

Simone Taraborelli

**AVALIAÇÃO DA PRAVASTATINA EM RATOS
INFARTADOS NORMOCOLESTEROLÊMICOS E SUA
RELAÇÃO COM LÍPIDES PLASMÁTICOS, COLESTEROL E
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA TECIDUAL E FUNÇÃO
ENDOTELIAL**

Campinas, 2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO DA PRAVASTATINA EM RATOS INFARTADOS
NORMOCOLESTEROLÊMICOS E SUA RELAÇÃO COM LÍPIDES
PLASMÁTICOS, COLESTEROL E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA
TECIDUAL E FUNÇÃO ENDOTELIAL**

Simone Taraborelli

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós – Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade de Campinas
– UNICAMP, para obtenção de título de Mestre em
Clínica Médica, área de concentração em
Ciências Básicas. Orientação do
Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida.

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

T171a Taraborelli, Simone, 1981 -
Avaliação da pravastatina em ratos infartados normocolesterolêmicos e sua relação com lípidos plasmáticos, colesterol e peroxidação lipídica tecidual e função endotelial./ Simone Taraborelli. -
- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Eros Antonio de Almeida
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Peroxidação Lipídica. 2. Infarto do Miocárdio. 3. Pravastatina. 4. Ratos. I. Almeida, Eros Antonio de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of pravastatin in infarcted normocholesterolemic rats and its relation to plasma lipids, cholesterol and tissue lipid peroxidation and endothelial function

Palavra-chave em inglês:

Lipid Peroxidation

Myocardial Infarction

Pravastatin

Rats

Área de Concentração: Ciências Básicas

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Banca examinadora:

Eros Antonio de Almeida [Orientador]

José Francisco Kerr Saraiva

Adriana Zaparolli

Data da defesa: 16-12-2011

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

2011

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

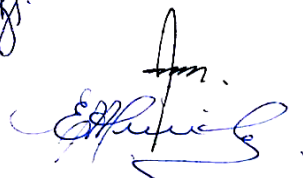
Orientador (a): *Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida*

Membros:

1. Prof.^a Dra. Adriana Zapparoli



2. Prof. Dr. José Francisco Kerr Saraiva



3. Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida

Curso de Pós – Graduação em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas, da Faculdade de Ciências Médica da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 16/12/2011

DEDICATÓRIA

*“À minha família pelo incentivo e apoio,
não medindo esforços para
as minhas realizações”*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonio Carlos Taraborelli e Ivone Parise Taraborelli cuja herança de valores e princípios foi fundamental para aquisição desta conquista.

Ao Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida, meu orientador, pela confiança, dedicação e incentivo e, também, por todo ensinamento acadêmico e de vida, que contribuíram para meu desenvolvimento tanto pessoal quanto profissional, bem como para a realização deste trabalho.

A Dra. Michiko Regina Ozaki, bióloga do laboratório, por toda ajuda e colaboração que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À técnica do laboratório, Maria Madalena de Abreu.

Aos colegas Ana Cristina de Moraes, Miguel Luis Candido, Waldemir Benedito Costa e William Adalberto Silva do Laboratório de Técnica Cirúrgica que cordialmente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos por toda ajuda, apoio e incentivo no decorrer da realização deste trabalho:

Ana Lúcia Taraborelli,

Dorival Blaker,

Edivilson Costa,

Evandro Cesar Rodrigues,

José Francisco Paraiso Ferraz Filho,

Luciana Taraborelli,

Maria Cecília Quesiti Bonazzi von Zuben,

Rafael Cremonini Barbosa,

Ranú Ramirez,

Valéria Coutinho,

E a todos os colegas e docentes do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental
que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Se vi mais longe foi porque me apoiei em ombros de gigantes”

