diminuição no complexo I da cadeia respiratória no tecido hepático e o envelhecimento induziu a uma diminuição no complexo II no fígado de camundongos LDLr^{-/-}. Tomados em conjunto, esses resultados colocam a hipercolesterolemia como forte indutor ao estresse oxidativo e disfunção mitocondrial no sistema cardiovascular e no tecido hepático de camundongos LDLr^{-/-}, e esse efeito pode ser ainda mais acentuado se esses animais receberem uma dieta rica em colesterol. Além do mais, o tratamento com (PhSe)₂ parece modular o sistema antioxidante relacionado a GSH e a tioredoxina, favorecendo o ambiente redox celular.

Palavras-chave: colesterol, hipercolesterolemia, envelhecimento, estresse oxidativo, disseleneto de difenila, glutatona, tioredoxina

ABSTRACT

Hypercholesterolemia, the main risk factor for developing of cardiovascular disease, is a condition that one in every twenty individuals are affected and is common to many severe diseases such as non-alcoholic fatty liver disease and dementia. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction are associated with high plasma cholesterol levels and are common conditions in the pathophysiology of diseases related to hypercholesterolemia. Low-density lipoprotein receptor deficient mice ($LDLr^{-/-}$) are a very good model to study hypercholesterolemia, their consequences and sequelae. In this context, our first objective was to evaluate the effect of hypercholesterolemia and aging, a risk factor unchanged, in oxidative stress parameters of the cardiovascular system and liver tissue of C57BL/6 and $LDLr^{-/-}$. Furthermore, we evaluated the possible mechanisms of the antiatherogenic effect of diphenyl diselenide ($PhSe_2$) in the cardiovascular system of $LDLr^{-/-}$ mice. In addition, we evaluated the effect of high cholesterol diet on parameters of mitochondrial function and oxidative stress in C57BL/6 and $LDLr^{-/-}$. In the cardiovascular system, the $LDLr^{-/-}$ mice had lower glutathione (GSH) levels in the aorta, and this was correlated with high plasma cholesterol levels. The treatment with ($PhSe_2$) improved the redox environment of the cardiovascular system by increase of GSH levels in middle-aged animals, increased activity of glutathione reductase (GR) and thioredoxin reductase (TrxR), besides, to reduce lipid peroxidation in the heart of young $LDLr^{-/-}$ mice. In the aorta, ($PhSe_2$) increased the GPx activity in young and middle-aged mice and increase GR activity only in middle-aged $LDLr^{-/-}$. In liver tissue, we observed an effect of hypercholesterolemia on the parameters of oxidative stress and mitochondrial function, GSH levels and GR activity were decreased in $LDLr^{-/-}$ group, besides, and lipid peroxidation and accumulation of lipids in the liver was higher $LDLr^{-/-}$ group. This oxidative stress was even more pronounce when these $LDLr^{-/-}$ mice fed a high cholesterol diet. These data are strongly correlated with plasma levels of cholesterol. Aging reduced GSH levels and increased lipid peroxidation in liver of $LDLr^{-/-}$ mice. In the mitochondrial fraction, aging caused a decrease in GR activity and increased lipid peroxidation. In the mitochondrial function, the high-cholesterol diet caused a decrease in complex I and the aging induced a reduction of complex II of the respiratory chain in liver tissue of $LDLr^{-/-}$ mice. Taken together, these results show the hypercholesterolemia as strong inducer to oxidative stress and

mitochondrial dysfunction in the cardiovascular system and the liver tissue of LDLr^{-/-} mice, and this effect could be even more pronounced if these were fed a high cholesterol diet. Furthermore, treatment with (PhSe)₂ seems to modulate the antioxidant system related to GSH and thioredoxin, favoring the cellular redox environment.

Key Words: cholesterol, hypercholesterolemia, aging, oxidative stress, diphenyl diselenide, glutathione, thioredoxin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Colesterol e modelo do mosaico fluido da membrana plasmática.....	17
Figura 2	Modelo esquemático do mecanismo de ação dos receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL)...	19
Figura 3	Sistemas antioxidantes relacionados à GSH e Trx.....	23
Figura 4	Cadeia respiratória (CR) mitocondrial.....	27
Figura 5	Estrutura química e mecanismo catalítico do Disseleneto de Difenila.....	31
Figura 6	Efeito da hipercolesterolemia e do envelhecimento em homogenato de aorta e mitocôndrias de coração.....	45
Figura 7	Efeito do (PhSe) ₂ e do envelhecimento sobre os parâmetros de estresse oxidativo em homogenato de coração.....	48
Figura 8	Efeito do (PhSe) ₂ e do envelhecimento sobre os parâmetros de estresse oxidativo em homogenato de aorta.....	49
Figura 9	Níveis Plasmáticos de colesterol total.....	50
Figura 10	Efeito da hipercolesterolemia no sistema antioxidante relacionado à glutatona e produção de EROs.....	52
Figura 11	Efeito da hipercolesterolemia nos complexos da cadeia respiratória.....	54
Figura 12	Gráficos de dispersão entre os níveis plasmáticos de colesterol e o sistema antioxidante.....	55
Figura 13	Análise histológica do tecido hepático de camundongos.....	56
Figura 14	Efeito do envelhecimento no sistema antioxidante relacionado à glutatona e produção de EROs.....	57
Figura 15	Efeito do envelhecimento no sistema antioxidante relacionado à glutatona e produção de EROs.....	58
Figura 16	Efeito do envelhecimento nos complexos da cadeia respiratória.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Níveis plasmáticos de colesterol total de camundongos C57BL/6 e LDLr ^{-/-} jovens e velhos.....	44
Tabela 2.	Perfil lipídico de camundongos LDLr ^{-/-} jovens e velhos tratados com (PhSe) ₂	47

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Resumo do protocolo experimental 1a.....	35
Esquema 2	Resumo do protocolo experimental 1b.....	36
Esquema 3	Resumo do protocolo experimental 2a.....	37
Esquema 4	Resumo do protocolo experimental 2b.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

γ -GCS	γ -glutamil cisteína sintetase
γ -GT	γ -glutamil transpeptitase
(PhSe) ₂	Disseleneto de difenila
ADP	Adenosina difosfato
ARE	Elemento de resposta antioxidante
ATP	Adenosina trifosfato
apoB-100	Apolipoproteína B-100
apoE	Apolipoproteína E
apoE ^{-/-}	Camundongos deficientes para apolipoproteína E
CEH	Células estreladas hepáticas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CT	Colesterol total
CR	Cadeia respiratória
DCIP	Dicloindofenol
DCF	2', 7'-diclorofluoresceína (forma oxidada)
DCFH	2', 7'-diclorofluoresceína (forma reduzida)
DCF-DA	2', 7'-diclorofluoresceína-diacetato
DCV	Doenças cardiovasculares
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EGTA	Ácido etilenoglicoltetraacético
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Dinucleotídeo de flavina adenina (forma oxidada)
FADH ₂	Dinucleotídeo de flavina adenina (forma reduzida)
FeCN	Férrico-cianeto
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona (forma reduzida)
GSSG	Glutaciona (forma oxidada)
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de densidade alta
HF	Hipercolesterolemia familiar
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
KH ₂ PO ₄	Fosfato de monopotássio
LDL	Lipoproteína de densidade baixa
<i>LDLR</i>	Gene que codifica para o receptor de LDL

LDLr	Receptor de LDL
LDLr ^{-/-}	Camundongo deficiente para o receptor de LDL
MDA	Malondialdeído
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida adenina reduzida
NADP ⁺	Dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina oxidada
NADPH	Dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina reduzida
Nrf-2	Fator de transcrição nuclear eritróide-2
OMS	Organização mundial da saúde
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OPT	Orto-fitalaldeído
OH [•]	Radical hidroxila
RO ₂ [•]	Radical peroxil
RSH	Grupamento tiol
SOD	Superóxido dismutase
Se-H	Selenol
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBArS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Triacilgliceróis
TNB	Ácido 2-nitro-5-tiobenzóico
Trx	Tioredoxina
TrxR	Tioredoxina redutase
VLDL	Lipoproteína de densidade de muito baixa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
1.1.	COLESTEROL.....	16
1.2.	HIPERCOLESTEROLEMIA.....	17
1.2.1.	Modelos experimentais de hipercolesterolemia.....	20
1.3.	ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTE.....	22
1.4.	MITOCÔNDRIA.....	25
1.4.1.	Disfunção mitocondrial e hipercolesterolemia.....	27
1.5.	ENVELHECIMENTO.....	29
1.6.	DISSELENETO DE DIFENILA.....	30
2.	OBJETIVOS.....	32
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	32
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1.	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	34
3.2.	ANIMAIS.....	34
3.3.	REAGENTES.....	34
3.4.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 1 – SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	35
3.4.1.	Protocolo experimental 1 a.....	35
3.4.2.	Protocolo experimental 1 b.....	36
3.5.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 2 – TECIDO HEPÁTICO..	37
3.5.1.	Protocolo experimental 2 a.....	37
3.5.2.	Protocolo experimental 2 b.....	38
3.6.	DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL TOTAL E PERFIL LIPÍDICO.....	39
3.7.	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE BIOQUÍMICAS.....	39
3.7.1.	Preparação das amostras para determinação de parâmetros de estresse oxidativo.....	39
3.7.2.	Preparação das amostras para determinação da atividade de complexos da cadeia respiratória.....	39
3.7.3.	Preparação das frações mitocondrial e citosólica.....	39
3.8.	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA.....	40
3.9.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE.....	40
3.10.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE.....	40
3.11.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA TIORREDOXINA REDUTASE.....	41
3.12.	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS	41
3.13.	DETERMINAÇÃO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	41
3.14.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO I (NADH-DESIDROGENASE).....	42
3.15.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO 2 (SUCCINATO-DESIDROGENASE).....	42

3.16.	HISTOLOGIA.....	42
3.17.	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	43
3.18.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	43
4.	RESULTADOS.....	44
4.1.	EFEITO DA HIPERCOLESTEROLEMIA E DO ENVELHECIMENTO SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA CARDIOVASCULAR... 44	44
4.1.1.	Efeito da deleção do gene para o receptor de LDL e do envelhecimento sobre os níveis plasmáticos de colesterol total... 44	44
4.1.2.	Efeito da hipercolesterolemia e do envelhecimento sobre o conteúdo de GSH e produção de EROs..... 44	44
4.2.	EFEITO DO (PHSE) ₂ E DO ENVELHECIMENTO SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA CARDIOVASCULAR DE CAMUNDONGOS LDLR ^{-/-} 46	46
4.2.1.	Efeito do (PhSe) ₂ e do envelhecimento sobre os níveis de lipídeos plasmáticos de camundongos LDLR ^{-/-} 46	46
4.2.2.	Efeito do (PhSe) ₂ e do envelhecimento sobre os parâmetros de estresse oxidativo em homogenato de coração..... 47	47
4.2.3.	Efeito do (PhSe) ₂ e do envelhecimento sobre os parâmetros de estresse oxidativo em homogenato de aorta..... 49	49
4.3.	EFEITO DA HIPERCOLESTEROLEMIA E DO ENVELHECIMENTO SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL E ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS.... 50	50
4.3.1	Níveis plasmáticos de colesterol total de camundongos alimentados com uma dieta padrão ou hipercolesterolêmica..... 50	50
4.3.2.	Efeito da hipercolesterolemia no sistema antioxidante relacionado à glutatona e na peroxidação lipídica em fígado de camundongos..... 51	51
4.3.3.	Efeito da hipercolesterolemia na atividade de complexos da cadeia respiratória no fígado de camundongos..... 53	53
4.3.4.	Efeito da hipercolesterolemia sobre a acumulação de lipídeos no fígado de camundongos..... 55	55
4.3.5.	Efeito do envelhecimento no sistema antioxidante relacionado à glutatona e na produção de EROs na fração citosólica de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos..... 56	56
4.3.6.	Efeito envelhecimento no sistema antioxidante relacionado à glutatona e na produção de EROs na fração mitocondrial de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos..... 57	57
4.3.7.	Efeito do envelhecimento na atividade de complexos da cadeia respiratória de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos.... 58	58
5.	DISCUSSÃO.....	60
6.	CONCLUSÕES.....	68
7.	PERSPECTIVAS.....	70
	REFERÊNCIAS.....	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. COLESTEROL

O colesterol é um componente vital do corpo humano (Fig.1). É o principal esteroide encontrado em todas as células animais, o qual possui papel crucial como componente estrutural das membranas biológicas, como precursor de hormônios esteroides e da vitamina D, além de, precursor dos ácidos biliares. Devido sua importância, todas as células são capazes de sintetizá-lo a partir de moléculas simples, portanto, não é necessário que esteja presente na dieta de mamíferos (LEHNINGER, NELSON e COX, 2008; LECERF e DE LORGERIL, 2011). Quando a soma do colesterol sintetizado e do colesterol obtido da dieta excede a quantidade necessária, ou seja, uma desregulação na biossíntese de colesterol, pode levar a sérias doenças em humanos, como aterosclerose, doença hepática não alcoólica, entre outras (ROSS e HARKER, 1976; HOBBS, BROWN e GOLDSTEIN, 1992; WOUTERS *et al.*, 2008; YASUTAKE *et al.*, 2009).

O colesterol é principalmente sintetizado nos hepatócitos do fígado. Este órgão desempenha papel central na manutenção da homeostase de lipídeos no organismo. A biossíntese de colesterol é complexa, e a sua regulação nos mamíferos é mediada pela concentração intracelular de colesterol. Por sua vez, a concentração intracelular é dependente do equilíbrio entre a síntese e absorção deste lipídeo contido no sangue, além de, sua excreção, especialmente pelas vias biliares. A principal etapa de regulação da síntese de colesterol é a conversão de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) em mevalonato, catalisada pela enzima HMG-CoA-redutase (GUPTA, SEXTON e RUDNEY, 1990; LEHNINGER, NELSON e COX, 2008).

Uma pequena parte de colesterol recém sintetizado é incorporado na membrana do hepatócito, e a maioria é exportado para os outros tecidos e órgãos. Esse transporte de colesterol para os tecidos ocorre pelo sangue através de lipoproteínas plasmáticas, tais com a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). Todavia, a principal lipoproteína transportadora de colesterol é a lipoproteína de baixa densidade (LDL), a qual se liga a receptores específicos de membrana plasmática, os receptores de LDL (LDLr), que reconhecem a apolipoproteína B-100 (apoB-100), fornecendo colesterol para as células, num processo conhecido com endocitose mediada por receptor (BROWN e GOLDSTEIN, 1983; LEHNINGER, NELSON e COX, 2008; GOLDSTEIN e BROWN, 2009).

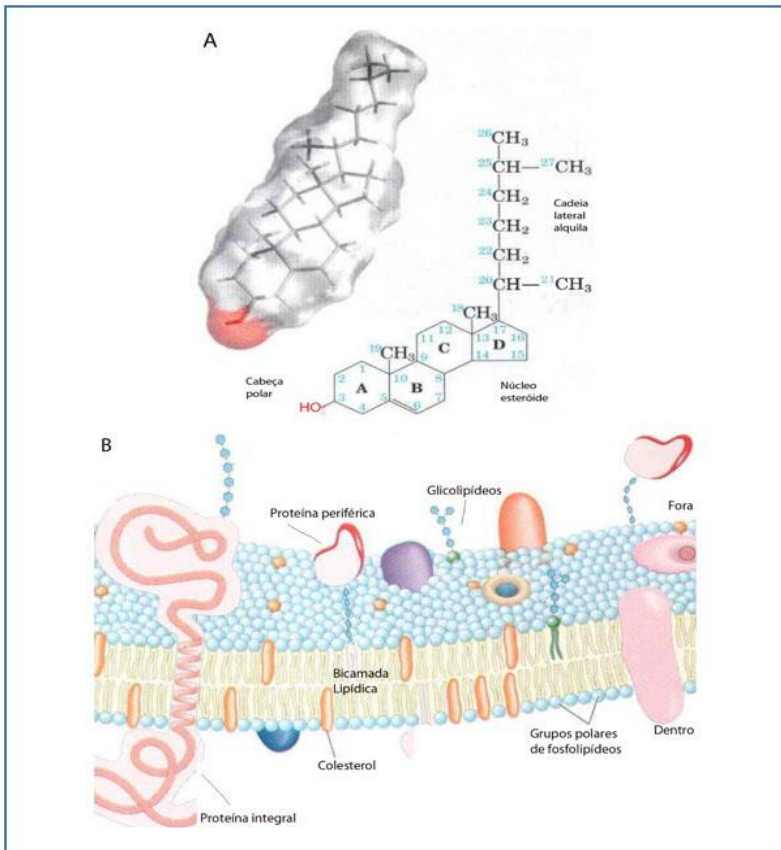


Figura 1. Colesterol e modelo do mosaico fluido da membrana plasmática. (A) A estrutura em bastão do colesterol é visível por um modelo de contorno de superfície transparente da molécula. Na estrutura química, os anéis do núcleo esteroide estão representados de A a D; aos átomos de carbono estão representados em azul. O grupo hidroxil do C-3 é o grupo polar da cabeça. (B) A cadeia acil no interior da membrana formam uma região hidrofóbica fluida. O colesterol é responsável pela regulação da fluidez da membrana plasmática (Fonte: LEHNINGER, NELSON e COX (2008)).

1.2. HIPERCOLESTEROLEMIA

A hipercolesterolemia é o principal fator de risco para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose e está estreitamente relacionada com as doenças cardiovasculares (DCV) (ROSS e HARKER, 1976; GOTTO, 1997). O excesso de colesterol se acumula nas paredes das artérias formando placas volumosas que diminuem o

fluxo de sangue até a eventual formação e desprendimento do coágulo, que pode obstruir vasos de pequenos calibres e causar infarto agudo do miocárdio ou acidente vascular cerebral (HANSSON e HERMANSSON, 2011). O estilo de vida moderna, com alto teor de colesterol na dieta, favorecendo o desequilíbrio no metabolismo de lipoproteínas, contribui para o desenvolvimento de hipercolesterolemia e dessa forma aumenta a prevalência das DCV (WEBER e NOELS, 2011). Estima-se que 17,3 milhões de pessoas, em todo o mundo morreram em consequência das doenças cardiovasculares no ano de 2008, representando 30% de todas as causas de mortes do planeta (MENDIS *et al.*, 2011).

Dentre esses desequilíbrios no metabolismo do colesterol, existe um em especial, no qual os indivíduos possuem níveis extremamente elevados de colesterol, devido a um defeito no metabolismo da LDL, doença conhecida como Hipercolesterolemia Familiar (HF). O fenótipo clínico de HF é geralmente decorrente de defeitos no gene *LDLR*, que codifica o receptor de LDL (LDLr), e é herdada como uma característica monogênica dominante. Indivíduos homocigotos são gravemente afetados (HOBBS, BROWN e GOLDSTEIN, 1992; SIBLEY e STONE, 2006; FARNIER e BRUCKERT, 2012). Segundo a I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (2012), os níveis sanguíneos de colesterol plasmático dos pacientes homocigóticos para a doença, são cinco vezes maiores (1g por dL de plasma) do que em pessoas saudáveis (0,2g por dL de plasma). Aterosclerose grave e infarto do miocárdio podem ocorrer já na adolescência, com prevalência de 1 em 1 milhão. Indivíduos que herdaram apenas um gene mutante (heterocigotos) desenvolvem sintomas mais tardiamente na vida (de 35 a 55 anos de idade) e com maior prevalência, de 1 em 200-500 pessoas. Seus níveis de colesterol são cerca de 2-3 vezes maior do que em pessoas normais (0,6g por dL de plasma).