Isaac Newton

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
3. MATERIAL E MÉTODO	36
3.1 Animais e divisão da casuística	37
3.2 Duração do experimento, dose e forma de administração da pravastatina.	37
3.3 Infarto experimental do miocárdio.....	38
3.4 Dosagens bioquímicas.	41
3.4.1 Determinação do colesterol total e triglicérides plasmáticos.....	41
3.4.2 Determinação da HDL – colesterol e da LDL - colesterol.....	42
3.4.3 Determinação do colesterol e peroxidação lipídica tecidual.....	42
3.5 Estudo da função endotelial.	43
3.6 Pressão arterial.....	46
3.7 Estatística	48
4. RESULTADOS	49
4.1 Colesterol Plasmático	50
4.2 Triglicérides	51
4.3 Lipoproteínas Plasmáticas	51
4.3.1 HDL - colesterol.....	51
4.3.2 LDL - colesterol	52
4.4 Colesterol Tecidual.....	53
4.5 Peroxidação Lipídica Tecidual.....	54

4.6	Função Endotelial.....	55
4.7	Pressão Arterial	56
5.	<i>DISCUSSÃO.....</i>	59
6.	<i>CONCLUSÃO.....</i>	77
7.	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ACH - acetilcolina

ANG II – angiotensina II

Apo – B - apolipoproteína B

Apo A – I - apolipoproteína A – I

ATP – adenosina trifosfato

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

ERONS – espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

ET – endotelina

G – grupo

G1 – grupo 1

G2 – grupo 2

G3 – grupo 3

G4 – grupo 4

G5 – grupo 5

HDL – colesterol – lipoproteína de alta densidade

HMG – CoA redutase – hidroximetilglutaril – coenzima – A redutase

ICAM-1 – molécula de adesão intracelular

IL – 1 – interleucina I

IL – 6 – interleucina 6

L- NAME - L – nitro arginina metil éster

LDL – colesterol – lipoproteína de baixa densidade

MDA - malondialdeído

MPC-1 – molécula atrativa de monócitos

NE – noradrenalina

NF – κ B – fator nuclear kappa B

NO – óxido nítrico

NPS – nitroprussiato de sódio

PAI – inibidor do ativador do plasminogênio tecidual

PCNA – proliferação celular nuclear

PCR – proteína C reativa

TBA - ácido tiobarbitúrico

TCA - ácido tricloroacético

TNF – fator de necrose tumoral

t-PA – ativador do plasminogênio tecidual

TTC - cloreto de trifetil tetrázolio

VCAM-1 – molécula de adesão vascular

VLDL – colesterol – lipoproteína de muita baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema demonstrando divisão dos grupos, tratamento e tempo de duração de cada grupo.	38
Figura 2: Demonstração da incisão no 4º espaço expondo gradeado costal por afastamento da musculatura do tórax.....	40
Figura 3 Demonstração do coração dentro da cavidade torácica após a ligadura da artéria coronária descendente.....	40
Figura 4 Transdutor de força e registrador de eventos fisiológicos (Registrador Narcotrace 40).....	44
Figura 5: Registro da reatividade do endotélio através de curvas de concentração/efeito	45
Figura 6 Anel da aorta suspenso em dois ganchos de metal.....	45
Figura 7 Dissecção da artéria carótida	46
Figura 8 Canulação da artéria carótida.....	47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Colesterol total plasmático (mg/dl). Os valores são expressos em médias e desvios padrões com * $p < 0,05$ para G4.	50
Gráfico 2– Triglicérides plasmático (mg/dl). Os valores são expressos em médias e desvios padrões com * $p \leq 0,05$	51
Gráfico 3– HDL – colesterol (mg/dl). Os valores são expressos em médias e desvios padrões com ° $p \leq 0,05$ para G5.	52
Gráfico 4– LDL – colesterol (mg/dl). Os valores são expressos em médias e desvios padrões com # $p \leq 0,05$ para G3.	53
Gráfico 5– Colesterol tecidual (mg/g). Os valores são expressos em médias e desvios padrões com # $p \leq 0,05$ para G3 e * $p \leq 0,05$ para G4.	54
Gráfico 6- Peroxidação lipídica tecidual (mg/g de tecido x 10^{-7}). Os valores estão expressos em médias e desvios padrões com * $p \leq 0,05$ para G4.	55
Gráfico 7– Função endotelial. Relaxamento expresso em porcentagem na contração induzida pela NE. Os pontos representam as médias e os desvios padrões com # $p \leq 0,05$ para G3, * $p \leq 0,05$ G4 e ° $p \leq 0,05$ para G5.	56
Gráfico 8– Pressão arterial (mmHmg). Os valores são expressos em médias e desvios padrões com * $p \leq 0,05$ para G3.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Os valores são expressos em médias e desvios padrões da glicose, colesterol total e suas frações.....58

Tabela 2- Os valores são expressos em médias e desvios padrões do colesterol e peroxidação lipídica tecidual, função endotelial e pressão arterial.58

RESUMO

Objetivo: Este estudo teve por objetivo avaliar a ação da pravastatina em ratos infartados normocolesterolêmicos em relação aos lípides plasmáticos, colesterol e peroxidação lipídica tecidual e função endotelial. **Métodos:** Foram utilizados cinquenta ratos wistar machos com três meses de idade e pesando entre 300 a 400 gramas, divididos em cinco grupos (N=10) e divididos nos seguintes grupos: grupo ratos controle (G1), grupo ratos sham (G2), grupo ratos com infarto experimental do miocárdio (G3), grupo infarto experimental do miocárdio e pravastatina sete dias após o infarto (G4) e grupo infarto experimental do miocárdio e pravastatina sete dias antes e acrescido de sete dias após infarto experimental do miocárdio (G5). A pravastatina foi administrada na dose de 7,5mg/kg/dia via gavagem. Os grupos G3, G4 e G5 foram submetidos a infarto do miocárdio por meio da ligadura da coronária descendente anterior. No final do experimento de cada grupo ocorreu a canulação da artéria carótida para verificação da pressão arterial. Os animais foram sacrificados mediante anestesia com tiopental sódico 30 mg/kg e, após, foi realizado o estudo da função endotelial, dosagem dos lípides plasmáticos, colesterol e peroxidação lipídica tecidual. Para análise dos resultados utilizou-se o teste de Man Whitney e análise de variância. **Resultados:** Não houve diferenças significativas entre os grupos quando observado os valores de glicose e triglicérides. O colesterol total no grupo G4 foi significativamente menor quando comparado aos demais grupos ($p<0,05$). Em relação a HDL – colesterol houve significância quando comparado o grupo G5 aos grupos G3 e G4. A LDL – colesterol apresentou-se significativamente menor quando comparado os grupos G4 e G5 ao grupo G3. O colesterol tecidual nos grupos G4 e G5 foi significativamente menores quando comparado ao grupo G3. A diferença significativa em relação à peroxidação lipídica ocorreu no grupo G4 quando comparado ao grupo G2. O relaxamento dependente do endotélio foi significante maior quando comparado os grupos G4 e G5 aos grupos G1, G2 e

G3. Em relação à pressão arterial a significância ocorreu entre os grupos G3 e G4.

Conclusão: A pravastatina, quando administrada em ratos normocolesterolêmicos com infarto do miocárdio, diminuiu o colesterol total, LDL – colesterol, colesterol tecidual, peroxidação lipídica e aumentou HDL – colesterol. Quanto à função endotelial, a pravastatina quando administrada antes, durante ou após o infarto resultou em melhora da disfunção endotelial.