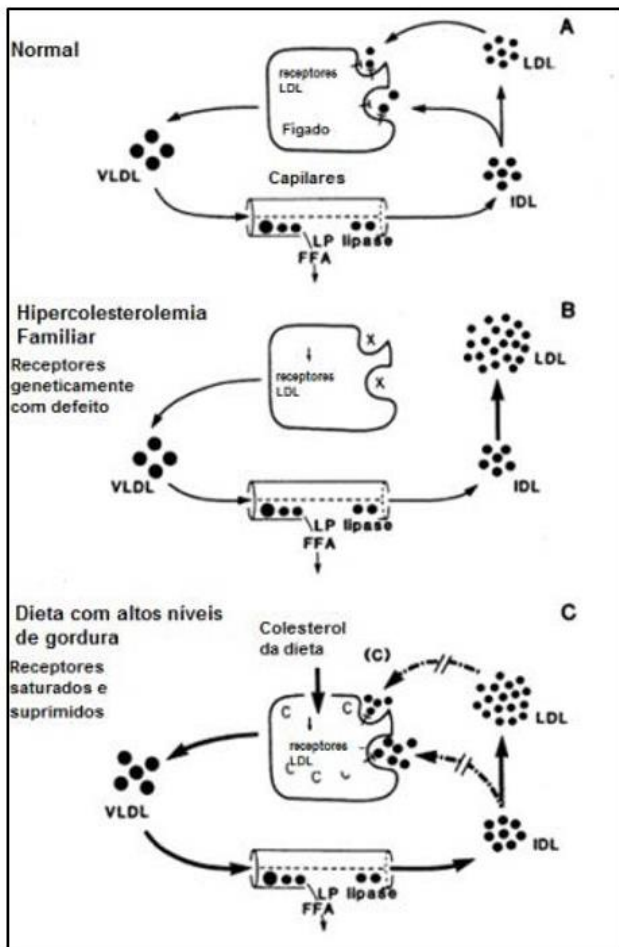


Figura 2. Modelo esquemático do mecanismo pelo qual os receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL) no fígado controlam o metabolismo de LDL plasmática. (A) em indivíduos normais, (B) em indivíduos com hipercolesterolemia familiar, e (C) em indivíduos consumindo uma dieta rica em gorduras saturadas e colesterol. VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade; IDL, lipoproteína de densidade intermediária; LP lipase, lipase lipoprotéica; FFA; ácidos graxos livres (Fonte: BROWN e GOLDSTEIN (1986).

Em 1973, Joseph Leonard Goldstein e Michael Suart Brown professores da Universidade do Texas Southwestern Medical Center, em Dallas, através de suas descobertas revolucionaram o conhecimento sobre a regulação do metabolismo do colesterol e no tratamento de doenças causadas por níveis anormalmente elevados de colesterol plasmático. Descobriram que células expressam receptores de superfície que medeiam a captação de LDL, que circula na corrente sanguínea - os receptores de LDL (Fig.2). Consequentemente, descobriram o mecanismo subjacente para a doença Hipercolesterolemia Familiar. Essas descobertas, sobre a regulação do metabolismo do colesterol, renderam a Michael S. Brown e Joseph L. Goldstein o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1985 (GOLDSTEIN e BROWN, 2009).

Por outro lado, estudos recentes indicam que a hipercolesterolemia e níveis séricos elevados de LDL são importantes fatores de risco para a progressão da Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA) (MUSSO *et al.*, 2003; MATSUZAWA *et al.*, 2007; WOUTERS *et al.*, 2008; YASUTAKE *et al.*, 2009). A DHGNA, causa mais comum de doença hepática crônica nos países ocidentais, é caracterizada por grande deposição de lipídeos no fígado e pode progredir para cirrose e câncer hepático. Está intimamente associada com a síndrome metabólica e os seus componentes individuais, tais como a obesidade, resistência à insulina, hiperlipidemia, diabetes e hipertensão (SOCHA *et al.*, 2007; MATHERLY e PURI, 2012). Nos últimos anos, um corpo crescente de evidências vem sugerindo uma estreita relação entre as DCV e a DHGNA, que em parte pode ser explicado pelos diversos fatores de risco que as doenças apresentam em comum dentre eles a hipercolesterolemia (TARGHER, DAY e BONORA, 2010; PACANA e FUCHS, 2012).

1.2.1. Modelos experimentais de hipercolesterolemia

Numerosas espécies animais têm sido utilizado para estudar a patogênese e tratamento de doenças que envolvem altos níveis plasmáticos de colesterol, como a aterosclerose. A primeira evidência de aterosclerose experimental foi descrita em 1908 por Ignatowski (1908), através da observação de lesões ateroscleróticas em coelhos alimentados com uma dieta rica em proteína animal. Até a década de 90, a maior parte da investigação da aterosclerose utilizava coelhos como modelos experimentais, com um menor número de estudos em porcos e primatas não humanos (DAUGHERTY, 2002). Apesar do fato de que os coelhos não desenvolvem aterosclerose espontânea, eles são úteis porque são altamente sensíveis à manipulação do colesterol na dieta e desenvolvem

lesões num período de tempo bastante curto. Porém, nesta espécie, os níveis plasmáticos de colesterol são muito elevados e as lesões formadas apresentam conteúdo lipídico e inflamatório muito superior às lesões observadas em humanos (JAWIEN, NASTALEK e KORBUT, 2004). Nos últimos anos, vem ocorrendo uma explosão no número de estudos *in vivo* para elucidar os mecanismos aterogênicos, que em grande parte é devido ao uso de camundongos (DAUGHERTY, 2002; JAWIEN, NASTALEK e KORBUT, 2004).

Os camundongos selvagens são altamente resistentes à aterosclerose, não desenvolvem as lesões nem mesmo quando alimentados com dieta rica em gordura. A única exceção é a linhagem C57BL/6, que quando alimentado com uma dieta rica em colesterol pode desenvolver pequenas estrias gordurosas, porém bem diferentes daquelas em humanos (PAIGEN *et al.*, 1985). Os modelos de camundongos oferecem a vantagem de serem capazes de gerar uma variedade de lesões ateroscleróticas, desde simples morfologia celular de macrófagos para lesões mais complexas que consistem em núcleos lipídicos acelulares, capas fibrosas, e calcificação. Além disso, camundongo é o mamífero mais comumente utilizados para manipulações genéticas. Em comum com todos os modelos animais de aterosclerose, até hoje, nenhum modelo de camundongo apresenta ruptura da lesão aterosclerótica, evento que antecipa os acontecimentos cardiovasculares agudos em humanos (DAUGHERTY, 2002).

Neste contexto, destaca-se o surgimento de camundongos geneticamente modificados, os quais solucionaram muitos problemas relacionados ao estudo experimental da aterosclerose (OHASHI *et al.*, 2004). Os camundongos com deleção gênica da apolipoproteína E (apoE^{-/-}) ou do receptor de LDL (LDLr^{-/-}) são amplamente empregados na atualidade, e ambos fornecem uma ferramenta prática para o estudo da hipercolesterolemia e suas consequências.

A apolipoproteína E (apoE) é um ligante importante para a captação de lipoproteínas de vários receptores da família dos receptores de LDL, e a deficiência de apoE leva à acumulação de moléculas de éster de colesterol promovendo aterosclerose. Desenvolvido pela primeira vez em 1992 por Plump e col. (1992), esses camundongos desenvolveram aterosclerose grave com uma dieta enriquecida com 4,5% de gordura, e apresentaram tipos celulares na área da lesão semelhante aos observados em humanos (NAKASHIMA *et al.*, 1994). A grande falha nesse modelo de apoE^{-/-} é que o seu perfil de lipoproteínas plasmáticas é diferente do perfil de humanos com aterosclerose. Em

parte, é devido que o colesterol é transportado no plasma pela VLDL, em vez da LDL, como em seres humanos (OHASHI *et al.*, 2004).

Camundongos LDLr^{-/-} foram desenvolvidos por Ishibashi e col. No início da década de 90 (1993). Eles representam um modelo de hipercolesterolemia familiar, caracterizada por níveis moderados de LDL-colesterol, com aumento de cerca de 2 vezes, quando submetidos a uma dieta padrão, podendo desenvolver lesões ateroscleróticas a longo prazo. Porém, se for administrada uma dieta enriquecida com colesterol à estes animais, os níveis de colesterol plasmático aumentam consideravelmente (cerca de 5 a 8 vezes), desenvolvendo grandes lesões ateroscleróticas. A lesão patológica neste modelo não é tão bem caracterizada como no modelo apoE^{-/-}, mas parece semelhante à de humano no sentido que as lesões podem progredir para placa fibrótica (ISHIBASHI *et al.*, 1993; DAUGHERTY, 2002; OHASHI *et al.*, 2004).

Após o desenvolvimento dos camundongos apoE^{-/-} e LDLr^{-/-}, várias modificações genéticas têm sido realizadas para obter os fenótipos que se assemelham às lesões ateroscleróticas humanas. Além do estudo da fisiopatologia da aterosclerose, muitas tentativas também têm sido feitas para reverter as lesões de modo a explorar terapias potenciais para os seres humanos (OHASHI *et al.*, 2004).

1.3. ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTE

Durante o metabolismo basal das células aeróbicas normais, existe uma produção constante de espécies reativas de oxigênio (EROs) acompanhada pela sua contínua inativação, através da ação de antioxidantes, de forma a manter a integridade estrutural e funcional das biomoléculas (SIES, 1997). EROs são átomos ou moléculas altamente reativas, que contêm um elétron não pareado em sua órbita mais externa, sendo formados durante várias reações metabólicas. Dentre eles encontram-se o superóxido (O₂⁻), radical hidroxila (OH[•]) e o radical peróxil (RO₂[•]). Também há a formação de espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A geração de EROs nem sempre é prejudicial ao organismo, pelo contrário, é necessária em vários processos biológicos: sinalização celular, contração muscular e sistema imune (KANEKO, BABA e MATSUO, 2001). Quando os níveis totais de EROs são maiores que a capacidade de defesa ocorrem danos celulares significativos (ALFADDA e SALLAM, 2012).

O equilíbrio entre os mecanismos que causam condições oxidativas e as defesas antioxidantes celulares, provoca uma variedade de mudanças fisiológicas, chamadas coletivamente de estresse oxidativo (BAST e GORIS, 1989). O estresse oxidativo pode estar relacionado

com vários processos fisiopatológicos como o envelhecimento (FINKEL e HOLBROOK, 2000), aterosclerose (WITZTUM, 1994) e doenças hepáticas (WALENBERGH *et al.*, 2012), entre outras.

A célula possui diversos mecanismos de defesas antioxidantes que podem detoxificar EROs (Fig. 3), e podemos destacar o sistema enzimático: superóxido dismutase (SOD), que catalisa a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e trabalha simultaneamente com a catalase e a glutatona peroxidase (GPx) (Fig.3) (MICHELET *et al.*, 1995; ANDERSON, 1998; REID e JAHOOOR, 2001).

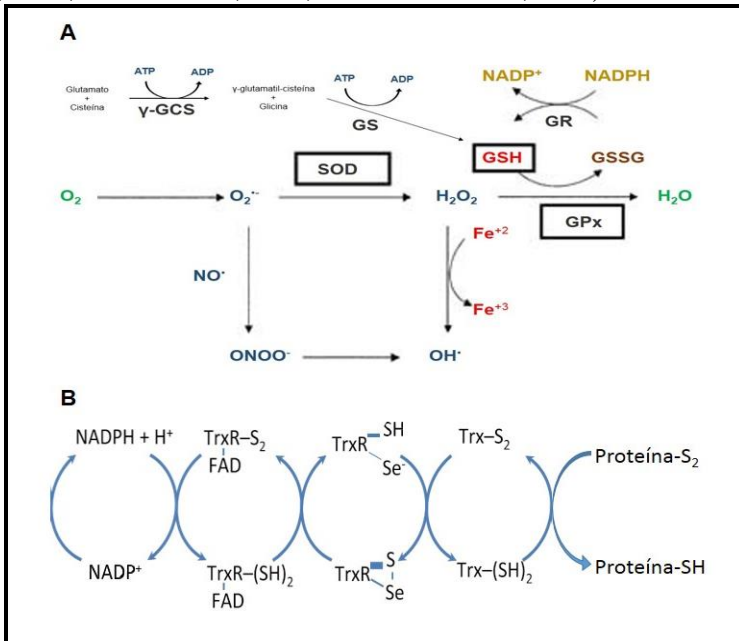


Figura 3. Sistemas antioxidantes relacionados à GSH e Trx. (A) Sistema relacionado à GSH, γ -glutamil cisteína sintase (γ -GCS) e glutatona sintetase (GS) são enzimas responsáveis pela síntese de GSH; o oxigênio (O_2) pode reagir com elétrons e formar EROs como o superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) que pode ser dismutado pela enzima SOD, formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ou reagir com óxido nítrico (NO^{\bullet}) e produzir peróxido nitrito (ONOO^{\bullet}), que por sua vez pode formar o radical hidroxil (OH^{\bullet}); o OH^{\bullet} pode ser formado também via reação de Fenton, quando o H_2O_2 reage com íons de ferro (Adaptado de Jassem, V. (2004). (B) Sistema relacionado à Trx, quando os grupos tióis de proteínas são oxidados por EROs, a proteína Trx reage reduzindo esses grupos tióis, tornando a proteína novamente ativa; a tioredoxina agora oxidada, é reduzida pela enzima TrxR, que recebe elétrons do NADPH, recuperando a atividade protetora da Trx (Adaptado de (HOLMGREN e LU, 2010).

A glutationa é um composto tiólico não proteico que desempenha um papel importante na proteção de células e estruturas de danos oxidativos. Os níveis de GSH são um fator limitante neste processo de defesa antioxidante, o que requer a manutenção pela glutationa redutase (GR) à custo de dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina reduzida (NADPH). Este mecanismo de detoxificação de peróxidos pela GSH mediada pela GPx e GR, constitui o sistema antioxidante relacionado à glutationa, uns dos principais sistemas de defesa antioxidante celular (ANDERSON, 1998).

A GPx (Fig.3) é uma enzima chave em muitos tipos celulares e consome glutationa para converter H₂O₂ e peróxidos lipídicos em seus respectivos álcoois (STOCKER e KEANEY, 2004). Em mamíferos, existem quatro principais classes de GPx, que diferem entre si na distribuição tecidual e localização celular. São selenoproteínas que contém em seu sítio ativo o selênio, essencial para sua reação catalítica (MARGIS *et al.*, 2008). Recentes estudos clínicos têm demonstrado que a diminuição da atividade da enzima GPx está associada ao risco aumentado de eventos cardiovasculares (BLANKENBERG *et al.*, 2003; ESPINOLA-KLEIN *et al.*, 2007). Além disso, a atividade da GPx-1 está diminuída ou ausente em placas ateroscleróticas humanas e está associada ao desenvolvimento de lesões mais severas (LAPENNA *et al.*, 1998). Em camundongos, a deficiência de GPx causa disfunção endotelial, acompanhada de aumento do estresse oxidativo, anormalidades funcionais e estruturais do sistema cardiovascular (FORGIONE *et al.*, 2002).

Também destacamos o sistema relacionado a tiorredoxina (Trx) (Fig.3). Que é composto pela proteína tiorredoxina, pela enzima tiorredoxina reductase e a molécula doadora de elétrons NADPH. A tiorredoxina é uma proteína fundamental para a defesa antioxidante, modulação de vias de sinalização, regulação de fatores de transcrição, entre outros (LILLIG e HOLMGREN, 2007). Possui no seu sítio ativo dois grupos tióis, e o estado redox desses grupos é responsável pela atuação da tiorredoxina. Estes grupos tióis são mantidos reduzidos pela tiorredoxina reductase (TrxR) que recebe elétrons do NADPH (HOLMGREN e LU, 2010). Devido a sua ampla distribuição e a sua estrutura conservada, essas proteínas são alvo de muitos estudos na biologia (MARTY *et al.*, 2009).

1.4. MITOCÔNDRIA

A mitocôndria é a organela celular responsável pela maior produção líquida de energia. Eugene Kennedy e Albert Lehninger descreveram há mais de 50 anos que a mitocôndria contém proteínas envolvidas com a oxidação de nutrientes bem como com a respiração celular com concomitante geração de energia. As mitocôndrias, assim como as bactérias gram-negativas, possuem duas membranas. A membrana mitocondrial externa é prontamente permeável a moléculas pequenas e a íons, que se movem livremente através de canais transmembrana. A membrana interna é impermeável à maioria das moléculas pequenas e íons, incluindo prótons (H^+) (LEHNINGER, NELSON e COX, 2008).

A produção energética mitocondrial é resultante de dois processos metabólicos estreitamente coordenados, o ciclo de Krebs e a cadeia transportadora de elétrons ou cadeia respiratória (CR). O ciclo de Krebs tem como função principal produzir as coenzimas NADH e $FADH_2$ para que sejam inseridas na CR; todas as enzimas envolvidas neste ciclo oxidativo se encontram localizadas na matriz mitocondrial (LEHNINGER, NELSON e COX, 2008).

A fosforilação oxidativa é um processo que requer a ação orquestrada de cinco complexos enzimáticos distribuídos de forma especial na membrana mitocondrial interna e constituem a CR. Os elétrons oriundos do NADH e do $FADH_2$ são transferidos para a CR, tendo o oxigênio molecular como acceptor final. Este processo é acoplado à translocação de prótons através da membrana mitocondrial interna e a síntese endergônica de adenosina trifosfato (ATP), empregando como força motriz a energia armazenada como gradiente eletroquímico de prótons. Os primeiros dois eventos ligados à respiração, transferência de elétrons e bombeamento de prótons, são realizados pela CR. Os complexos enzimáticos da CR compreendem a maior parte das proteínas embebidas na membrana mitocondrial interna. Cada complexo é constituído de várias subunidades protéicas que se encontram associados com uma variedade de grupamentos prostéticos com potencial de oxirredução (LEHNINGER, NELSON e COX, 2008).

Complexo I: NADH-desidrogenase: O complexo I transfere os elétrons do NADH, principalmente formado a partir da glicólise e do ciclo de Krebs, para a ubiquinona. Este complexo é o maior componente protéico presente na membrana mitocondrial interna e é formado por sete unidades codificadas pelo DNA mitocondrial e pelo menos por 34 subunidades codificadas pelo DNA nuclear (VOET e VOET, 2011).

Complexo II: Succinato-desidrogenase: O complexo II é composto por quatro subunidades protéicas, incluindo a enzima dimérica succinato desidrogenase, componente do ciclo de Krebs, todas codificadas pelo DNA nuclear. Este complexo transfere os elétrons do succinato para a ubiquinona. Este processo envolve a participação de um FAD covalentemente ligado à succinato desidrogenase, dois centros ferro-enxofre e um citocromo *b560* (VOET e VOET, 2011).

Complexo III: ubiquinona-citocromo *c* redutase: O complexo III transfere os elétrons da ubiquinona para o carreador móvel de elétrons, o citocromo *c*. O complexo III está arranjado assimetricamente na membrana mitocondrial interna e contém 11 subunidades, onde três delas contém centros redox que são utilizados na formação de energia (SARASTE, 1990).

Complexo IV: Citocromo *c* oxidase: A citocromo *c* oxidase é o complexo terminal da cadeia transportadora de elétrons. O complexo IV transfere os elétrons a partir do ferrocitocromo *c* para o oxigênio molecular. A citocromo *c* oxidase é uma enzima chave na produção energética mitocondrial, uma vez que a reação redox entre o citocromo *c* e o oxigênio molecular é essencialmente irreversível (POYTON e MCEWEN, 1996).

Complexo V: ATP sintase: A síntese de ATP é realizada pelo complexo V. Este complexo é formado por duas subunidades codificadas pelo DNA mitocondrial e pelo menos por doze subunidades codificadas pelo DNA nuclear. Funcionalmente e estruturalmente, o complexo V é formado por um componente catalítico solúvel na matriz mitocondrial (F1-ATPase) e um componente de membrana hidrofóbico (Fo-ATPase) que contém um canal de prótons (SARASTE, 1990; LEHNINGER, NELSON e COX, 2008).

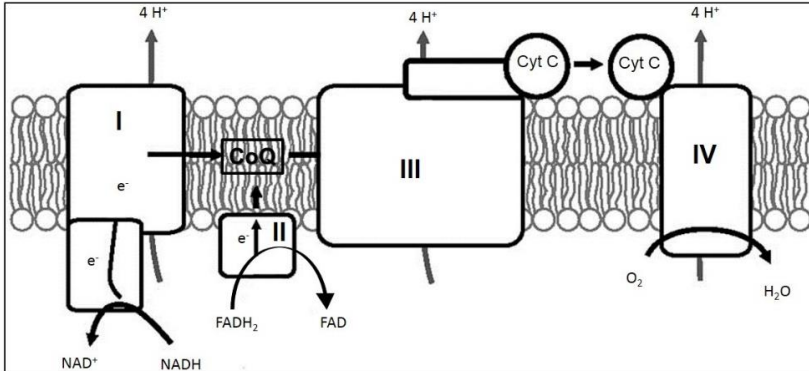


Figura 4. Cadeia respiratória (CR) mitocondrial. Esquema da CR incorporada na membrana interna da mitocôndria. É composto por quatro complexos: complexo I, NADH desidrogenase; complexo II, Succinato desidrogenase; complexo III, Ubiquinol-citocromo c redutase, e complexo IV, Citocromo c oxidase (Adaptado de ADAM-VIZI, V. (2005).

Os complexos transmembrana I, III e IV (Fig.4), além de participar na CR têm a sua atividade vinculada à transferência de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, contribuindo para a formação de um gradiente eletroquímico. Este gradiente determina uma polarização da membrana mitocondrial interna (potencial de membrana mitocondrial), que pode ser revertida pelo fluxo desses prótons através do componente F_0 da ATP sintase. O fluxo de prótons leva à condensação da adenosina difosfato (ADP) e de fosfato inorgânico em ATP (LEHNINGER, NELSON e COX, 2008).

As mitocôndrias são alvos e fontes biologicamente importantes de EROs. Todavia, o papel da disfunção mitocondrial como mediador de processos patológicos oxidativos, como a aterosclerose, ainda não está bem estabelecido (BALLINGER, 2005; VERCESI *et al.*, 2007).

1.4.1. Disfunção mitocondrial e hipercolesterolemia

Estudos têm apontado que a hipercolesterolemia induz a produção de espécies reativas causando estresse oxidativo e que a mitocôndria desempenha papel fundamental neste contexto (WARNHOLTZ *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2005; MADAMANCHI e RUNGE, 2007; PAIM *et al.*, 2008).

Recentes evidências demonstram que o aumento na produção de EROs pela mitocôndria e a conseqüente disfunção desta organela são fatores relevantes e preliminares na formação das lesões ateroscleróticas.

De fato, a superprodução de espécies reativas induz a disfunção endotelial, proliferação e apoptose de células musculares lisas e macrófagos resultando na progressão das lesões ateroscleróticas e possível ruptura da placa (MADAMANCHI e RUNGE, 2007). Por outro lado, o dano ao DNA mitocondrial causado pelas espécies reativas está correlacionado com a extensão da aterosclerose (VAN REMMEN, HAMILTON e RICHARDSON, 2003) sugerindo que a disfunção mitocondrial pode promover aterogênese.

A disfunção desta organela importante resulta na perda da capacidade funcional da mitocôndria, além de induzir diminuição da capacidade oxidativa energética, e superprodução de EROs (CROMPTON, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2005), extensivo inchaço mitocondrial com consequente ruptura da membrana externa e liberação de componentes intermembranas, incluindo moléculas sinalizadores de apoptose (SKULACHEV, 2000).

Evidências crescentes suportam a noção de que o dano oxidativo às proteínas mitocondriais leva à sua disfunção e que a função mitocondrial desregulada é o principal mecanismo de unificação de vários fatores de risco associados à aterosclerose (BALLINGER, 2005; MADAMANCHI e RUNGE, 2007). Muitos estudos indicam que a LDL oxidada induz apoptose em todas as células envolvidas na aterogênese, e as vias mitocondriais desempenham um papel fundamental nesse processo (LUNDBERG, 1985; MABILE *et al.*, 1997; VINDIS *et al.*, 2005). Macrófagos de lesões ateroscleróticas avançadas acumulam excesso de colesterol livre, o qual é um potente indutor de morte celular pela diminuição do potencial de membrana mitocondrial e indução de apoptose (YAO e TABAS, 2001; ASMIS e BEGLEY, 2003; MADAMANCHI e RUNGE, 2007).

Semelhante à aterosclerose, (em que no endotélio da parede do vaso, os macrófagos que se infiltram e os fibroblastos promovem a formação de placa aterosclerótica) nos hepatócitos do fígado, as células de Kupffer (macrófagos residentes do fígado) e as células estreladas hepáticas (CEH) são importantes mediadores de uma lesão hepática e consequentemente causam DHGNA. A alteração do metabolismo do colesterol provoca vários efeitos tóxicos sobre cada uma destas células, promovendo a DHGNA através de diversos mecanismos. Um exemplo da toxicidade é devido ao fato que o colesterol com seu núcleo, rígido e grande, afeta a organização da membrana alterando suas propriedades físicas, influenciando diretamente na permeabilidade e fluidez da membrana (MUSSO *et al.*, 2003).

A mitocôndria desempenha papel importante na homeostase lipídica no fígado, através da β -oxidação, e estudos mostram o envolvimento da disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo na patogênese da DHGNA (FROMENTY *et al.*, 1995; BEGRICHE *et al.*, 2013; LEAMY, EGNATCHIK e YOUNG, 2013).

De fundamental relevância, Oliveira e col. observaram que mitocôndrias de fígado e de coração de camundongos LDLr^{-/-} possuíam maior produção líquida de EROs e maior suscetibilidade para desenvolver o poro de transição mitocondrial, levando a apoptose. Também foi observado neste estudo, que camundongos LDLr^{-/-} possuíam maiores taxas de lipogênese, que conseqüentemente causaria estresse oxidativo devido ao esgotamento de equivalentes redutores – NADPH. Estes dados fornecem a primeira evidência de como o estresse oxidativo é gerado em células de camundongos deficientes para o receptor de LDL e poderia explicar o aumento da oxidação de LDL, a morte celular, e aterogênese visto na hipercolesterolemia familiar (Oliveira *et al.*, 2004).

1.5. ENVELHECIMENTO

O envelhecimento prejudica a oxidação de substratos, diminui a produção de energia celular e aumenta a produção de EROs que são tóxicos para a célula (LESNEFSKY e HOPPEL, 2006). As mitocôndrias são bastante afetadas com o envelhecimento, uma vez que elas produzem constantemente EROs, e que esta produção aumenta com o avanço da idade, podendo levar à danos oxidativos irreversíveis nos complexos da cadeia respiratória (HANSFORD, 1978; CHAUDHARY, EL-SIKHRY e SEUBERT, 2011; PULLIAM, BHATTACHARYA e VAN REMMEN, 2012; STRIDE *et al.*, 2013).

De fato, o envelhecimento altera o metabolismo da glutatona em coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol. Um grupo de pesquisadores italianos observou que a dieta rica em colesterol, a curto prazo, causa aumento nos níveis de glutatona e a atividade da γ -glutamil transpeptidase (γ -GT) nos coelhos, todavia, quando os animais foram alimentados com esta dieta por um longo período os níveis de glutatona, e as atividades da GR e da γ -GT diminuíram e a peroxidação lipídica aumentou acentuadamente na aorta (LAPENNA *et al.*, 2004).

O envelhecimento também provoca alterações no metabolismo hepático. Estudos vem mostrando o efeito relacionado com o avanço da idade principalmente no metabolismo do colesterol e ácidos biliares, comprometendo as funções do fígado (UCHIDA *et al.*, 1978; UCHIDA *et al.*, 1990). Ou seja, os níveis plasmáticos de colesterol aumentam com

o avanço da idade tanto em roedores como em humanos. Este fato em parte pode ser explicado pela eliminação reduzida do colesterol e ácidos biliares e também pela diminuição da depuração mediada pelos receptores de LDL (GALMAN *et al.*, 2007).

1.6. DISSELENETO DE DIFENILA

O disseleneto de difenila (PhSe)₂ é um composto orgânico de selênio que reage eficientemente com hidroperóxidos e peróxidos orgânicos, através de reação similar a catalisada pela GPx (Fig.5). Todavia, o (PhSe)₂ demonstrou ser mais ativo como mimético da GPx (WILSON *et al.*, 1989) e menos tóxico em roedores que outros compostos organoselênicos (MEOTTI *et al.*, 2003; NOGUEIRA *et al.*, 2003a).

O mecanismo catalítico para a detoxificação de peróxidos pelo (PhSe)₂ foi proposto. A atividade tiol-peroxidase do (PhSe)₂ parece ser cineticamente semelhante a reação catalisada pela enzima. Inicialmente o (PhSe)₂ reage com um grupamento tiol (RSH) (por exemplo GSH) originando um selenilsulfeto, o qual reage com um segundo equivalente de GSH formando um selenol (Se-H), este selenol reduz o H₂O₂ ou peróxidos lipídicos em H₂O, fechando assim o ciclo catalítico (NOGUEIRA e ROCHA, 2010) (Fig.5)

Uma das primeiras evidências das propriedades farmacológicas do (PhSe)₂ foi demonstrado em 2003, quando Nogueira e colaboradores demonstraram as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva deste composto em roedores (2003b). Desde então, estudos têm relatado o importante papel protetor deste composto em uma variedade de modelos experimentais associados à produção exacerbada de EROs e estresse oxidativo tais como, inflamação, diabetes, neurotoxicidade e hepatotoxicidade (GHISLENI *et al.*, 2003; BURGER *et al.*, 2004; MEOTTI *et al.*, 2004; BORGES *et al.*, 2005), além de diversas outras propriedades farmacológicas.

Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que o (PhSe)₂ possui importantes propriedades farmacológicas, que o tornam uma molécula interessante no manejo de doenças cardiovasculares. Além disso, foi demonstrado também que o tratamento por via oral com (PhSe)₂ reduz a hipercolesterolemia e o estresse oxidativo em coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol (DE BEM *et al.*, 2009). O (PhSe)₂ também foi capaz de inibir a oxidação de LDL humana isolada *in vitro* e este efeito foi relacionado com a sua atividade tiol-peroxidase (DE BEM *et al.*, 2008). Além disso, verificamos que este composto foi capaz de reduzir a formação de lesões ateroscleróticas em camundongos LDLr^{-/-} e

diminuir a formação de células espumosas, produção de mediadores inflamatórios e EROs em macrófagos expostos a LDL oxidada (HORT *et al.*, 2011).

Diversas evidências obtidas por estudos em modelos animais e em humanos comprovam o envolvimento da hipercolesterolemia e do envelhecimento na indução do estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Estes fenômenos estão diretamente relacionados à diversas doenças humanas como a aterosclerose e DHGNA. Neste contexto, e diante das importantes propriedades farmacológicas descritas para o $(\text{PhSe})_2$, principalmente pela diminuição da lesão aterosclerótica, nossa hipótese é que a hipercolesterolemia e o envelhecimento induzem disfunção mitocondrial e estresse oxidativo através da modulação dos sistemas relacionados à glutatona e tioredoxina, além de aumentar a produção de espécies reativas, e que o $(\text{PhSe})_2$ poderia melhorar este ambiente redox, favorecendo sua atividade antiaterogênica.

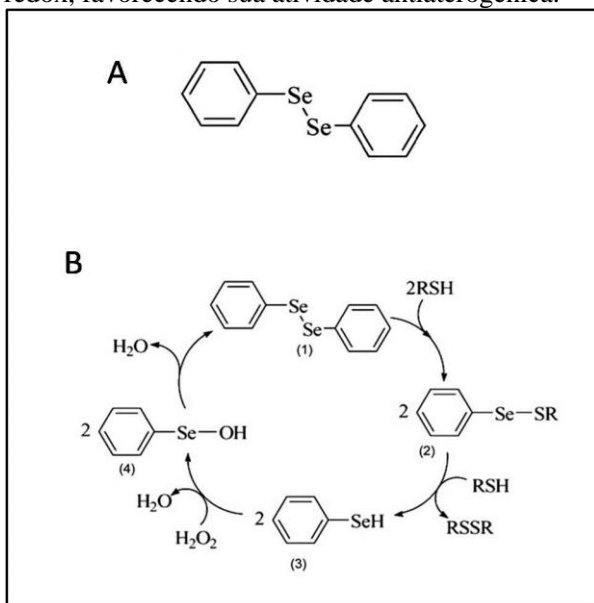


Figura 5: Estrutura química e mecanismo catalítico do Disseleneto de Difenila. (A) Estrutura química do $(\text{PhSe})_2$. (B) Mecanismo catalítico do $(\text{PhSe})_2$ para a detoxificação de peróxido de hidrogênio. O $(\text{PhSe})_2$ reage com um grupamento tiol (ex. GSH) originando um selenilsulfeto, o qual reage com um segundo equivalente de GSH formando um selenol (Se-OH). Finalmente, este selenol reduz o peróxido de hidrogênio ou peróxidos lipídicos liberando uma molécula de água, fechando assim o ciclo catalítico (Fonte: NOGUEIRA *et al.*, 2004)

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho foi investigar o efeito da hipercolesterolemia e do envelhecimento sobre os parâmetros de estresse oxidativo no fígado e no sistema cardiovascular em um modelo experimental de Hipercolesterolemia Familiar. Ademais, avaliamos os possíveis mecanismos que podem estar relacionados ao efeito antiaterogênico do $(\text{PhSe})_2$ neste modelo.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da hipercolesterolemia e do envelhecimento no conteúdo de glutatona e na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em aorta e coração de camundongos C57BL/6 e LDLr^{-/-}.
- Avaliar o efeito do $(\text{PhSe})_2$ no sistema antioxidante relacionado à glutatona e na produção de EROs em aorta e coração de camundongos LDLr^{-/-} jovens e velhos.
- Avaliar o efeito da hipercolesterolemia no sistema antioxidante relacionado à glutatona, na atividade dos complexos da cadeia respiratória e na produção de EROs no fígado de camundongos LDLr^{-/-} alimentados com uma dieta padrão ou enriquecida com colesterol.
- Avaliar o efeito do envelhecimento no sistema antioxidante relacionado à glutatona, na atividade dos complexos da cadeia respiratória e na produção de espécies reativas no fígado de camundongos hipercolesterolêmicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os procedimentos experimentais envolvidos neste estudo foram delineados de tal maneira a minimizar ao máximo o sofrimento dos animais. Além disso, foi utilizado tamanho amostral mínimo e adequado para as análises estatísticas possibilitando a obtenção do máximo de informações relevantes para o cumprimento dos objetivos propostos, de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (PP00553).

3.2. ANIMAIS

Camundongos C57BL/6 homozigotos deficientes para o receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDLr^{-/-}), utilizados como modelo de Hipercolesterolemia Familiar, como descrito previamente (ISHIBASHI *et al.*, 1993), e camundongos C57BL/6 selvagens foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brasil. Os progenitores foram adquiridos do Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EUA). Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos machos (25 a 30 g) com 3 e 12 meses de idade. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas em grupos de cinco animais por caixa (42 x 34 x 17 cm), mantidos em temperatura ambiente controlada (22 ± 2°C), com ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e dieta comercial padrão (Nuvilab CD-1, Nuvital Nutrientes S/A, Paraná, Brasil) no biotério setorial do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais (Departamento de Farmacologia/UFSC).

3.3. REAGENTES

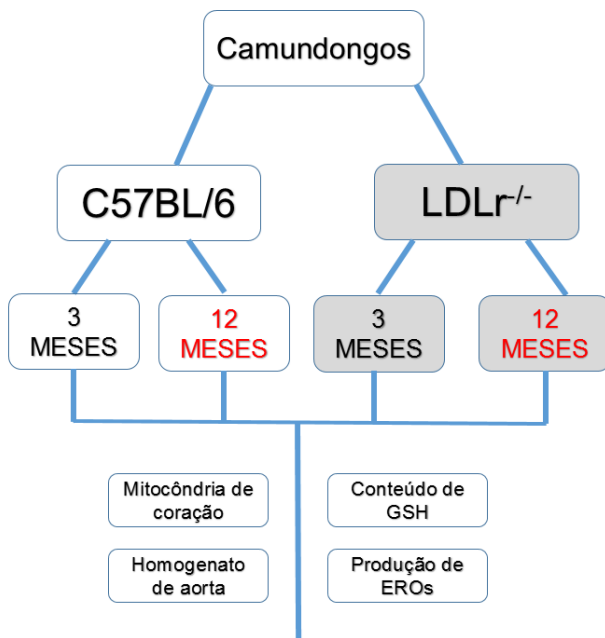
Difenil disseleneto (PhSe)₂ foi sintetizado de acordo com métodos previamente descritos (PAULMIER, 1986). A pureza química do (PhSe)₂ de 99,9% foi determinada por cromatografia líquida de alta performance.

3.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 1 – SISTEMA CARDIOVASCULAR

3.4.1. Protocolo experimental 1 a:

Com o objetivo de avaliar o efeito da hipercolesterolemia e do envelhecimento no conteúdo de GSH e na produção de EROs na aorta e no coração, o seguinte protocolo foi realizado:

Camundongos C57BL/6 selvagens e LDLr^{-/-} machos de 3 meses (jovens) e 12 meses (velhos) alimentados com uma dieta comercial padrão (Nuvilab CD-1, Nuvital Nutrientes S/A, Paraná, Brasil) totalizando 4 grupos experimentais. Os animais foram privados de alimento durante uma noite e o sangue foi coletado a partir do plexo ocular (sob anestesia) para posterior determinação de colesterol plasmático. Após, os animais foram eutanasiados por decapitação, a aorta e o coração foram rapidamente removidos para análises bioquímicas.