Objective: To evaluate pravastatin action in the experimental myocardial infarct regarding to the endothelial function, plasmatic lipid, tissue lipidic peroxidation and cholesterol in infarcted normocholesterolemic rats. **Materials and Methods:** Fifty wistar rats were used divided in 5 groups (n=10): control group (G1), sham group (G2), infarct group (G3), infarct group with pravastatin seven day after the infarct (G4) and infarct group with pravastatin 7 day before and 7 day after the infarction (G5). Pravastatin was administrated 7,5mg/Kg/day via gavage. The groups G3, G4 and G5 were infarcted through the anterior descendent coronary tying. The animals were sacrificed by means of anesthesia with sodium thiopental 30mg/Kg and after this the endothelial function (Rmax), total cholesterol dosage (CT), triglycerides (TG), high density lipoprotein (HDL – c), low density lipoprotein (LDL – c), tissue lipidic peroxidation (MDA) and (Cte) cholesterol were performed. In order to do the statistical analysis the Man Whitney Test and variance analysis were used ($p \leq 0,05$ significance). **Results:** There was no significant difference among the groups when compared the glucose values and triglycerides. The total cholesterol G4 groups it was smaller significant when compared to the other groups ($p < 0,05$). In relation to HDL – c there was significance when compared the G5 group to the G3 and G4 group. LDL – c presented - if smaller significantly when compared the G4 and G5 groups to the G3 groups. The tissue cholesterol in the groups G4 and G5 there was smaller significant when compared to G3 group. The significant difference in relation to lipidic peroxidation it happened in the group G4 when compared to group G2. The dependent relaxation of the endothelium it was significant larger when compared the G4 and G5 groups to the G1, G2 and G3 groups. In relation to blood pressure the significant happened between the G3 and G4 groups. Conclusion: Pravastatin when administered in normocholesterolemic with myocardial infarct, it reduces the total cholesterol, LDL – c, tissue cholesterol,

lipidic peroxidation and it increased HDL – c. As the function endothelium, the pravastatin when administered in normocholesterolemic rats with myocardial infarct, before, during or after the infarct of the myocardium it resulted in improvement of the endothelium dysfunction.

A doença aterosclerótica é a principal causa de morbidade e mortalidade mundial, sendo o mais importante mecanismo etiopatogênico do infarto do miocárdio ^(1 2). Considerado um problema de saúde pública nos países industrializados e, já na década de 50 era a maior causa de mortalidade nos países desenvolvidos ⁽³⁾. Com o surgimento das unidades coronarianas, uso de fibrinolíticos, betabloqueadores, ácido acetilsalicílico e o desenvolvimento da angioplastia coronariana houve redução na taxa da mortalidade hospitalar em indivíduos com infarto do miocárdio nas primeiras horas de sua evolução ⁽⁴⁾.

No Brasil, no período entre 1995 a 2003, houve um aumento de 45,7% no número de internações por infarto do miocárdio. Em São Paulo entre 2000 a 2002 as doenças isquêmicas do coração foram as principais causadoras da mortalidade em todas as faixas etárias ⁽⁵⁾. Atualmente, é considerada a maior causa de morte isolada no país e o principal fator responsável pela elevada mortalidade é a despreocupação em relação aos sintomas e o consequente retardo na procura por socorro. Estima-se que ocorra cerca de 300 a 400 mil casos anuais de infarto do miocárdio, ocorrendo 325.000 mortes por doença aterosclerótica fora do hospital ou em serviços de emergência hospitalar sendo um óbito a cada cinco a sete casos ^(6 7).

Projeções para o ano de 2020 apontam a doença aterosclerótica como a principal causa de morte em consequência do aumento na expectativa de vida, ingestão de dietas ricas em gorduras saturadas, tabagismo e estilo de vida sedentário, acrescido às mudanças socioeconômicas relacionadas à urbanização, repercutindo na elevação de fatores de risco para o infarto do miocárdio ⁽⁵⁾.

Os estudos de Framingham ⁽⁸⁾ são pioneiros em ressaltar a importância de alguns fatores de risco para o desenvolvimento do infarto do miocárdio, dentre eles o tabagismo, níveis elevados de lipoproteína de baixa densidade (LDL - colesterol), baixo de lipoproteína de alta densidade (HDL - colesterol), diabetes melito, hipertensão arterial sistêmica, histórico familiar, obesidade e sedentarismo.