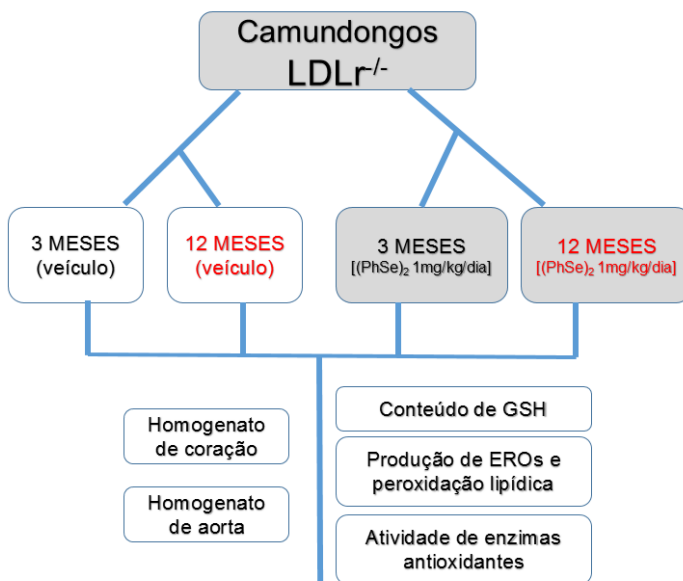


Esquema 1 – Resumo do protocolo experimental 1ª

3.4.2. Protocolo experimental 1 b:

Com o objetivo de avaliar o efeito do $(\text{PhSe})_2$ e do envelhecimento nos parâmetros de estresse oxidativo no coração e na aorta de camundongos hipercolesterolêmicos, o seguinte protocolo foi realizado:

Camundongos $\text{LDLr}^{-/-}$ machos de 3 e 12 meses de idade alimentados com uma dieta comercial padrão foram tratados por 30 dias com $(\text{PhSe})_2$ (1mg/kg/dia) ou com veículo (óleo de canola) por via oral, totalizando 4 grupos experimentais. Os animais foram privados de alimento durante uma noite e o sangue foi coletado a partir do plexo ocular para posterior determinação do perfil lipídico. Após, os animais foram eutanasiados por decapitação, a aorta e o coração foram rapidamente removidos para análises bioquímicas.



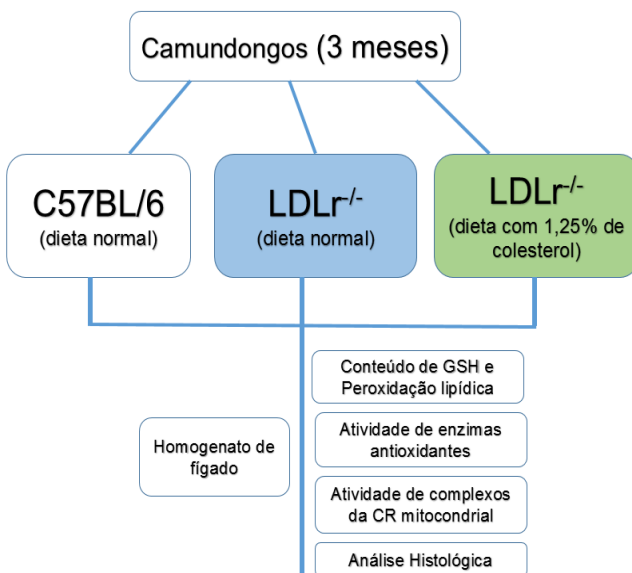
Esquema 2 – Resumo do protocolo experimental 1b

3.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 2 – TECIDO HEPÁTICO

3.5.1. Protocolo experimental 2 a:

Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes níveis de hipercolesterolemia sobre os marcadores de estresse oxidativo, na atividade de complexos da cadeia respiratória na função mitocondrial e no acúmulo de lipídeos, o seguinte protocolo foi realizado:

Camundongos C57BL/6 selvagens machos de 3 meses de idade (24-26g) alimentados com uma dieta comercial padrão foram utilizados como controle. Camundongos LDLr^{-/-} machos de 3 meses de idade (24-26g) foram divididos em dois grupos experimentais, sendo que um foi alimentado com dieta padrão e o outro com dieta hipercolesterolêmica (1,25% de colesterol), como descrito anteriormente por (HORT *et al.*, 2011). Após 30 dias, os animais foram privados de alimento durante uma noite e o sangue foi coletado a partir do plexo ocular (sob anestesia) para posterior determinação de colesterol plasmático. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por decapitação e o fígado foi rapidamente removido para a execução das análises bioquímicas e histológicas.

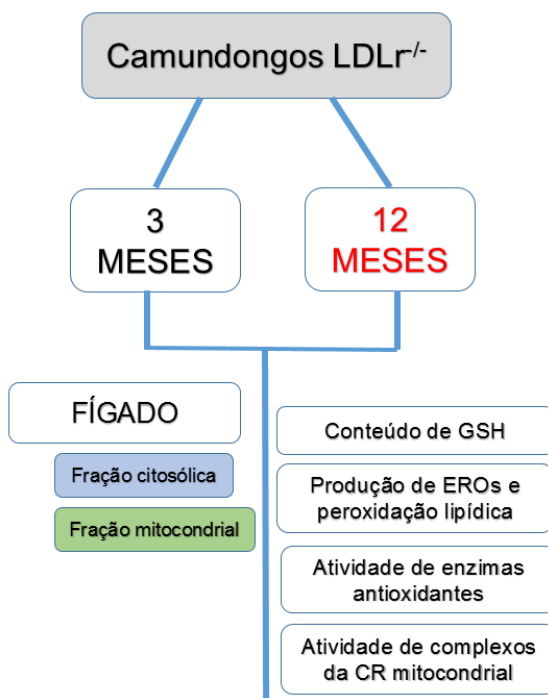


Esquema 3 – Resumo do protocolo experimental 2a

3.5.2. Protocolo experimental 2 b:

Com o objetivo de avaliar o efeito do envelhecimento sobre os marcadores de estresse oxidativo no fígado de camundongos hipercolesterolêmicos, o seguinte protocolo foi realizado:

Camundongos LDLr^{-/-} machos (24-26g), alimentados com uma dieta padrão comercial foram divididos em 2 grupos experimentais: camundongos jovens (com 3 meses de idade) e camundongos velhos (com 12 meses de idade). Os animais foram eutanasiados por decapitação e o fígado foi rapidamente removido para análises bioquímicas.



Esquema 4 – Resumo do protocolo experimental 2b

3.6. DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL TOTAL E PERFIL LIPÍDICO

O colesterol total (CT), HDL colesterol e triacilgliceróis (TG) foram medidos no plasma sanguíneo utilizando kits enzimáticos (Gold Analisa Diagnóstica Ltda., Minas Gerais, Brasil). A concentração de colesterol não-HDL colesterol (VLDL+LDL+IDL) foi calculado usando a equação: $(VLDL+LDL+IDL) = CT - HDL$.

3.7. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE BIOQUÍMICAS

3.7.1. Preparação das amostras para determinação de parâmetros de estresse oxidativo

Para as análises dos parâmetros de estresse oxidativo, aorta, coração e fígado foram homogeneizados em 10 volumes de tampão fosfato (50 mM, pH 7.4). Os homogenatos dos tecidos foram centrifugados a $1.000 \times g$ durante 10 min a 4°C , para eliminação de núcleo e fragmentos celulares. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante foi utilizado para as determinações.

3.7.2. Preparação das amostras para determinação da atividade de complexos da cadeia respiratória

Para as análises da atividade dos complexos da cadeia respiratória, uma porção do fígado foi homogeneizado em 10 volumes de tampão fosfato, pH 7.4, contendo 5 mM de KH_2PO_4 , 0.3 M de sacarose, 5 mM de MOPS, 1mM de EGTA e 0.1% de albumina. Os homogenatos de tecido foram centrifugados a $1.000 \times g$ durante 10 min a 4°C , para eliminação de núcleo e fragmentos celulares. O *pellet* foi descartado e os sobrenadantes foram usados para as determinações (LATINI *et al.*, 2005).

3.7.3. Preparação das frações mitocondrial e citosólica

Para a preparação das frações mitocondrial e citosólica, foi utilizado o método de centrifugação diferencial como descrito anteriormente (FREZZA, CIPOLAT e SCORRANO, 2007), mas com algumas modificações. O coração e o fígado (cerca de 0,2-0,25g de tecido) foram homogeneizados em 10 volumes de tampão fosfato, pH 7.4, contendo 5 mM de KH_2PO_4 , 0.3 M de sacarose, 5 mM de MOPS, 1mM de EGTA e 0.1% de albumina. Os homogenatos foram então centrifugados a $1500 \times g$ durante 10 min a 4°C . Esta primeira centrifugação serve para a eliminação de núcleos e fragmentos celulares. Após, o sobrenadante é recolhido e novamente centrifugado a $15000 \times g$ durante 10 min a 4°C , com o objetivo de separar as organelas, (neste

caso, as mitocôndrias se depositam no fundo do tubo, formando o *pellet* mitocondrial). O sobrenadante é recolhido tornando-se a fração citosólica e o sedimento foi ressuspenso em 500 uL de tampão descrito acima, tornando-se a fração mitocondrial.

3.8. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA

Para determinar os níveis de glutathiona nos diferentes homogenatos (fígado, coração e aorta), foi utilizado o método fluorimétrico de (HISSIN e HILF, 1976), com algumas modificações. Este método baseia-se no princípio de que os grupos tióis da GSH reagem especificamente com orto-fitalaldeído (OPT) a pH 8, resultando na formação de um produto altamente fluorescente que é excitado a 350 nm com uma emissão a 420 nm. Após homogeneização, uma alíquota de cada tecido foi misturado ao ácido perclórico (0,6 M), e centrifugado a 1000 x g durante 10 min a 4 °C para a precipitação de proteínas. Posteriormente o sobrenadante foi adicionado a 1,8 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8.0 e a 100 ul de OPT (1 mg/ml), que foi medido a fluorescência no leitor de placas multifuncional (TECAN - Áustria).

3.9. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE

A atividade da enzima glutathiona redutase (GR) foi determinada pelo método de Carlberg e Mannervik (1975). Neste método a glutathiona redutase cataliza a redução da glutathiona oxidada (GSSG) em presença de NADPH. A amostra foi adicionada a um meio de reação (MIX) contendo 50 mM de tampão fosfato pH 7,0 e 0,24 mM de NADPH. A reação foi iniciada pela adição de 1,0 mM de glutathiona oxidada. O consumo de NADPH para NADP^+ foi monitorado por 5 min a 340 nm. A atividade da enzima foi expressa em unidades. Uma unidade de GR corresponde à formação de 1,0 umol de NADP^+ a partir de NADPH por minuto, a pH 7,4 e 37 °C (utilizando um coeficiente extinção molar de $6,22 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para NADPH).

3.10. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE

A atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) foi determinada de acordo com o método de Wendel (1981). Neste método, a glutathiona peroxidase catalisa a oxidação da glutathiona em presença de peróxido de t-butil hidroperóxido. A glutathiona oxidada é convertida em sua forma reduzida pela glutathiona redutase e NADPH. As amostras

foram adicionadas a um meio de reação (MIX) contendo 1 mM de GSH, 50 mM de tampão fosfato pH 7,0, 0,2 unidades de glutatona redutase e 0,2 mM de NADPH. A reação foi iniciada pela adição de 1,0 mM de peróxido de t-butil hidroperóxido. O conversão de NADPH para NADP⁺ foi monitorado por 5 min a 340 nm. A atividade da enzima foi expressa em unidades. Uma unidade de GPx corresponde à formação de 1,0 umol de NADP⁺ a partir de NADPH por minuto, a pH 7,4 e 37 ° C (utilizando um coeficiente extinção molar de 6,22 M⁻¹.cm⁻¹ para NADPH).

3.11. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA TIORREDOXINA REDUTASE

A atividade da tiorredoxina redutase foi medida utilizando o método descrito por Holmgren e Bjornstedt (1995). Resumidamente, a reação foi iniciada pela adição de 20 ul de homogenato em 200 ul de MIX, contendo DTNB 5 mM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM e BSA 0,2 mg em pH 7,4. Após 5 min de leitura espectrofotométrica, foi adicionado à reação 10ul de NADPH na concentração final de 0,2 mM, e a redução do DTNB para TNB foi monitorado a 412 nm por 5 min no espectrofotômetro (TECAM, Áustria). Os resultados foram expressos em nmol de NADPH consumido por min por mg de proteínas.

3.12. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS

Após a preparação das amostras, uma alíquota foi incubada com 2', 7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (80 mM) a 37 ° C durante 30 min. DCFH-DA é des-esterificada no interior das células por esterases endógenas para o ácido livre ionizado, DCFH. DCFH é então oxidado para o fluorescente 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF) por hidroperóxidos (HEMPEL *et al.*, 1999). A formação do derivado oxidado fluorescente (DCF) foi monitorizado a comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525 nm, respectivamente, utilizando um leitor de placas multifuncional (TECAM, Áustria). A produção de espécies reativas foi quantificada utilizando uma curva padrão DCF e os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência.

3.13. DETERMINAÇÃO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

O grau de peroxidação lipídica foi medido através dos níveis teciduais de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBArS), como descrito pelo método de Ohkawa (1979). O malondialdeído (MDA) é o produto final da peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um complexo colorido. Alíquotas de homogenatos

teciduais foram centrifugadas em ácido tricloroacético (TCA) 20% e o sobrenadante foi incubado a temperatura de 100° por 45 minutos, em meio contendo 0,6% de ácido tiobarbitúrico (TBA). Após foi feita a leitura em 540 nm. Para o cálculo dos níveis de peroxidação lipídica foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5$ M/cm.

3.14. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO I (NADH-DESIDROGENASE)

Para a determinação da atividade do complexo I da cadeia respiratória, foi utilizado o método de Cassina e Radi (1996), com modificações. O fundamento consiste na diminuição da absorbância à 420 nm em função da redução do férric-cianeto (FeCN) pela NADH desidrogenase a partir do NADH. As amostras (cerca de 0,2 - 0,4 mg de proteínas) foram adicionadas a um meio de reação contendo tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4, rotenona 80 uM, FeCN 500 uM. A reação foi iniciada após a adição 0,2 mM de NADH e monitorada pro 5 mim. Os resultados foram expressos em nmols de FeCN reduzido por mim por mg de proteínas. Para os cálculos foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para o FeCN.

3.15. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO 2 (SUCCINATO-DESIDROGENASE)

Para a determinação da atividade do complexo II da cadeia respiratória, foi medida a diminuição da absorbância em função da redução do 2,6-dicloindofenol (DCIP) pela succinato desidrogenase à 600 nm, como descrito por Fischer e col. (1985). As amostras foram pré-incubadas, por 20 min à 37°C, em meio de reação contendo tampão fosfato de sódio 6,2 mM, pH 7,4, succinato de sódio 16 mM, DCIP 8,0 uM. Após incubação, 4,0 mM de azida sódica e 7,0 uM de rotenona foram adicionados, e posteriormente a reação foi iniciada pela adição de 40 uM de DCIP e foi monitorada por 5 min à 37°C. Os resultados forma expressos em nmols de DCIP reduzido por mim por mg de proteínas. Para os cálculos foram utilizados o coeficiente de extinção molar de $20,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para o DCIP.

3.16. HISTOLOGIA

Para a determinação do acúmulo de lipídeos no fígado, os camundongos foram avaliados quanto a formação de vacúolos no citoplasma das células do tecido hepático. Amostras de fígado foram fixadas em formalina 4%. Para a análise de microscopia de luz, as amostras foram incluídas em parafina, seccionados em 7 um e coradas

com hematoxilina e eosina. Como descrito em (STRALIOTTO *et al.*, 2010).

3.17. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

O conteúdo de proteínas foi determinado de acordo com o método de Lowry (1951), utilizando albumina bovina sérica como padrão.

3.18. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram expressos como média \pm SEM. As análises estatísticas foram realizadas utilizando análises de variância (ANOVA) de um ou duas vias e também o teste “t” de Student não pareado quando apropriado. Posteriormente, comparações entre grupos foram realizadas com o emprego dos testes *post hoc* de Tukey’s. Todos os testes foram realizados utilizando o pacote de software Statistica® (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

Correlações de Pearson (r, P) foram calculados para as associações entre níveis de colesterol no plasma e os níveis de GSH, peroxidação lipídica, atividade da GR e porcentagem de vacúolos no fígado (o gráfico inclui os valores de todos os grupos de animais).

4. RESULTADOS

4.1. EFEITO DA HIPERCOLESTEROLEMIA E DO ENVELHECIMENTO SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA CARDIOVASCULAR

4.1.1. Efeito da deleção do gene para o receptor de LDL e do envelhecimento sobre os níveis plasmáticos de colesterol total

Com o objetivo de verificar o efeito da deficiência do receptor de LDL e do possível efeito do envelhecimento sobre os níveis de colesterol total, foram dosados os níveis de colesterol plasmático dos camundongos C57BL/6 e dos camundongos LDLr^{-/-} jovens e velhos.

A análise de variância de duas vias (ANOVA) revelou um efeito significativo da deficiência do receptor de LDL ($P \leq 0,001$) sobre os níveis de colesterol plasmático. Posterior teste post-hoc de Tukey's indicou um aumento nos níveis de colesterol nos camundongos LDLr^{-/-}. Esses resultados estão de acordo com Ishibashi e col. (1993), que demonstraram que os camundongos LDLr^{-/-} possuem aumento de cerca de 2 a 3 vezes nos níveis plasmáticos de colesterol, quando alimentados com uma dieta com teor normal de gordura. A ANOVA de duas vias não revelou efeito do envelhecimento nos níveis de colesterol total (Tabela1).

Tabela 1. Níveis Plasmáticos de Colesterol Total

	C57BL/6		LDLr ^{-/-}	
	3 m.	12 m.	3 m.	12 m.
Colesterol Total (mg/dl)	98,4±9,89	93,0±7,58	184,84±8,44	208,75±10,99

Os dados são apresentados como Média ± Erro Padrão de 5-6 animais.

Análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido pelo pos-hoc teste de tukey's. ***p≤0,001 comparado com C57BL/6

4.1.2. Efeito da hipercolesterolemia e do envelhecimento sobre o conteúdo de GSH e produção de EROs

Com o objetivo de avaliar o efeito da hipercolesterolemia e do envelhecimento sobre o conteúdo de GSH e produção de EROs, homogenatos de aorta e mitocôndrias de coração de camundongos C57BL/6 e LDLr^{-/-} jovens e velhos foram avaliados quanto aos níveis de GSH e produção de EROs.

A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo da hipercolesterolemia ($P \leq 0,01$) no conteúdo de GSH. Posterior teste post-hoc de Tukey's indicou uma diminuição no conteúdo de GSH na aorta dos camundongos hipercolesterolêmicos em ambas as idades (Figura

6A). Notavelmente, o conteúdo de GSH foi correlacionado negativamente com os níveis plasmáticos de colesterol total, o que sugere uma possível ligação entre a hipercolesterolemia e um declínio no sistema antioxidante relacionado à GSH em aorta de camundongos LDLr^{-/-} (Figura 6E).

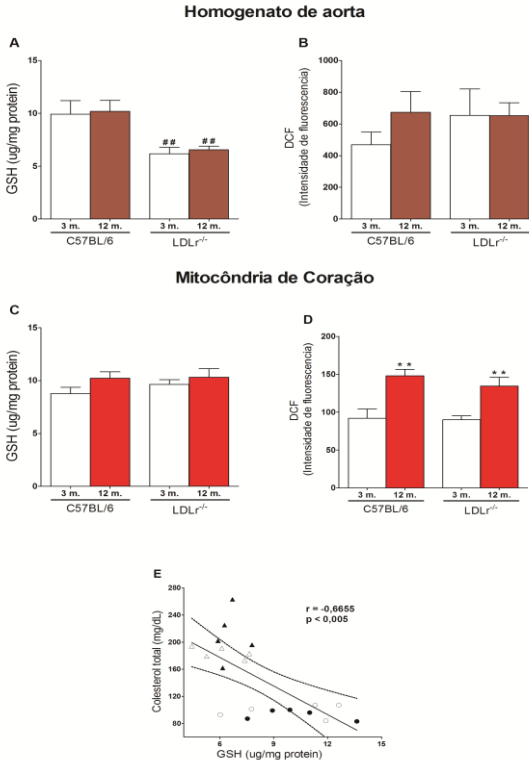


Figura 6. Efeito da hipercolesterolemia e do envelhecimento em homogenato de aorta e mitocôndria de coração. (A) Níveis de GSH, (B) produção de EROs em homogenato de aorta; (C) níveis de GSH e (D) produção de EROs em mitocôndrias de coração de camundongos C57BL/6 e LDLr^{-/-} jovens e velhos. Os dados são expressos como média \pm SEM de 5-6 animais por grupo. ** $P \leq 0,01$ indica a diferença quando comparados com os animais jovens. ## $P < 0,01$ indica a diferença em comparação com C57BL/6 (ANOVA de duas vias, seguido de teste de Tukey's). (E) Gráfico de dispersão da relação entre os níveis de GSH em aorta e de colesterol plasmático; os dados são obtidos a partir da Tabela 1 e Figura 1A, respectivamente. Círculos representam camundongos C57BL/6 e triângulos representam camundongos LDLr^{-/-}. Cor branca representam jovem e de cor preta representam animais velhos. Coeficiente de Pearson: $-0,665$ ($P \leq 0,05$).

Esta incapacidade de montar uma resposta antioxidante pode ser a base para o dano vascular acelerado em camundongos LDLr^{-/-} (COLLINS *et al.*, 2009). Apesar dos níveis mais baixos de GSH em homogenato de aorta de camundongos LDLr^{-/-}, não observamos diferenças na produção de EROs (Figura 6B).

Estudos anteriores demonstram que mitocôndrias de vários tecidos de camundongos LDLr^{-/-} apresentam menor conteúdo de NADPH e maior produção de EROs (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Neste estudo não observamos um efeito da hipercolesterolemia na produção de EROs em mitocôndrias de coração (Figura 6C). Entretanto, ANOVA de duas vias apontou um efeito significativo do envelhecimento ($P \leq 0,01$) na produção de EROs. Posterior teste post-hoc de Tukey's indicou um aumento significativo na produção EROs nos animais velhos de ambos genótipos (Figura 6D).

4.2. EFEITO DO (PhSe)₂ E DO ENVELHECIMENTO SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA CARDIOVASCULAR DE CAMUNDONGOS LDLR^{-/-}

Estudo anterior de nosso grupo, mostrou o efeito antiaterogênico do (PhSe)₂ através da modulação de vias antioxidantes e anti-inflamatórias em camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta rica em colesterol (HORT *et al.*, 2011). Dessa forma, neste estudo tornou-se interessante avaliar o efeito do (PhSe)₂ e do envelhecimento sobre os marcadores de estresse oxidativo em coração e aorta de camundongos hipercolesterolêmicos com o intuito de explicar o possível mecanismo de ação antiaterogênica do composto.

4.2.1. Efeito do (PhSe)₂ e do envelhecimento sobre os níveis de lipídeos plasmáticos de camundongos LDLr^{-/-}

Com o objetivo de avaliar o efeito do (PhSe)₂ e do envelhecimento sobre o perfil lipídico de camundongos LDLr^{-/-}, foram avaliados os níveis de colesterol total, HDL-colesterol, não-HDL-colesterol e triacilgliceróis no plasma dos camundongos LDLr^{-/-}. A análise de variância de duas vias não indicou efeito significativo do (PhSe)₂ e do envelhecimento sobre os níveis de lipídeos plasmáticos (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil Lipídico de Camundongos LDLr^{-/-}

	Veículo		(PhSe) ₂	
	3 m.	12 m.	3 m.	12 m.
Colesterol Total (mg/dl)	211,5±22,2	207,2 ± 11,2	197,8 ± 13,4	223,7 ± 22,9
HDL-colesterol (mg/dl)	28,5 ± 1,6	27,3 ± 0,9	23,4 ± 1,7	24,5 ± 1,2
não-HDL-colesterol (mg/dl)	182,9 ± 22,7	170,5 ± 13,8	183,5 ± 12,3	199,2 ± 23,7
Triacilgliceróis (mg/dl)	171,4 ± 5,3	194,9 ± 12,9	267,4 ± 32,4	219,0 ± 19,2

Os dados são apresentados como Média ± Erro Padrão de 5-6 animais.

Análise de variância de duas vias (ANOVA).

4.2.2. Efeito do (PhSe)₂ e do envelhecimento sobre os parâmetros de estresse oxidativo em homogenato de coração

Com o objetivo de avaliar o efeito do (PhSe)₂ e do envelhecimento sobre os parâmetros de estresse oxidativo, foram dosados o conteúdo de GSH, a atividade das enzimas GPx, GR e TrxR, além da produção de EROs e níveis de peroxidação lipídica no coração de camundongos LDLr^{-/-}.

Sistemas antioxidantes enzimáticos relacionados à GSH e TrxR, são de fundamental importância para a detoxificação de peróxidos, especialmente no sistema cardiovascular (PARK e OH, 2011). A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do tratamento com (PhSe)₂ no conteúdo de GSH ($P \leq 0,05$), nas atividades enzimáticas da GR ($P \leq 0,05$) e TrxR ($P \leq 0,05$) e na peroxidação lipídica ($P \leq 0,05$). Posterior teste post-hoc de Tukey's indicou que o (PhSe)₂ aumentou o conteúdo de GSH nos animais velhos (Figura 7A), aumentou a atividade da GR (Figura 7B) e da TrxR (Figura 7D) nos animais jovens no coração de camundongos LDLr^{-/-}. Além do mais, o tratamento com (PhSe)₂ diminuiu a peroxidação lipídica nos camundongos hipercolesterolêmicos jovens (Figura 7E). Esses dados sugerem que o (PhSe)₂ melhorou a defesa antioxidante no coração de camundongos LDLr^{-/-} jovens. Entretanto, não foi observado efeito do (PhSe)₂ na atividade da GPx (Figura 7C) e na produção de EROs (Figura 7F).

Quanto ao envelhecimento, a ANOVA de duas vias, apontou um efeito significativo do fator idade na atividade da TrxR ($P \leq 0,05$). Posterior teste post-hoc de Tukey's indicou que o animais hipercolesterolêmicos velhos possuem menor atividade da TrxR em comparação aos animais jovens (Figura 7D).

Homogenato de Coração

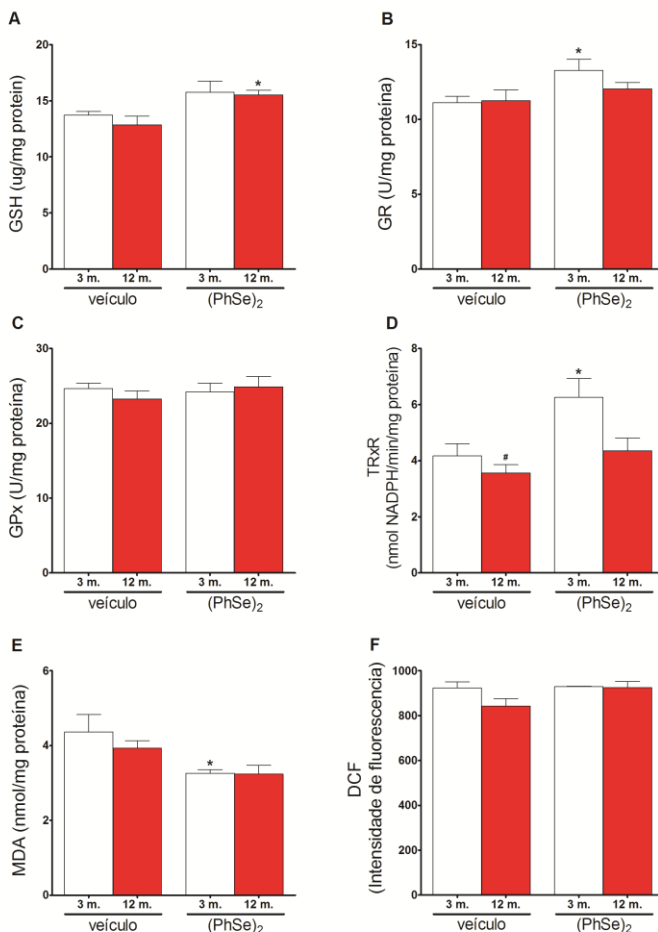


Figura 7. Efeito do (PhSe)₂ e do envelhecimento sobre os parâmetros de estresse oxidativo em homogenato de coração. (A) Níveis de GSH, (B) atividade da GR, (C) atividade da GPx, (D) atividade da TrxR, (E) níveis de peroxidação lipídica e (F) produção de EROs em coração de camundongos hipercolesterolêmicos jovens e velhos. Os dados são expressos como média \pm SEM de 5-6 animais por grupo. * $P \leq 0,05$ indica a diferença quando comparado com o veículo. # $P \leq 0,05$ indica a diferença quando comparados com os animais jovens (ANOVA de duas vias, seguido de teste de Tukey's).

4.2.3. Efeito do (PhSe)₂ e do envelhecimento sobre os parâmetros de estresse oxidativo em homogenato de aorta

Com o objetivo de avaliar o efeito do (PhSe)₂ e do envelhecimento sobre os parâmetros de estresse oxidativo, foram dosados o conteúdo de GSH, a atividade das enzimas GPx e GR e os níveis de peroxidação lipídica na aorta de camundongos LDLr^{-/-}.

A análise de variância de duas vias indicou um efeito significativo ($P \leq 0,01$) na atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR em homogenato de aorta. Posterior teste post-hoc de Tukey's indicou que o (PhSe)₂ aumentou a atividade da GPx nos animais jovens e velhos, e da GR nos animais velhos (Figura 8C-D).

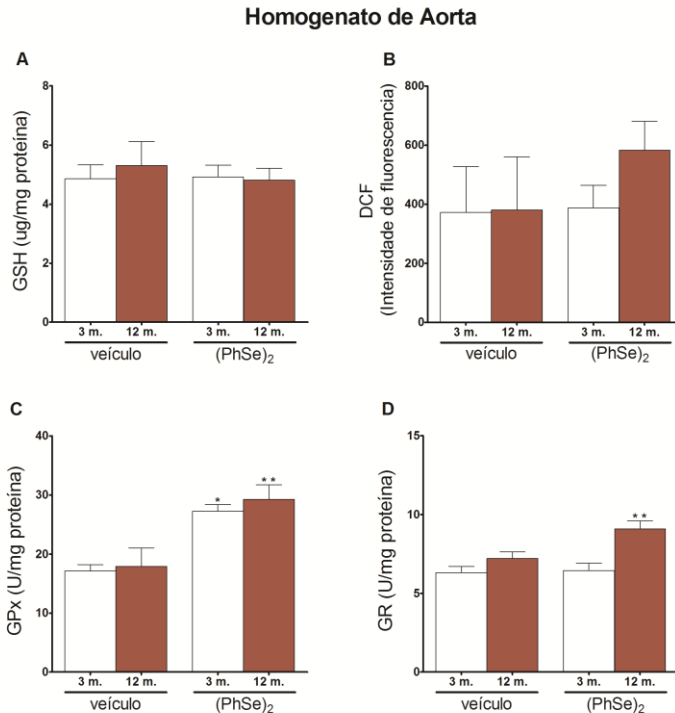


Figura 8. Efeito do (PhSe)₂ e do envelhecimento sobre os parâmetros de estresse oxidativo em homogenato de aorta. (A) Níveis de GSH, (B) produção de EROs, (C) atividade da GPx, (D) atividade da GR em aorta de camundongos hipercolesterolêmicos jovens e velhos. Os dados são expressos como média \pm SEM de 5-6 animais por grupo. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ indica a diferença quando comparado com o veículo (ANOVA de duas vias, seguido de teste de Tukey's).

No entanto, não houve efeito do tratamento com $(\text{PhSe})_2$, observada por ANOVA de duas vias, no conteúdo de GSH e na produção de EROs na aorta dos camundongos $\text{LDLr}^{-/-}$ (Figura 8A-B). ANOVA de duas vias não indicou efeito do envelhecimento nestes parâmetros de estresse oxidativo em aorta de camundongos $\text{LDLr}^{-/-}$ (Figura 8).

4.3. EFEITO DA HIPERCOLESTEROLEMIA E DO ENVELHECIMENTO SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL E ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS

4.3.1. Níveis plasmáticos de colesterol total de camundongos alimentados com uma dieta padrão ou hipercolesterolêmica

Com o objetivo de verificar o aumento nos níveis de colesterol nos animais deficientes para o receptor da LDL, foram dosados os níveis plasmáticos de colesterol dos camundongos C57BL/6 e dos camundongos $\text{LDLr}^{-/-}$ alimentados com uma dieta padrão ou hipercolesterolêmica.

A análise de variância efetuada através da ANOVA de uma via revelou um efeito significativo da deleção genética do receptor da LDL nos níveis plasmáticos de colesterol total (Figura 9).

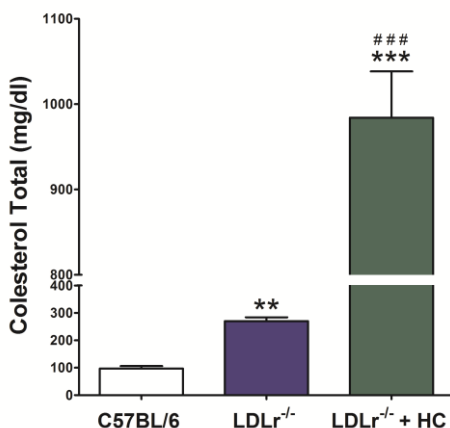


Figura 9. Níveis plasmáticos de colesterol total de camundongos alimentados com uma dieta padrão ou hipercolesterolêmica. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 5-6 animais. ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, quando comparado com o grupo controle C57BL/6, ### $P \leq 0,001$ quando comparado com o grupo $\text{LDLr}^{-/-}$ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey's).

Posterior teste post-hoc de Tukey's indicou um aumento nos níveis de colesterol em cerca de 3 vezes ($P \leq 0,01$) no grupo LDLr^{-/-} e cerca de 3 a 4 vezes ($P \leq 0,001$) naquele grupo alimentado com uma dieta rica em colesterol. Estes dados estão de acordo com estudos anteriores que demonstram uma intensa elevação do colesterol plasmático nos camundongos LDLr^{-/-}, confirmando o modelo de hipercolesterolemia familiar (ISHIBASHI *et al.*, 1993).

4.3.2. Efeito da hipercolesterolemia no sistema antioxidante relacionado à glutatona e na peroxidação lipídica em fígado de camundongos

Com o objetivo de investigar o efeito da hipercolesterolemia nos parâmetros de estresse oxidativo no tecido hepático, homogenatos de fígado de camundongos C57BL/6 e camundongos LDLr^{-/-} alimentados com uma dieta padrão ou enriquecida com colesterol foram avaliados quanto aos níveis de glutatona, peroxidação lipídica e atividades das enzimas antioxidantes GR e GPx.

A análise de variância efetuada através da ANOVA de uma via revelou um efeito significativo da hipercolesterolemia nos níveis de glutatona (Figura 10A). Posterior teste post-hoc de Tukey's indicou que a deleção do gene do receptor de LDL, a qual induz um aumento nos níveis de colesterol em cerca de 3 vezes, causou uma diminuição significativa nos níveis de glutatona no grupo LDLr^{-/-} ($P \leq 0,05$) e este efeito foi mais intenso quando estes animais receberam uma dieta rica em colesterol ($P \leq 0,01$). Para avaliar a existência de uma correlação entre os altos níveis plasmáticos de colesterol e a diminuição nos níveis de glutatona, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r), o que qual indicou uma correlação negativa ($r = -0,6724$; $P \leq 0,01$) entre os níveis plasmáticos de colesterol e os níveis de glutatona (Figura 12A).

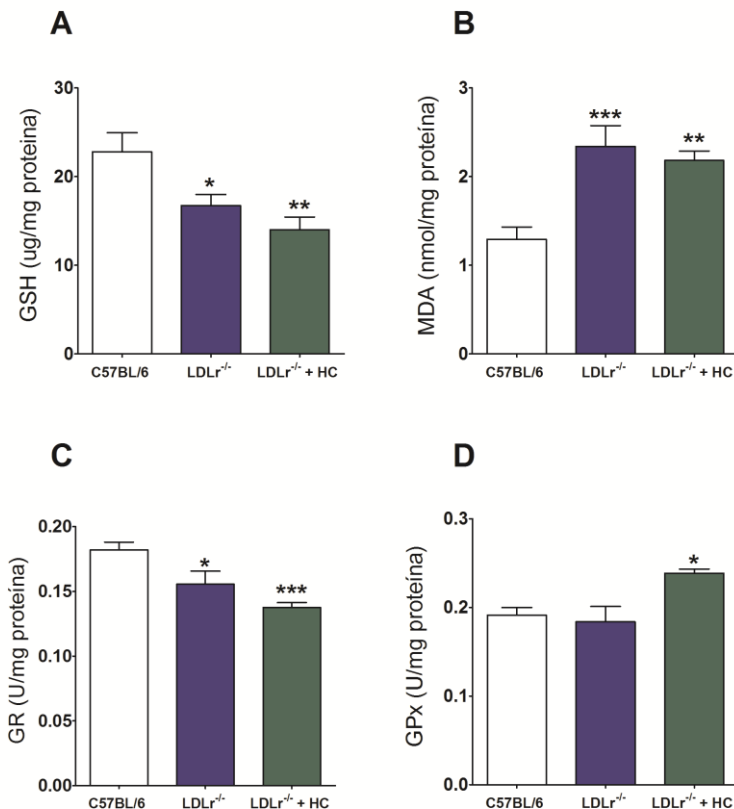


Figura 10. Efeito da hipercolesterolemia no sistema antioxidante relacionado à glutatona e produção de EROs. (A) Níveis de GSH, (B) níveis de MDA, (C) atividade da GR e (D) atividade da GPx em fígado de camundongos C57BL/6 e LDLr^{-/-} alimentados ou não com uma dieta enriquecida com colesterol. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 5-6 animais. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, quando comparado com o grupo controle C57BL/6 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey's).