English *et al.* (1940) ⁽⁹⁾, foram os primeiros a verificar a estreita relação entre tabagismo e a mortalidade por doença isquêmica do coração. Os constituintes da fumaça do cigarro: monóxido de carbono, nicotina, alcatrão, entre outros, através de mecanismos que incluem a disfunção endotelial, oxidação da LDL - colesterol, redução da HDL - colesterol, aumento dos níveis das moléculas de adesão, fibrinogênio e da agregação plaquetária provocam formação de placa aterosclerótica podendo desencadear infarto do miocárdio. Paiva *et al.* (2003) ⁽¹⁰⁾ verificaram que ratos wistar submetidos à exposição crônica da fumaça do cigarro por 30 dias apresentaram depressão miocárdica ventricular esquerda resultante de alterações no tônus dos vasos, com consequente aumento da pós-carga.

Diversos estudos ^(3, 5, 7,8) verificaram a ação dos fatores de risco na ocorrência do infarto do miocárdio e constataram que, quando associados, desencadeiam disfunção endotelial através das modificações nas funções regulatórias do endotélio o que resulta em vasoconstrição. Dentre os estudos realizados está o Effect of Potentially Modifiable Risk Factors Associated with Myocardial Infarction ⁽¹¹⁾ (the INTERHEART study) que avaliou a importância dos fatores de risco para doença aterosclerótica acompanhando indivíduos com infarto do miocárdio e observou que o tabagismo e a dislipidemia sobressaíram de modo surpreendente, compreendendo mais de dois terços dos riscos responsáveis pelo infarto do miocárdio. O estudo Risk Factors for Myocardial Infarction in Brazil ⁽¹²⁾ (AFIRMAR Study Investigators) classificou o tabagismo como um dos principais preditores de risco para o infarto do miocárdio, principalmente em fumantes ativos (≥ 5 cigarros/dia). O tabagismo constitui o maior fator de risco cardiovascular isolado, é considerado fator de risco independente, sendo a vasoconstrição um dos efeitos cardiovasculares mais marcantes. O tabagismo apresenta força de associação mais potente com eventos aterotrombóticos no infarto do miocárdio que a aterosclerose coronariana isoladamente ^(13 14).

No Laboratório de Endotélio, Lípides e Aterosclerose do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental – FCM, da Universidade Estadual de Campinas, Ribeiro Jorge *et al.* (1995) ⁽¹⁵⁾ verificaram que ratos wistar machos expostos a altas

doses de fumaça de tabaco (dois cigarros sem filtro) em uma câmara fechada durante trinta minutos duas vezes ao dia, quando comparados a ratos sham – fumantes (mesmo ambiente, porém, sem presença de tabaco), apresentaram disfunção endotelial e aumento no colesterol plasmático.

A disfunção endotelial e a alteração no colesterol plasmático estão presentes também em indivíduos diabéticos. O diabetes melito tipo 2 aumenta consideravelmente o risco individual para doença aterosclerótica por estar associado ao distúrbio lipídico aterogênico, onde o nível de lipoproteína mostra uma relação inversa ao nível de insulina, o que determina ser um fator de risco cardiovascular. A associação entre diabetes melito e infarto do miocárdio tem sido demonstrada, não somente em indivíduos diabéticos, mas também em fases mais precoces da doença, quando a alteração glicêmica ocorre somente em período pós-prandial. Isso torna a incidência do infarto do miocárdio quatro vezes maior em indivíduos diabéticos com qualquer nível de colesterol, quando comparado a indivíduos não diabéticos e independe de outros fatores de risco tradicionais ⁽¹⁶⁾. O aumento excessivo da produção de ácido graxo em diabéticos, devido à elevação da concentração da glicose circulante, em consequência da deficiência da insulina, resulta em maior produção de endotelina (ET), um potente vasoconstritor. Como consequência, ocorre disfunção endotelial tanto em humanos quanto em animais, devido aos sistemas de remoção de radicais oxigenados livres estarem menos ativos, permitindo, desta maneira, que o endotélio seja alvo para o ataque de radicais livres. Isto se dá por meio da redução do estado antioxidante celular ou da maior suscetibilidade da LDL - colesterol a oxidação ^(17 18). O diabetes melito, também, desencadeia alterações no metabolismo proteico em função do desequilíbrio causado pelo hipoinsulinismo entre a síntese e degradação de proteínas, afetando negativamente na cicatrização dos tecidos. Já no metabolismo das gorduras o aumento na degradação de ácido graxo livre que estimula a geração de ânion superóxido por células endoteliais e vasculares contribui para a diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e ocasiona disfunção endotelial e aumento da resistência a insulina ^(19 20).