Em relação a avaliação da peroxidação lipídica no tecido hepático, a análise de variância efetuada através da ANOVA de uma via revelou um efeito significativo da hipercolesterolemia. Posterior teste post-hoc de Tukey's indicou um aumento significativo nos níveis de peroxidação lipídica tanto no grupo LDLr^{-/-} quanto no grupo LDLr^{-/-} alimentado com uma dieta hipercolesterolêmica (Figura 10B). Além

disso, foi observado uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de colesterol e a peroxidação lipídica, através do coeficiente de correlação de Pearson ($r=5390$; $P\leq 0,05$) (Figura 12C).

A hipercolesterolemia apresentou um efeito dual sobre as atividades das enzimas antioxidantes GR e GPx. A análise de variância de uma via (ANOVA) revelou um efeito significativo da hipercolesterolemia na atividade da glutatona redutase. Posterior teste post-hoc de Tukey's indicou uma diminuição significativa na atividade da GR no grupo LDLr^{-/-} ($P\leq 0,05$) e uma diminuição ainda mais intensa ($P\leq 0,001$) quando os camundongos LDLr^{-/-} foram tratados com uma dieta rica em colesterol (Figura 10C), a qual aumentou os níveis plasmáticos deste lipídeo em cerca de 3 a 4 vezes. Através do coeficiente de correlação de Pearson foi observado uma correlação negativa ($r=-7346$; $P\leq 0,01$) entre os níveis plasmáticos de colesterol e a atividade da GR (Figura 11B). Por outro lado, a atividade da GPx aumentou significativamente ($P\leq 0,05$, ANOVA, post-hoc de Tukey's) somente nos camundongos LDLr^{-/-} alimentados com a dieta hipercolesterolêmica (Figura 10D).

4.3.3. Efeito da hipercolesterolemia na atividade de complexos da cadeia respiratória no fígado de camundongos

Com o objetivo de investigar o efeito da hipercolesterolemia em parâmetros de bioenergética no sistema hepático, homogenatos de fígado de camundongos C57BL/6 e LDLr^{-/-} alimentados com uma dieta padrão ou enriquecida com colesterol foram avaliados quanto atividade do complexo 1 e 2 da cadeia transportadora de elétrons.

A análise de variância efetuada através da ANOVA de uma via revelou um efeito significativo da hipercolesterolemia na atividade do complexo 1 da cadeia respiratória. Posterior teste post-hoc de Tukey's indicou uma diminuição significativa na atividade do complexo 1 ($P\leq 0,05$) no grupo LDLr^{-/-} alimentado com a dieta rica em colesterol (Figura 11A). Por outro lado, a análise de uma via não revelou um efeito significativo da hipercolesterolemia na atividade do complexo 2 da cadeia respiratória (Figura 11B).

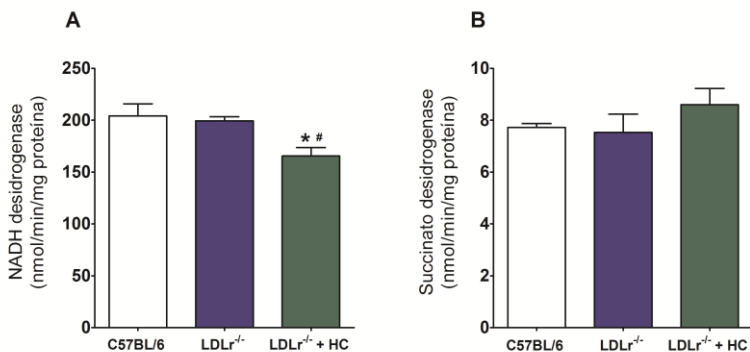


Figura 11. Efeito da hipercolesterolemia nos complexos da cadeia respiratória. (A) complexo 1, (B) complexo 2 em fígado de camundongos C57BL/6 e LDLr^{-/-} alimentados ou não com uma dieta enriquecida com colesterol. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 5-6 animais. * $P \leq 0,05$, quando comparado com o grupo controle, # $P \leq 0,05$, quando comparado com o grupo LDLr^{-/-} (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey's).

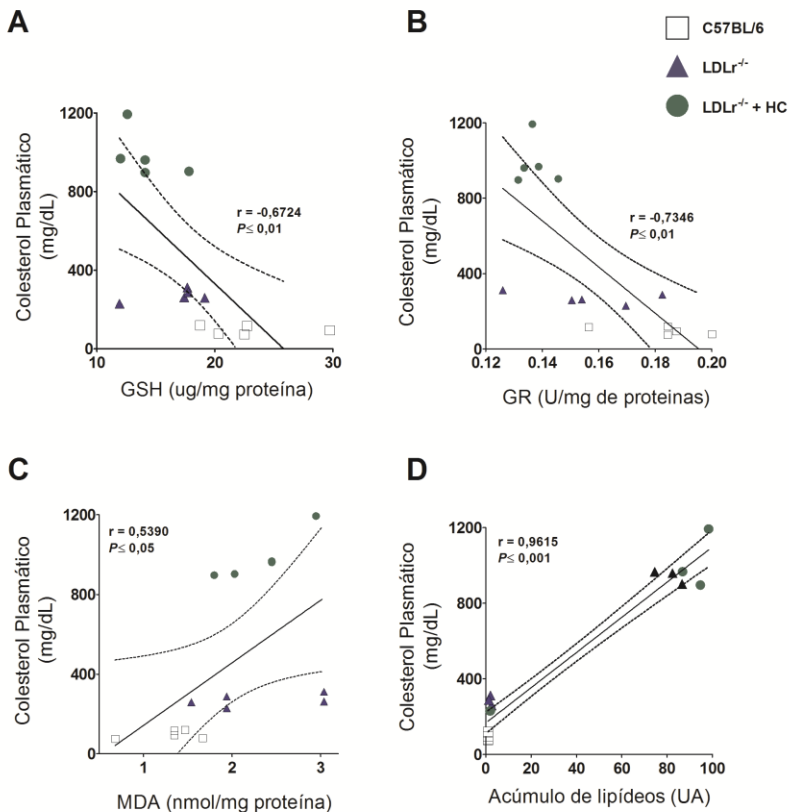


Figura 12. Gráficos de dispersão entre os níveis plasmáticos de colesterol e: (A) níveis de glutatona, (B) atividade da GR, (C) peroxidação lipídica e (D) acúmulo de lipídeos no fígado. Os dados foram obtidos a partir dos dados da tabela 3, figura 9A-C e da figura 12. Os quadrados representam os animais controles C57bl/6, os triângulos representam os LDLr^{-/-} e os círculos representam os LDLr^{-/-} + HC (Coeficiente de correlação de Pearson).

4.3.4. Efeito da hipercolesterolemia sobre o acúmulo de lipídeos no fígado de camundongos

Com o objetivo de investigar se o aumento no nível plasmático de colesterol leva o acúmulo de lipídeos no fígado, camundongos e LDLr^{-/-} alimentados com uma dieta padrão ou hipercolesterolêmica foram avaliados quanto a alteração histológica do tecido hepático.

A análise de variância efetuada através de ANOVA de uma via revelou um efeito significativo da hipercolesterolemia na acumulação

lipídica do tecido hepático. Posterior teste post-hoc de Tukey's indicou um aumento significativo na quantidade de vacúolos lipídicos no fígado ($P \leq 0,001$) em camundongos $LDLr^{-/-}$ e quando alimentados com uma dieta rica em colesterol (Figura 13B-D). Além disso, esse acúmulo de gordura do tecido hepático está fortemente correlacionado com os níveis de colesterol plasmáticos ($r=0,9615$; $P \leq 0,001$) através do coeficiente de correlação de Pearson (Figura 12D).

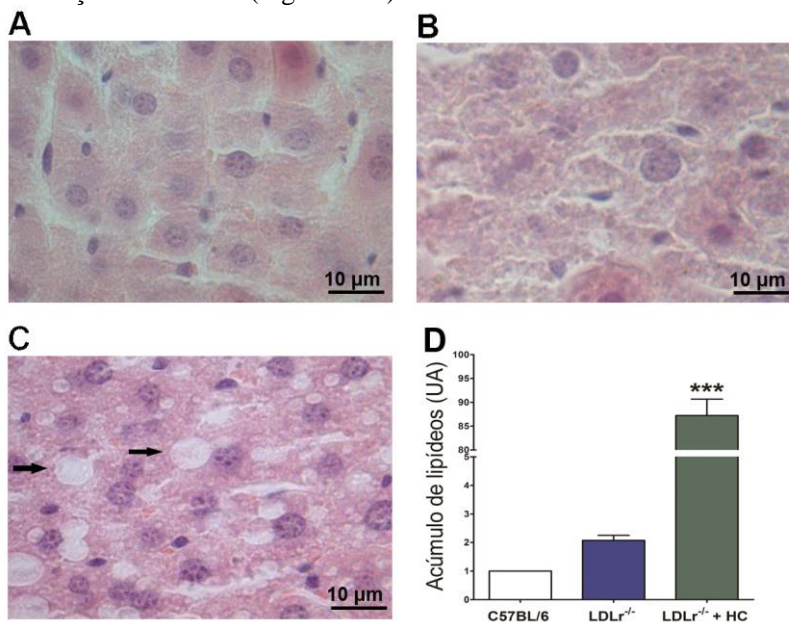


Figura 13. Análise histológica de tecido hepático de camundongos C57BL/6 e camundongos $LDLr^{-/-}$ alimentados com uma dieta padrão ou HC. (A) C57bl/6, (B) $LDLr^{-/-}$, (C) $LDLr^{-/-}$ + HC e (D) acumulação de lipídeos (UA) unidade arbitrária. Setas indicam vacúolos lipídicos. * $P \leq 0,001$, quando comparado com o grupo controle C57bl/6 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey's).**

4.3.5. Efeito do envelhecimento no sistema antioxidante relacionado à glutatona e na produção de EROs na fração citosólica de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos

Com o objetivo de investigar o efeito envelhecimento nos parâmetros de estresse oxidativo no sistema hepático de camundongos hipercolesterolêmicos foram avaliados os níveis de glutatona, produção de EROs e atividade de enzimas antioxidantes na fração citosólica de fígado de camundongos $LDLr^{-/-}$.

O teste “t” de Student indicou que o envelhecimento causa uma depleção significativa nos níveis de GSH na fração citoplasmática de fígado (Figura 14A) de camundongos LDLr^{-/-} (t=3,84; P≤0,01; teste “t” de Student). Além disso, o teste “t” de Student indicou também que os camundongos LDLr^{-/-} velhos possuem maior peroxidação lipídica no tecido hepático (Figura 14C) comparado aos jovens (t=2,63; P≤0,05; teste “t” de Student), porém o teste “t” não mostrou diferença significativa do envelhecimento na produção de espécies reativas (Figura 14B) e na atividade da GR e GPx na fração citoplasmática do fígado dos camundongos LDLr^{-/-} (Figura 14D-E).

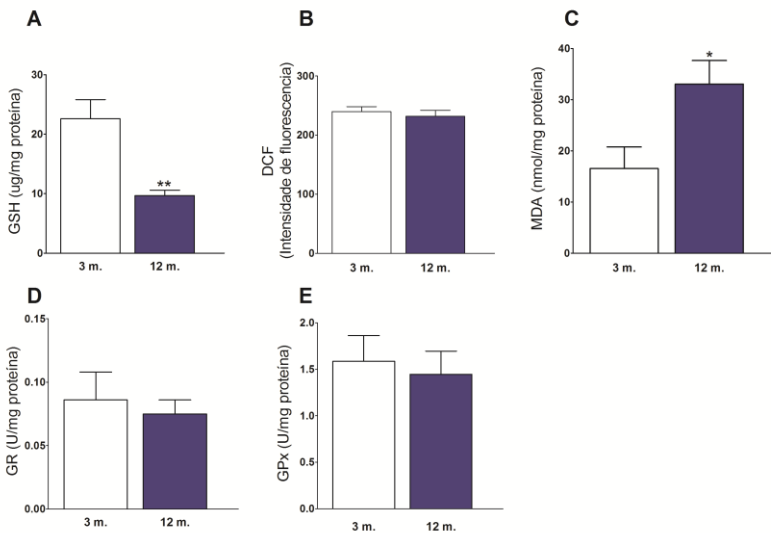


Figura 14. Efeito do envelhecimento no sistema glutatona e produção de EROs. (A) Níveis de GSH, (B) níveis de DCF, (C) níveis de MDA, (D) atividade da GR e (E) atividade da GPx na fração citosólica de fígado de camundongos LDLr^{-/-} jovens e velhos. *P≤0,05 e ** P≤0,01, quando comparado com o grupo jovem (teste “t” de Student).

4.3.6. Efeito envelhecimento no sistema antioxidante relacionado à glutatona e na produção de EROs na fração mitocondrial de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos

Com o objetivo de investigar o efeito do envelhecimento nos parâmetros de estresse oxidativo no sistema hepático foram avaliados os níveis de glutatona, produção de EROs e atividade de enzimas antioxidantes na fração mitocondrial de fígado de camundongos LDLr^{-/-}.

O envelhecimento não alterou significativamente os níveis de GSH (Figura 15A) e a produção de EROs (Figura 15B) em mitocôndrias de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos. Mas o teste “t” de Student indicou que o envelhecimento causa peroxidação lipídica (Figura 15C) nas mitocôndrias hepáticas dos camundongos LDLr^{-/-} (t=3,09; $P \leq 0,01$; teste “t” de Student). Em relação a atividade das enzimas antioxidantes GR e GPx, o teste “t” de Student indicou que o envelhecimento causou uma diminuição significativa (t=7,01; $P \leq 0,001$; teste “t” de Student) na atividade da GR (Figura 15D) nas mitocôndrias hepáticas dos camundongos hipercolesterolêmicos, entretanto não foi observado efeito do envelhecimento na atividade da GPx (Figura 14E).

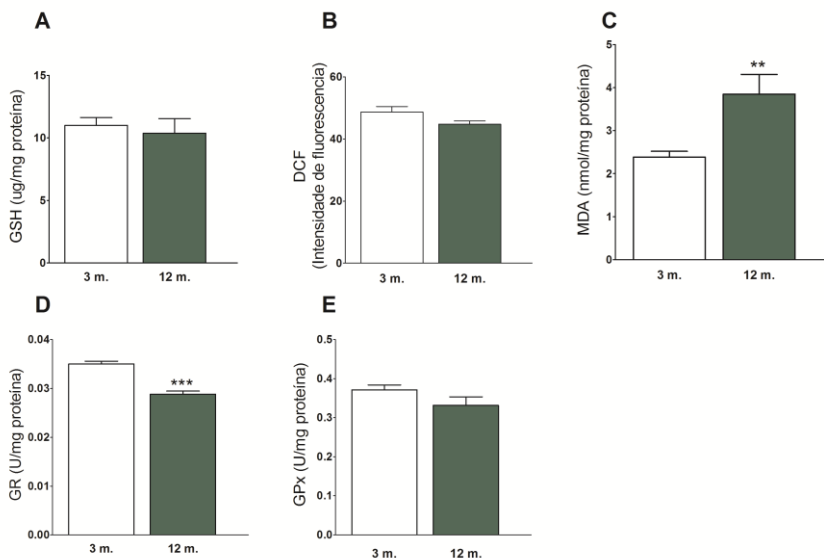


Figura 15. Efeito do envelhecimento no sistema glutatona e produção de EROs. (A) Níveis de GSH, (B) níveis de DCF, (C) níveis de MDA, (D) atividade da GR e (E) atividade da GPx na fração mitocondrial de fígado de camundongos LDLr^{-/-} jovens e velhos. ** $P \leq 0,01$ e *** $P \leq 0,001$, quando comparado com o grupo jovem (teste “t” de Student).

4.3.7. Efeito do envelhecimento na atividade de complexos da cadeia respiratória de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos.

O teste “t” de Student indicou que o envelhecimento não causa diminuição significativa na atividade do complexo 1 da cadeia respiratória em mitocôndrias hepáticas de camundongos

hipercolesterolêmicos (Fig.16A). Por outro lado, o teste “t” indicou que o envelhecimento provoca significativa diminuição na atividade do complexo 2 da cadeia respiratória (Fig.16B) em mitocôndrias de fígados dos camundongos LDLr^{-/-} (t=2,96; $P \leq 0,01$; teste “t” de Student).

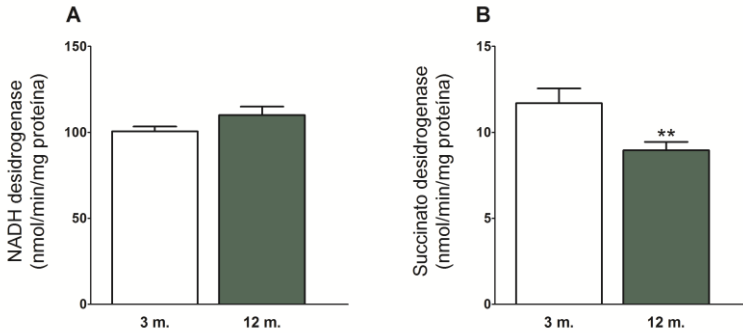


Figura 16. Efeito do envelhecimento nos complexos da cadeia respiratória. (A) complexo 1, (B) complexo 2 na fração mitocondrial de fígado de camundongos LDLr^{-/-} jovens e velhos. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 5-6 animais. ** $P \leq 0,01$, quando comparado com o grupo jovem (teste “t” de Student).

5. DISCUSSÃO

A hipercolesterolemia, representada por níveis plasmáticos de colesterol acima dos valores de referência, é uma condição que afeta 1 em cada 20 indivíduos na população em geral. As causas desta condição são variadas e podem ser de origem genética ou multifatorial resultante do estilo de vida do indivíduo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) já considera a doença HF como um problema de saúde pública mundial. Estima-se que no mundo todo existam mais de 10.000.000 de indivíduos portadores de HF; no entanto, menos de 10% desses têm diagnóstico conhecido e menos de 25% recebem tratamento hipolipemiante (SANTOS R.D., 2012). Além disso, a hipercolesterolemia é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (ROSS e HARKER, 1976; PLUMP *et al.*, 1992) e doenças hepáticas como a DHGNA (WOUTERS *et al.*, 2008). No presente estudo, nós avaliamos a contribuição dos níveis elevados de colesterol plasmático na indução de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial em tecidos do sistema cardiovascular e hepático de camundongos hipercolesterolêmicos. Além disso, avaliamos a contribuição do envelhecimento neste panorama de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, uma vez que, o avanço da idade é fator que não podemos controlar e que causa diversas modificações em órgãos e tecidos.

A literatura vêm demonstrando através de estudos *in vivo*, uma forte relação entre a hipercolesterolemia com a disfunção mitocondrial e consequentemente estresse oxidativo (OLIVEIRA *et al.*, 2005; PAIM *et al.*, 2008). Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou que a hipercolesterolemia induziu alterações na função mitocondrial e estresse oxidativo no sistema nervoso central em camundongos e estas alterações bioquímicas foram relacionadas com déficit de aprendizado e memória nestes animais (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011). Os resultados apresentados nesta dissertação demonstram claramente o estabelecimento de uma situação de estresse oxidativo vinculado à hipercolesterolemia nos tecidos cardiovascular e hepático, ambos diretamente relacionados com o metabolismo lipídico.

O papel fisiológico do receptor de LDL é transportar as partículas de lipoproteínas ricas em colesterol do plasma para as células. O ligante primário para o receptor é a LDL, que contém uma única cópia de apoB-100, além de, aproximadamente 65-70% de todo o colesterol plasmático. Após o reconhecimento da LDL pelo seu receptor, o complexo receptor-ligante entra na célula por endocitose, e partículas de lipoproteínas são libertadas nos endossomas, e os receptores, retornam para a superfície

celular (GOLDSTEIN e BROWN, 2009). Quando a funcionalidade do receptor de LDL é afetada, como por exemplo na HF, na qual a LDL se liga ao receptor mais o sinal não é transmitido e a via de sinalização subjacente não é ativa, ocorre desregulação no metabolismo de colesterol, que leva ao aumento nos níveis plasmáticos desse lipídeo e intensa predisposição às doenças cardiovasculares.

Camundongos deficientes para o receptor de LDL vêm sendo amplamente utilizados para estudar a patogênese e potenciais tratamentos de doenças que cursam com altos níveis de colesterol plasmático, como a aterosclerose. Originalmente, estes animais foram desenvolvidos como um modelo de Hipercolesterolemia Familiar homozigótica (ISHIBASHI *et al.*, 1993). De acordo com essas observações, relatórios anteriores utilizando camundongos LDL^{r/-} mostraram que a deficiência deste receptor leva a dois importantes efeitos pró-aterogênicos, a saber: (i) aumento dos níveis extracelulares de substrato oxidável - lipoproteína de baixa densidade e, (ii) um desequilíbrio nos processos redox celular (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Este desequilíbrio está associado com a depleção de GSH e principalmente de NADPH, um importante substrato oxidável mitocondrial. Dessa forma, os tecidos desses animais possuem quantidades insuficientes de equivalentes redutores para a reconstituição da função de detoxificação celular, a qual é atribuída aos sistemas relacionados à glutatona e à tioredoxina. Uma vez que estes dois importantes sistemas antioxidantes dependem do NADPH, um declínio dessa molécula leva ao acúmulo de espécies reativas causando estresse oxidativo (BERNDT, LILLIG e HOLMGREN, 2007; PAIM *et al.*, 2008).

Em nosso estudo verificamos que os camundongos LDL^{r/-} apresentaram níveis de colesterol sanguíneo cerca de duas vezes maior do que os encontrados na sua forma selvagem (C57BL/6), no entanto, o avanço da idade não piorou os níveis de colesterol. Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que não mostram diferença significativa no perfil lipídico de camundongos LDL^{r/-} velhos em relação aos jovens (LAPENNA *et al.*, 2004; COLLINS *et al.*, 2009). No entanto, estes estudos mostraram que a ocorrência de placas ateroscleróticas é significativamente mais evidente nos camundongos LDL^{r/-} velhos em comparação aos jovens, o que sugere que os níveis elevados de colesterol plasmático atuam sinergicamente com o envelhecimento na evolução da aterosclerose (COLLINS *et al.*, 2009; RAMIREZ *et al.*, 2011).

Neste sentido nos hipotetizamos que o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial podem estar relacionados com os altos níveis de

colesterol plasmático. Em relação ao sistema cardiovascular nosso estudo evidenciou uma significativa diminuição do conteúdo de GSH na aorta de camundongos hipercolesterolêmicos e este decréscimo de GSH foi inversamente correlacionado com os níveis de colesterol no plasma. Nossos dados corroboram com um estudo anterior que avaliou o status do sistema antioxidante relacionado à glutathiona em coelhos alimentados com uma dieta rica em gordura. Os coelhos alimentados por mais tempo com a dieta rica em gordura apresentaram menor conteúdo de GSH e uma menor atividade da GR na aorta. Esta alteração no estado redox do tecido aórtico refletiu no aumento da atividade da γ -glutamil cisteína sintetase (γ -GCS), enzima responsável pela biossíntese *de novo* de GSH (LAPENNA *et al.*, 2004)

As EROs e os produtos de peroxidação lipídica são importantes moduladores do equilíbrio entre a sobrevivência celular e a apoptose. Essas moléculas possuem vasta gama de propriedades biológicas que conduzem à reações inflamatórias, migração e disfunção endotelial promovendo apoptose e contribuem para a progressão de lesões ateroscleróticas (WEBER e NOELS, 2011). Os produtos de peroxidação lipídica formados durante o processo de oxidação da LDL, estão acumulados nas lesões ateroscleróticas, tornando estes lipídeos oxidados fatores importantes que implicam não só no início mas também na promoção da inflamação e na ruptura da placa aterosclerótica (HANSSON e HERMANSSON, 2011). Além do mais, modificações oxidativas na parede arterial estão envolvidas em diferentes etapas do processo aterogênico. No contexto da hipótese da modificação oxidativa, a proteção antioxidante da LDL merece atenção particular, uma vez que a acumulação celular de LDL oxidada é considerada um marcador de aterosclerose (CHISOLM e STEINBERG, 2000; STOCKER e KEANEY, 2004).

O envelhecimento induz a diminuição na ativação vascular de genes de enzimas antioxidantes, como GPx, catalase e SOD, em camundongos de 12 meses de idade quando alimentados com dieta rica em colesterol. Além disso, esses animais velhos apresentaram maior produção plasmática de isoprostanos, indicativo de oxidação de lipídios e também possuíam maior produção vascular de EROs (COLLINS *et al.*, 2009). Em nossos resultados, demonstramos o efeito do envelhecimento na produção de EROS. As mitocôndrias isoladas de tecido cardíaco de camundongos velhos, de ambos os genótipos, apresentaram maior produção de EROs comparados com os jovens, o que sugere um estresse oxidativo relacionado a idade no sistema cardiovascular.

A utilização de compostos com atividade antioxidante pode ter um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose. Deste modo, nós estudamos os mecanismos moleculares adjacentes ao efeito antiaterosclerótico de um composto simples de organoselênio, o $(\text{PhSe})_2$. Ademais, avaliamos o efeito do $(\text{PhSe})_2$ relacionado com a idade, uma vez que, o envelhecimento causa estresse oxidativo e é um fator de risco inevitável para as doenças cardiovasculares (GALMAN *et al.*, 2007; COLLINS *et al.*, 2009).

Importantes evidências de nosso grupo mostraram que o $(\text{PhSe})_2$ reduziu eficientemente a oxidação de LDL *in vitro* (DE BEM *et al.*, 2008) e inibiu a formação da lesão aterosclerótica em camundongos LDL^{r/-} pela modulação de vias anti-inflamatórias e antioxidantes (HORT *et al.*, 2011). Considerando nossos estudos prévios sobre o efeito antiaterogênico do $(\text{PhSe})_2$, aqui nos concentramos em avaliar seu efeito no sistema antioxidante cardiovascular, de modo a entender melhor os mecanismos pelos quais o $(\text{PhSe})_2$ foi capaz de diminuir a lesão aterosclerótica. Nossos dados demonstram que o tratamento oral com este composto foi capaz de reduzir em mais de 30% a peroxidação lipídica no coração de camundongos jovens hipercolesterolêmicos. Estes dados, corroboram com o estudo anterior de nosso grupo, que demonstra que o $(\text{PhSe})_2$ reduziu eficientemente a marcação para MDA no seio aórtico de camundongos LDL^{r/-} (HORT *et al.*, 2011). Por outro lado, não foram observadas alterações relacionadas com a idade na produção de EROs, medido pelo sonda DCF-DA em homogeneizados de coração e aorta.

Muitos estudos apontam o envolvimento de sistemas antioxidantes enzimáticos na prevenção de doenças cardiovasculares, dos quais podemos destacar os sistemas relacionado à GSH e à TrX (BRIGELIUS-FLOHE, BANNING e SCHNURR, 2003; HAGG *et al.*, 2006; BERNDT, LILLIG e HOLMGREN, 2007; PARK e OH, 2011). De particular importância, evidências sugerem uma associação entre a diminuição na atividade da GPx, com a progressão da aterosclerose (LAPENNA *et al.*, 1998; ESPINOLA-KLEIN *et al.*, 2007; LEWIS *et al.*, 2007). Desta forma, o estudo do potencial efeito farmacológico de compostos como o $(\text{PhSe})_2$, o qual mimetiza a atividade da GPx, seria benéfico no combate da aterogênese.

Neste estudo, o tratamento com $(\text{PhSe})_2$, independentemente da idade dos animais, foi capaz de aumentar os níveis de GSH no coração em camundongos hipercolesterolêmicos. Esta melhora no conteúdo de GSH pode estar relacionada com o aumento observado na atividade da enzima GR no tecido cardíaco, a qual catalisa a restauração da

glutathione a partir da glutathione oxidada (ANDERSON, 1998). No entanto, não podemos descartar o possível envolvimento da síntese *de novo* de GSH, tendo em vista o trabalho recente de nosso grupo que demonstrou que o $(\text{PhSe})_2$ é capaz de ativar a translocação do fator nuclear eritróide-2 (Nrf-2), um fator de transcrição responsável pela aumento de enzimas antioxidantes como a gama glutamil cisteína sintase, enzima limitante na síntese de glutathione (dados ainda não publicados). Embora o $(\text{PhSe})_2$ não alterou a atividade da GPx no coração dos camundongos hipercolesterolêmicos, o composto foi capaz de aumentar de forma eficiente a atividade da GPx em homogeneizado de aorta, independentemente da idade dos animais. Este resultado é de fundamental relevância, uma vez que, vários estudos têm demonstrado que a GPx é uma enzima-chave na proteção vascular contra o estresse oxidativo e aterogênese (LAPENNA *et al.*, 1998; CHISOLM e STEINBERG, 2000; PARK e OH, 2011).

Uma vez que a modulação do equilíbrio redox celular é criticamente importante na patogênese de doenças cardiovasculares e que o sistema antioxidante relacionado à TrX exerce importantes funções de proteção contra EROs, parece provável que este sistema antioxidante seja um alvo promissor para o tratamento clínico de doenças cardiovasculares (CONRAD *et al.*, 2004; FURMAN *et al.*, 2004). Neste estudo, avaliamos a atividade da tioredoxina redutase (TrxR) em homogeneizados de coração de camundongos hipercolesterolêmicos jovens e velhos tratados com $(\text{PhSe})_2$. Observamos uma redução significativa na atividade desta enzima nos camundongos velhos hipercolesterolêmicos, quando comparado com animais jovens. Estes dados sugerem que o sistema antioxidante relacionado à TrxR é afetado com o envelhecimento. O tratamento com o $(\text{PhSe})_2$ promoveu um aumento na atividade da TrxR em homogeneizados de coração de camundongos hipercolesterolêmicos jovens.

De particular significado terapêutico, o $(\text{PhSe})_2$ pode atuar como mimético da enzima GPx ou pode ser metabolizado pela TrxR formando intermediários selenóis, que atuam mimetizando a função de selenoenzimas antioxidantes, como a GPx, favorecendo o estado redox cardiovascular. Nesse estudo, principalmente nos camundongos hipercolesterolêmicos jovens, o tratamento com $(\text{PhSe})_2$ contribuiu para uma melhoria no estado redox cardiovascular. Este efeito foi evidenciado através da redução dos níveis de peroxidação lipídica e do aumento no conteúdo de GSH e na atividade das enzimas antioxidantes GPx e TrxR no tecido cardíaco. Assim, estes resultados sugerem que,

além do seu efeito direto como um mimético da GPx e como substrato para a TrxR, o (PhSe)₂ pode atuar indiretamente por ativação de genes que estão relacionados com os sistemas antioxidantes celulares. Dessa forma, sugerimos que o (PhSe)₂ ativa fatores de transcrição como o Nrf-2, que posteriormente sinaliza diversas respostas celulares vinculadas a ativação dos elementos de resposta antioxidante (ARE). Entre as proteínas ativadas pelo Nrf-2 estão: subunidades catalítica e regulatória da enzima γ -glutamil cisteína ligase, e a glutatona sintetase que são responsáveis pela síntese da glutatona, além das enzimas antioxidantes como a GPx e a TrxR (MANN *et al.*, 2007; NGUYEN, NIOI e PICKETT, 2009; KIM, CHA e SURH, 2010). Este incremento nas respostas antioxidantes mediadas pelo (PhSe)₂ podem explicar, em parte, o mecanismo da ação antiaterogênica desse composto, que foi observado por nosso grupo em estudos anteriores (DE BEM *et al.*, 2009; HORT *et al.*, 2011).

O fígado é o órgão responsável pelo metabolismo lipídico, além de ser conhecido por possui grandes quantidades de defesa antioxidante (GONG *et al.*, 1997). Em nosso trabalho, foi observado que o tecido hepático dos camundongos hipercolesterolêmicos apresentam intenso estresse oxidativo. Isto é caracterizado pela diminuição no conteúdo de GSH e pela diminuição na atividade da GR. Além disso, foi observado também que o fígado desses animais possuem altos níveis de peroxidação lipídica. Este estado oxidativo foi ainda mais intensificado nos camundongos hipercolesterolêmicos que receberam uma dieta rica em colesterol

Este estado de estresse oxidativo observado nos camundongos hipercolesterolêmicos, deficientes para o receptor de LDL não ocasionou diretamente uma disfunção mitocondrial, uma vez que a atividade dos complexos I e II da cadeia respiratória não apresentaram diferença significativa em relação aos camundongos C57BL/6 selvagens no tecido hepático. Todavia, quando os camundongos LDL^{-/-} receberam uma dieta rica em colesterol, a qual elevou cerca de 3 a 4 vezes os níveis plasmáticos de colesterol nestes animais uma diminuição significativa na atividade do complexo I da cadeia respiratória foi observada, sugerindo que altos níveis de colesterol plasmático afetam a função mitocondrial por diminuir a atividade do complexo I.

A cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte de EROs durante o metabolismo normal, cerca de 5% de todo O₂ pela mitocôndria consumido é parcialmente reduzido à ânion superóxido (WALLACE, 2000; LESNEFSKY *et al.*, 2001). A taxa de produção de EROs mitocondrial é aumentada em uma variedade de condições patológicas, e

podemos destacar o envelhecimento (HERRERO e BARJA, 1997; MOGHADDAS, HOPPEL e LESNEFSKY, 2003). Os complexos I e III da cadeia respiratória são os principais locais de produção de EROs. A principal espécie reativa formada é o ânion superóxido, que na matriz mitocondrial pela SOD, produzindo o H_2O_2 que difunde pela membrana da mitocôndria e é posteriormente detoxificado pela catalase e pelo sistema relacionado a GSH (CADENAS e DAVIES, 2000; HAN *et al.*, 2003). Uma vez que ocorre desregulação na atividade destes complexos, haverá aumento de produção de EROs. Especialmente nestes camundongos LDLr^{-/-}, que possuem deficiência no sistema antioxidante relacionado à GSH, o aumento de EROs mitocondrial pode trazer sérios danos celulares.

Em nosso trabalho, as alterações no sistema antioxidante hepático, como a diminuição da GSH, diminuição da atividade da GR e aumento da peroxidação lipídica, foram fortemente correlacionadas com os níveis plasmáticos de colesterol. Em parte, isto pode ser explicado pela dificuldade do fígado em controlar os níveis elevados de colesterol plasmático, desregulando a sua biossíntese. A hipercolesterolemia provocou desregulação no metabolismo hepático de lipídeos, causando acúmulo de gordura no citoplasma dos hepatócitos, como observado na marcação histológica do fígado dos animais.

Como comentado anteriormente, o envelhecimento é bastante conhecido por induzir o estresse oxidativo tecidual e a disfunção mitocondrial em diversos tecidos (FINKEL e HOLBROOK, 2000; VAN REMMEN, HAMILTON e RICHARDSON, 2003). Aqui, observamos que a nível citoplasmático o envelhecimento induziu estresse oxidativo no tecido hepático evidenciado pela diminuição da GSH e pelo aumento de peroxidação lipídica em frações citoplasmáticas de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos.

Já as mitocôndrias de fígado isoladas de camundongos hipercolesterolêmicos apresentaram somente alguns sinais de comprometimento oxidativo induzido pelo avanço da idade. Este efeito foi observado pela diminuição da atividade da GR e pelo aumento da peroxidação lipídica nas mitocôndrias hepáticas. Além do mais, foi observado diminuição na atividade do complexo II nessas mitocôndrias. Estudos anteriores mostraram que o envelhecimento não altera os níveis plasmáticos de colesterol em camundongos LDLr^{-/-} (COLLINS *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2012), isto poderia explicar em parte o efeito brando do envelhecimento em camundongos LDLr^{-/-}. Além disso, o avanço da idade pode estar ativando outras vias de síntese de GSH, como a síntese *de novo* de GSH, que favorece o ambiente redox celular

(ANDERSON, 1998), por outro lado, pode explicar porque não foi observado queda no conteúdo de GSH em nossos resultados.

Em resumo, a hipercolesterolemia induziu estresse oxidativo no tecido hepático pela diminuição do conteúdo de GSH, diminuição da atividade da GR e aumento da peroxidação lipídica, fatores que se correlacionaram com os níveis plasmáticos de colesterol, além de causar disfunção mitocondrial pela diminuição do complexo I. Ademais, o envelhecimento gerou uma situação de estresse oxidativo no fígado de camundongos LDLr^{-/-} por diminuir o conteúdo de GSH no citoplasma, diminuir a atividade da GR nas mitocôndrias, além de causar peroxidação lipídica em ambos os compartimentos celulares.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que:

- Os camundongos LDLr^{-/-} possuem um menor conteúdo de GSH na aorta. Indicando uma depleção de glutatona relacionada com altos níveis de colesterol plasmático.
- Os camundongos de 12 meses de idade de ambos os genótipos apresentaram maior produção de EROs em mitocôndrias de coração.
- O (PhSe)₂ melhorou o ambiente redox no sistema cardiovascular pelo aumento de GSH no coração e a atividade da GPx e GR na aorta de camundongos LDLr^{-/-} velhos. Além de, diminuir a peroxidação lipídica e aumentar a atividade da GR e TrxR no coração e a aumentar a GPx na aorta dos camundongos jovens.
- A hipercolesterolemia causa severo estresse oxidativo, através da diminuição do conteúdo de GSH e na atividade da GR, além de, aumentar a peroxidação lipídica e o acúmulo de lipídeos no tecido hepático. Esse efeito é acentuado com uma dieta rica em colesterol, e portanto está correlacionado com os altos níveis de colesterol plasmático.
- A dieta rica em colesterol induziu a disfunção mitocondrial pela diminuição da atividade do complexo II da cadeia respiratória em camundongos LDLr^{-/-}.
- O envelhecimento causa estresse oxidativo na fração citosólica de fígado através da diminuição do conteúdo de GSH e pelo aumento de peroxidação lipídica.
- O envelhecimento induz estresse oxidativo na fração mitocondrial de fígado pela diminuição da atividade da GR e pelo aumento de peroxidação lipídica.
- O envelhecimento causa disfunção mitocondrial pela diminuição da atividade do complexo II da cadeia respiratória

7. PERSPECTIVAS

Alguns aspectos relacionados a este trabalho ainda precisam ser melhor elucidados, desta forma, nosso grupo propõe algumas perspectivas:

- Avaliar outros marcadores de estresse oxidativo no sistema cardiovascular e no tecido hepático de camundongos LDL^{r-/-}.
- Avaliar a respirometria mitocondrial para confirmar a disfunção mitocondrial nesse modelo.
- Avaliar outros possíveis mecanismos para o efeito antiaterogênico do (PhSe)₂ através de estudo em culturas de células.
- Avaliar marcadores histológicos na área da lesão aterosclerótica e em tecido hepático.