O Nurse's Health Study ⁽²¹⁾ (NHS) indicou que sobrepeso/obesidade pode atuar como fator de risco cardiovascular de modo independente, diretamente sobre o processo aterosclerótico, ou associado a fatores de risco causais, tais como hipertensão arterial, hipercolesterolemia, diabetes, tabagismo. Assim, a obesidade pode atuar influenciando na evolução da aterogênese e na geração de síndromes isquêmicas agudas, como o infarto do miocárdio.

O estudo The National Health and Nutrition Examination Survey ⁽²²⁾ (NHANES) comprovou que o sedentarismo também faz parte do grupo de fatores de risco para eventos coronarianos, sendo responsável pelo aumento do peso corporal, pela elevação das triglicérides e pela redução da HDL – colesterol.

A hipertensão arterial também faz parte dos fatores de risco para doença aterosclerótica²³. Considerada um fator de risco primário pode ocorrer em todas as idades e em ambos os sexos, tem origem multifatorial e está associada a um conjunto de fatores metabolicamente interligados ⁽²⁴⁾. É considerada como o fator que prevalece entre portadores de doença isquêmica do coração ⁽²⁵⁾. Caracterizada por alterações estruturais e funcionais na membrana celular, a hipertensão arterial causa anormalidades metabólicas, determinando alterações no colesterol plasmático, que por sua vez estão intimamente correlacionados com a disfunção endotelial ⁽²⁶⁾. A semelhança entre hipertensão humana e a observada em ratos inclui: fatores ambientais, predisposição genética, adaptações estruturais e precoces do coração e vasos, aumento da resistência periférica total sem expansão de volume e igual resposta ao tratamento com drogas ^(27 28).

A disfunção endotelial observada na hipertensão arterial está relacionada à deficiência na produção, na biodisponibilidade do NO ou no aumento da atividade da ET e angiotensina II (ang II). A distensão arterial induzida pelo aumento da pressão arterial faz com que o endotélio fique mais suscetível à migração de macromoléculas e células na parede arterial, incluindo monócitos, macrófagos e principalmente LDL – colesterol, desencadeando estresse oxidativo e disfunção endotelial ⁽²⁹⁾.

O sistema renina angiotensina é um dos fatores determinantes no equilíbrio do funcionamento do sistema cardiovascular como um todo e exerce papel no controle da pressão arterial. A produção de radicais livres de oxigênio pela ativação do receptor AT1 da angiotensina promove a inativação do NO, aumento da oxidação da LDL - colesterol, captação da LDL oxidada e formação das células espumosas. A presença do desequilíbrio na modulação existente entre os peptídeos do sistema renina angiotensina, levando ao predomínio da ang II via receptor ATI, ou à redução da angiotensina (1-7) via receptor Mas, estão intimamente relacionados ao aparecimento e progressão da doença aterosclerótica. A ang II, ativada via receptor ATI, é um potente vasoconstritor que contribui para expressão de moléculas de adesão, aumento na expressão de citocinas, quimiocinas, oxidação de LDL - colesterol e peroxidação lipídica. Também, favorece o recrutamento de monócitos e linfócitos, proliferação de músculo liso vascular, disfunção endotelial, inibição da ativação do plasminogênio, aumento da resistência periférica, diminuição da oferta do NO e aumento da produção de radicais livres de oxigênio e nitrogênio (ERONS) ^(30 31).