REFERÊNCIAS

- ADAM-VIZI, V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 9-10, p. 1140-9, 2005.
- ALFADDA, A. A.; SALLAM, R. M. Reactive oxygen species in health and disease. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 936486, 2012.
- ANDERSON, M. E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chem Biol Interact**, v. 111-112, p. 1-14, 1998.
- ASMIS, R.; BEGLEY, J. G. Oxidized LDL promotes peroxide-mediated mitochondrial dysfunction and cell death in human macrophages: a caspase-3-independent pathway. **Circ Res**, v. 92, n. 1, p. e20-9, 2003.
- BALLINGER, S. W. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. **Free Radic Biol Med**, v. 38, n. 10, p. 1278-95, 2005.
- BAST, A.; GORIS, R. J. Oxidative stress. Biochemistry and human disease. **Pharm Weekbl Sci**, v. 11, n. 6, p. 199-206, 1989.
- BEGRICHE, K. *et al.* . Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, 2013.
- BERNDT, C.; LILLIG, C. H.; HOLMGREN, A. Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, n. 3, p. H1227-36, 2007.
- BLANKENBERG, S. *et al.* . Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. **N Engl J Med**, v. 349, n. 17, p. 1605-13, 2003.
- BORGES, L. P. *et al.* . Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. **Toxicology**, v. 210, n. 1, p. 1-8, 2005.

BRIGELIUS-FLOHE, R.; BANNING, A.; SCHNURR, K. Selenium-dependent enzymes in endothelial cell function. **Antioxid Redox Signal**, v. 5, n. 2, p. 205-15, 2003.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. **J Clin Invest**, v. 72, n. 3, p. 743-7, 1983.

_____. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v. 232, n. 4746, p. 34-47, 1986.

BURGER, M. *et al.* . Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. **Brain Research Bulletin**, v. 64, n. 4, p. 339-345, 2004.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radic Biol Med**, v. 29, n. 3-4, p. 222-30, 2000.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **J Biol Chem**, v. 250, n. 14, p. 5475-80, 1975.

CASSINA, A.; RADI, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Arch Biochem Biophys**, v. 328, n. 2, p. 309-16, 1996.

CHAUDHARY, K. R.; EL-SIKHRY, H.; SEUBERT, J. M. Mitochondria and the aging heart. **J Geriatr Cardiol**, v. 8, n. 3, p. 159-67, 2011.

CHISOLM, G. M.; STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. **Free Radic Biol Med**, v. 28, n. 12, p. 1815-26, 2000.

COLLINS, A. R. *et al.* . Age-accelerated atherosclerosis correlates with failure to upregulate antioxidant genes. **Circ Res**, v. 104, n. 6, p. e42-54, 2009.

CONRAD, M. *et al.* . Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 21, p. 9414-23, 2004.

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

DAUGHERTY, A. Mouse models of atherosclerosis. **Am J Med Sci**, v. 323, n. 1, p. 3-10, 2002.

DE BEM, A. F. *et al.* . Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation in vitro. **Atherosclerosis**, v. 201, n. 1, p. 92-100, 2008.

DE BEM, A. F. *et al.* . Diphenyl diselenide decreases serum levels of total cholesterol and tissue oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 105, n. 1, p. 17-23, 2009.

DE OLIVEIRA, J. *et al.* . Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: relevance of cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress. **Neuroscience**, v. 197, p. 99-106, 2011.

ESPINOLA-KLEIN, C. *et al.* . Glutathione peroxidase-1 activity, atherosclerotic burden, and cardiovascular prognosis. **Am J Cardiol**, v. 99, n. 6, p. 808-12, 2007.

FARNIER, M.; BRUCKERT, E. Severe familial hypercholesterolaemia: Current and future management. **Arch Cardiovasc Dis**, v. 105, n. 12, p. 656-65, 2012.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-47, 2000.

FISCHER, J. C. *et al.* . Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clin Chim Acta**, v. 153, n. 1, p. 23-36, 1985.

FORGIONE, M. A. *et al.* . Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 282, n. 4, p. H1255-61, 2002.

FREZZA, C.; CIPOLAT, S.; SCORRANO, L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. **Nat Protoc**, v. 2, n. 2, p. 287-95, 2007.

FROMENTY, B. *et al.* . Hepatic mitochondrial DNA deletion in alcoholics: association with microvesicular steatosis. **Gastroenterology**, v. 108, n. 1, p. 193-200, 1995.

FURMAN, C. *et al.* . Thioredoxin reductase 1 is upregulated in atherosclerotic plaques: specific induction of the promoter in human macrophages by oxidized low-density lipoproteins. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n. 1, p. 71-85, 2004.

GALMAN, C. *et al.* . Age-induced hypercholesterolemia in the rat relates to reduced elimination but not increased intestinal absorption of cholesterol. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 293, n. 3, p. E737-42, 2007.

GHISLENI, G. *et al.* . Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. **Brain Research**, v. 986, n. 1-2, p. 196-199, 2003.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. The LDL receptor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, n. 4, p. 431-8, 2009.

GONG, X. *et al.* . Antioxidant enzyme activities in lens, liver and kidney of calorie restricted Emory mice. **Mech Ageing Dev**, v. 99, n. 3, p. 181-92, 1997.

GOTTO, A. M., JR. Cholesterol management in theory and practice. **Circulation**, v. 96, n. 12, p. 4424-30, 1997.

GUPTA, A. K.; SEXTON, R. C.; RUDNEY, H. Differential regulation of low density lipoprotein suppression of HMG-CoA reductase activity in cultured cells by inhibitors of cholesterol biosynthesis. **J Lipid Res**, v. 31, n. 2, p. 203-15, 1990.

HAGG, D. *et al.* . Oxidized LDL induces a coordinated up-regulation of the glutathione and thioredoxin systems in human macrophages. **Atherosclerosis**, v. 185, n. 2, p. 282-9, 2006.

HAN, D. *et al.* . Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. **Mol Pharmacol**, v. 64, n. 5, p. 1136-44, 2003.

HANSFORD, R. G. Lipid oxidation by heart mitochondria from young adult and senescent rats. **Biochem J**, v. 170, n. 2, p. 285-95, 1978.

HANSSON, G. K.; HERMANSSON, A. The immune system in atherosclerosis. **Nat Immunol**, v. 12, n. 3, p. 204-12, 2011.

HEMPEL, S. L. *et al.* . Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 1-2, p. 146-59, 1999.

HERRERO, A.; BARJA, G. Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. **Mech Ageing Dev**, v. 98, n. 2, p. 95-111, 1997.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem**, v. 74, n. 1, p. 214-26, 1976.

HOBBS, H. H.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. **Hum Mutat**, v. 1, n. 6, p. 445-66, 1992.

HOLMGREN, A.; BJORNSTEDT, M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods Enzymol**, v. 252, p. 199-208, 1995.

HOLMGREN, A.; LU, J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 396, n. 1, p. 120-4, 2010.

HORT, M. A. *et al.* . Diphenyl diselenide effectively reduces atherosclerotic lesions in LDLr^{-/-} mice by attenuation of oxidative stress and inflammation. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 58, n. 1, p. 91-101, 2011.

IGNATOWSKI A. Influence de la nourriture animale sur l'organisme des lapins. . **Arch Med Exp Anat Pathol**, v. 20, p. 1-20 1908.

ISHIBASHI, S. *et al.* . Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **J Clin Invest**, v. 92, n. 2, p. 883-93, 1993.

JASSEM, W.; HEATON, N. D. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation. **Kidney Int**, v. 66, n. 2, p. 514-7, 2004.

JAWIEN, J.; NASTALEK, P.; KORBUT, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. **J Physiol Pharmacol**, v. 55, n. 3, p. 503-17, 2004.

KANEKO, T.; BABA, N.; MATSUO, M. Structure-activity relationship of antioxidants for inhibitors of linoleic acid hydroperoxide-induced toxicity in cultured human umbilical vein endothelial cells. **Cytotechnology**, v. 35, n. 1, p. 43-55, 2001.

KIM, J.; CHA, Y. N.; SURH, Y. J. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. **Mutat Res**, v. 690, n. 1-2, p. 12-23, 2010.

LAPENNA, D. *et al.* . Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques. **Circulation**, v. 97, n. 19, p. 1930-4, 1998.

LAPENNA, D. *et al.* . Aortic glutathione metabolic status: time-dependent alterations in fat-fed rabbits. **Atherosclerosis**, v. 173, n. 1, p. 19-25, 2004.

LATINI, A. *et al.* . 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. **Neuroscience**, v. 135, n. 1, p. 111-20, 2005.

LEAMY, A. K.; EGNATCHIK, R. A.; YOUNG, J. D. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. **Prog Lipid Res**, v. 52, n. 1, p. 165-74, 2013.

LECERF, J. M.; DE LORGERIL, M. Dietary cholesterol: from physiology to cardiovascular risk. **Br J Nutr**, v. 106, n. 1, p. 6-14, 2011.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5th. New York: W.H. Freeman, 2008. ISBN 9780716771081

071677108X. Disponível em: <Publisher description

<http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0835/2007941224-d.html>

Table of contents only

<http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0835/2007941224-t.html>>.

LESNEFSKY, E. J.; HOPPEL, C. L. Oxidative phosphorylation and aging. **Ageing Res Rev**, v. 5, n. 4, p. 402-33, 2006.

LESNEFSKY, E. J. *et al.* . Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. **J Mol Cell Cardiol**, v. 33, n. 6, p. 1065-89, 2001.

LEWIS, P. *et al.* . Lack of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase-1 accelerates atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation**, v. 115, n. 16, p. 2178-87, 2007.

LILLIG, C. H.; HOLMGREN, A. Thioredoxin and related molecules--from biology to health and disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 1, p. 25-47, 2007.

LOWRY, O. H. *et al.* . Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LUNDBERG, B. Chemical composition and physical state of lipid deposits in atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 56, n. 1, p. 93-110, 1985.

MABILE, L. *et al.* . Mitochondrial function is involved in LDL oxidation mediated by human cultured endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 17, n. 8, p. 1575-82, 1997.

MADAMANCHI, N. R.; RUNGE, M. S. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. **Circ Res**, v. 100, n. 4, p. 460-73, 2007.

MANN, G. E. *et al.* . Nrf2/ARE regulated antioxidant gene expression in endothelial and smooth muscle cells in oxidative stress: implications

for atherosclerosis and preeclampsia. **Sheng Li Xue Bao**, v. 59, n. 2, p. 117-27, 2007.

MARGIS, R. *et al.* . Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. **FEBS J**, v. 275, n. 15, p. 3959-70, 2008.

MARTY, L. *et al.* . The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in Arabidopsis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 22, p. 9109-14, 2009.

MATHERLY, S. C.; PURI, P. Mechanisms of simple hepatic steatosis: not so simple after all. **Clin Liver Dis**, v. 16, n. 3, p. 505-24, 2012.

MATSUZAWA, N. *et al.* . Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. **Hepatology**, v. 46, n. 5, p. 1392-403, 2007.

MENDIS, S. *et al.* . **Global atlas on cardiovascular disease prevention and control**. Geneva: World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization, 2011. vi, 155 p. ISBN 9789241564373 9241564377.

MEOTTI, F. C. *et al.* . Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. **Toxicol Lett**, v. 143, n. 1, p. 9-16, 2003.

MEOTTI, F. C. *et al.* . Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environmental Research**, v. 94, n. 3, p. 276-282, 2004.

MICHELET, F. *et al.* . Blood and plasma glutathione measured in healthy subjects by HPLC: relation to sex, aging, biological variables, and life habits. **Clin Chem**, v. 41, n. 10, p. 1509-17, 1995.

MOGHADDAS, S.; HOPPEL, C. L.; LESNEFSKY, E. J. Aging defect at the QO site of complex III augments oxyradical production in rat heart interfibrillar mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, v. 414, n. 1, p. 59-66, 2003.

MOREIRA, E. L. *et al.* . Age-related cognitive decline in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}): evidence of antioxidant imbalance and increased acetylcholinesterase activity in the prefrontal cortex. **J Alzheimers Dis**, v. 32, n. 2, p. 495-511, 2012.

MUSSO, G. *et al.* . Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 37, n. 4, p. 909-16, 2003.

NAKASHIMA, Y. *et al.* . ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. **Arterioscler Thromb**, v. 14, n. 1, p. 133-40, 1994.

NEGRE-SALVAYRE, A. *et al.* . Pathological aspects of lipid peroxidation. **Free Radic Res**, v. 44, n. 10, p. 1125-71, 2010.

NGUYEN, T.; NIOI, P.; PICKETT, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. **J Biol Chem**, v. 284, n. 20, p. 13291-5, 2009.

NOGUEIRA, C. W. *et al.* . Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology**, v. 183, n. 1-3, p. 29-37, 2003a.

NOGUEIRA, C. W. *et al.* . Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflammation Research**, v. 52, n. 2, p. 56-63, 2003b.

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl Diselenide a Janus-Faced Molecule. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 11, p. 2055-2071, 2010.

OHASHI, R. *et al.* . Cellular and molecular mechanisms of atherosclerosis with mouse models. **Trends Cardiovasc Med**, v. 14, n. 5, p. 187-90, 2004.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, n. 2, p. 351-8, 1979.

OLIVEIRA, H. C. *et al.* . Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. **FASEB J**, v. 19, n. 2, p. 278-80, 2005.

PACANA, T.; FUCHS, M. The cardiovascular link to nonalcoholic fatty liver disease: a critical analysis. **Clin Liver Dis**, v. 16, n. 3, p. 599-613, 2012.

PAIGEN, B. *et al.* . Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. **Atherosclerosis**, v. 57, n. 1, p. 65-73, 1985.

PAIM, B. A. *et al.* . 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**, v. 44, n. 3, p. 444-51, 2008.

PARK, J. G.; OH, G. T. The role of peroxidases in the pathogenesis of atherosclerosis. **BMB Rep**, v. 44, n. 8, p. 497-505, 2011.

PAULMIER, C. **Selenium reagents and intermediates in organic synthesis**. 1st. Oxford Oxfordshire ; New York: Pergamon, 1986. xiii, 463 p. ISBN 0080324843
0080324851 (pbk.).

PLUMP, A. S. *et al.* . Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**, v. 71, n. 2, p. 343-53, 1992.

POYTON, R. O.; MCEWEN, J. E. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. **Annu Rev Biochem**, v. 65, p. 563-607, 1996.

PULLIAM, D. A.; BHATTACHARYA, A.; VAN REMMEN, H. Mitochondrial Dysfunction in Aging and Longevity: A Causal or Protective Role? **Antioxid Redox Signal**, 2012.

RAMIREZ, C. *et al.* . ApoB100/LDLR^{-/-} hypercholesterolaemic mice as a model for mild cognitive impairment and neuronal damage. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22712, 2011.

REID, M.; JAHOOOR, F. Glutathione in disease. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 4, n. 1, p. 65-71, 2001.

ROSS, R.; HARKER, L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. **Science**, v. 193, n. 4258, p. 1094-100, 1976.

SANTOS R.D., G. A. C. M., XAVIER H.T., CASELLA FILHO A., ARAÚJO D.B.; CESENA F.Y., ALVES R.J. ET AL. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). **Arq Bras Cardiol**, v. 99(2supl. 2), n. 1-28, 2012.

SARASTE, M. Structural features of cytochrome oxidase. **Q Rev Biophys**, v. 23, n. 4, p. 331-66, 1990.

SIBLEY, C.; STONE, N. J. Familial hypercholesterolemia: a challenge of diagnosis and therapy. **Cleve Clin J Med**, v. 73, n. 1, p. 57-64, 2006.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol**, v. 82, n. 2, p. 291-5, 1997.

SKULACHEV, V. P. How proapoptotic proteins can escape from mitochondria? **Free Radic Biol Med**, v. 29, n. 10, p. 1056-9, 2000.

SOCHA, P. *et al.* . Nonalcoholic fatty liver disease as a feature of the metabolic syndrome. **Rocz Panstw Zakl Hig**, v. 58, n. 1, p. 129-37, 2007.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F., JR. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev**, v. 84, n. 4, p. 1381-478, 2004.

STRALIOTTO, M. R. *et al.* . Acute exposure of rabbits to diphenyl diselenide: a toxicological evaluation. **J Appl Toxicol**, v. 30, n. 8, p. 761-8, 2010.

STRIDE, N. *et al.* . Decreased mitochondrial oxidative phosphorylation capacity in the human heart with left ventricular systolic dysfunction. **Eur J Heart Fail**, v. 15, n. 2, p. 150-7, 2013.

TARGHER, G.; DAY, C. P.; BONORA, E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **N Engl J Med**, v. 363, n. 14, p. 1341-50, 2010.

- UCHIDA, K. *et al.* . Age-related changes of bile acid metabolism in rats. **Arch Gerontol Geriatr**, v. 10, n. 1, p. 37-48, 1990.
- UCHIDA, K. *et al.* . Age-related changes in cholesterol and bile acid metabolism in rats. **J Lipid Res**, v. 19, n. 5, p. 544-52, 1978.
- VAN REMMEN, H.; HAMILTON, M. L.; RICHARDSON, A. Oxidative damage to DNA and aging. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 31, n. 3, p. 149-53, 2003.
- VERCESI, A. E. *et al.* . Mitochondrial energy metabolism and redox state in dyslipidemias. **IUBMB Life**, v. 59, n. 4-5, p. 263-8, 2007.
- VINDIS, C. *et al.* . Two distinct calcium-dependent mitochondrial pathways are involved in oxidized LDL-induced apoptosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 3, p. 639-45, 2005.
- VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 4th. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2011. xxv, 1428, 53 p. ISBN 9780470570951 (alk. paper) 0470570954 (alk. paper) 9780470917459 (alk. paper) 0470917458 (alk. paper).
- WALENBERGH, S. M. *et al.* . Non-alcoholic steatohepatitis: The role of oxidized low-density lipoproteins. **J Hepatol**, 2012.
- WALLACE, D. C. Mitochondrial defects in cardiomyopathy and neuromuscular disease. **Am Heart J**, v. 139, n. 2 Pt 3, p. S70-85, 2000.
- WARNHOLTZ, A. *et al.* . Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. **Circulation**, v. 99, n. 15, p. 2027-33, 1999.
- WEBER, C.; NOELS, H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. **Nat Med**, v. 17, n. 11, p. 1410-22, 2011.
- WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 325-33, 1981.

WILSON, S. R. *et al.* . Development of Synthetic Compounds with Glutathione-Peroxidase Activity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 15, p. 5936-5939, 1989.

WITZTUM, J. L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. **Lancet**, v. 344, n. 8925, p. 793-5, 1994.

WOUTERS, K. *et al.* . Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 48, n. 2, p. 474-86, 2008.

YAO, P. M.; TABAS, I. Free cholesterol loading of macrophages is associated with widespread mitochondrial dysfunction and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. **J Biol Chem**, v. 276, n. 45, p. 42468-76, 2001.

YASUTAKE, K. *et al.* . Nutritional investigation of non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease: the significance of dietary cholesterol. **Scand J Gastroenterol**, v. 44, n. 4, p. 471-7, 2009.

YUNG, L. M. *et al.* . Reactive oxygen species in vascular wall. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets**, v. 6, n. 1, p. 1-19, 2006.