Existe forte associação entre a hipertensão arterial e a dislipidemia. A relação entre ambos os eventos é a disfunção endotelial ⁽²⁴⁾. A dislipidemia, cujo perfil lipídico é caracterizado pelo aumento dos triglicérides, diminuição da HDL - colesterol e alteração qualitativa da LDL – colesterol, torna-a mais aterogênica e confere elevado risco para doença aterosclerótica. ⁽³²⁾.

É conhecido, que a hipercolesterolemia é consequência da remoção deficiente de lipoproteína rica em colesterol que passa a se acumular na corrente sanguínea. Em paralelo, a hipercolesterolemia estimula o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pelo endotélio. A combinação do aumento do número de partículas, do prolongamento do tempo de resistência dessas lipoproteínas na circulação e o aumento da produção endotelial de radicais livres, aumentam substancialmente a produção de LDL - colesterol oxidado nos indivíduos hipercolesterolêmicos. Além de causar disfunção endotelial, a

hipercolesterolemia também estimula a ativação de sistemas vasoconstritores, como a cascata renina – angiotensina e ET.

O infarto do miocárdio consiste na morte dos miócitos que é causada pelo desequilíbrio prolongado entre o suprimento e a demanda de oxigênio devido à repentina redução do fluxo sanguíneo coronário, geralmente causada pela presença de aterosclerose. Quando o fluxo sanguíneo é interrompido, uma série de processos metabólicos e enzimáticos é afetada. As reservas de adenosina trifosfato (ATP) são rapidamente desgastadas, há acúmulo de lactato, a célula torna-se acidótica. As proteases intracelulares são ativadas e ocorre redução na concentração de antioxidantes endógenos, levando a um aumento na produção e liberação dos radicais livres. Isso determina profundas alterações metabólicas, elétricas e contráteis no miocárdio. Sendo assim, o infarto do miocárdio resulta em aumento do estresse oxidativo onde as espécies reativas de oxigênio ativam diversos sinalizadores celulares que participam do processo inflamatório da região infartada. Os níveis de diversos moduladores como ang II, ET, catecolaminas, fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) e fator de crescimento encontram-se aumentados nos indivíduos com infarto do miocárdio, com participação na regulação dos eventos iniciais do infarto, como reação inflamatória e processo de cicatrização. O processo inflamatório é caracterizado pelo acúmulo de células inflamatórias e edema, seguindo-se a fase de proliferação de fibroblastos com depósito de colágeno e o tecido necrótico é substituído pelo fibroso. O miocárdio passa a sofrer modificações que resultam em alterações não somente no tecido infartado, mas em todo o coração e aparelho cardiovascular ^(33, 34, 35).

Durante a fase recente do infarto ocorrem, também, alterações hemodinâmicas como a queda do volume sistólico, débito cardíaco e pressão sistólica do ventrículo esquerdo. A diminuição do volume de ejeção por disfunção contrátil do ventrículo esquerdo leva ao aumento da isquemia, tanto por aumento do trabalho cardíaco como por diminuição da perfusão consequente à diminuição

da pressão arterial, que acarreta aumento da disfunção ventricular. Paralelamente, ocorre aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo ⁽³⁴⁾.

A oclusão coronariana é a técnica mais utilizada para o estudo das alterações fisiopatológicas decorrentes do infarto experimental do miocárdio, sendo o rato um animal muito utilizado para este fim. Algumas características justificam este fato: por ser um animal de pequeno porte, fácil de ser obtido e manuseado, resistente à agressão cirúrgica, rápida capacidade de desenvolver o infarto em todas suas etapas (necrose, cicatrização e remodelamento) ⁽³⁵⁾. O rato possui circulação colateral escassa e as alterações morfológicas e funcionais decorrentes do infarto se assemelham às encontradas em humanos ⁽³⁶⁾. Silva *et al.* (2005) ⁽³⁷⁾ verificaram que o miocárdio de ratos wistar, após serem submetidos à isquemia, sofreu modificações que resultaram num complexo de alterações envolvendo não somente o tecido lesado, mas todo o miocárdio. Para adaptar-se à nova condição, a região isquêmica modificou-se morfolologicamente e após a reação inflamatória local, as fibras lesadas começaram a ser substituídas por tecido fibroso, formando uma cicatriz. Observou-se, também, aumento na lipoperoxidação e diminuição da atividade das enzimas antioxidantes, que representam uma situação de estresse oxidativo.

A expansão do infarto é responsável por várias alterações hemodinâmicas. Em ratos, a função ventricular e a sobrevivência estão relacionadas ao tamanho do infarto e, desta maneira, infartos menores que 30% não apresentam anormalidades hemodinâmicas, infartos moderados, entre 31 e 46% têm valores basais normais, mas capacidade reduzida de gerar pressão e o infarto grande $\geq 46\%$ apresenta elevação na pressão diastólica e redução do débito cardíaco. Dentro de três horas após a oclusão é possível identificar alterações sistólicas e diastólicas ⁽³⁴⁾. Em relação à mortalidade, Pfeffer *et al.* (1985) ⁽³⁸⁾ verificaram que para infartos pequenos, moderados e grandes a taxa da mortalidade fica ao redor de 50%, 75% e 85% respectivamente.

Em humanos admite-se que, após o infarto do miocárdio, há uma repentina e significativa diminuição no colesterol plasmático e os menores valores são obtidos entre o quarto e quinto dia ⁽³⁹⁾. O declínio pós-infarto ocorre devido à resposta de fase aguda incluindo vasodilatação, infiltração de leucócitos, ativação de monócitos em macrófagos e liberação de citocinas, que atuam sobre o fígado ocasionando mudanças na concentração de várias proteínas no plasma, incluindo lipoproteína e proteína C reativa (PCR). Ocorre diminuição nos níveis da apolipoproteínas – A – I (apo A – I) e apolipoproteína – B (apo – B) que reflete a diminuição do colesterol plasmático ⁽⁴⁰⁾. Enquanto o colesterol plasmático diminui após o infarto, os triglicérides aumentam, devido ao aumento da PCR que interfere em seu catabolismo, por se ligarem seletivamente à LDL – colesterol e à lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL – colesterol), que interfere em seu catabolismo ⁽⁴¹⁾. A PCR é um fator de risco independente para o infarto do miocárdio, considerada um marcador de resposta inflamatória produzida, principalmente, pelo hepatócito, através do estímulo da IL-6. A PCR induz a expressão de moléculas de adesão, aumenta a capacidade de captação de LDL – colesterol pelos macrófagos e reduz a expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) ^(42,43,44). O endotélio é uma camada unicelular que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos ⁽⁴⁵⁾. No passado era considerado apenas uma barreira inerte, mas, atualmente é reconhecido como um órgão metabolicamente ativo com funções autócrina, parácrina e endócrina ⁽⁴⁶⁾. É seletivamente permeável e possui receptores para várias moléculas na membrana celular incluindo proteínas (fatores de crescimento, proteínas coagulantes e anticoagulantes), partículas transportadoras de lípidos (LDL - colesterol), metabólitos (NO e serotonina) e hormônio (ET) ⁽⁴⁷⁾. Além de produzir mediadores vasoconstritores e vasodilatadores que atuam no controle do tônus e do fluxo vascular em situações fisiológicas, o endotélio desempenha também papel protetor do vaso sanguíneo ⁽⁴⁸⁾.

Furgchott e Zawadski (1980) ⁽⁴⁹⁾ estabeleceram o endotélio como a sede do desencadeamento de grande parte das doenças vasculares, confirmando o

relaxamento vascular em resposta a efetores como acetilcolina (ACH). A ACH e outras substâncias vasoativas, designadas vasodilatadoras dependentes do endotélio, requerem a integridade funcional das células endoteliais para produção de relaxamento arterial. Moncada *et al.* (1977)⁽⁵⁰⁾ já haviam verificado a importância do endotélio no controle do tônus vascular através de substâncias vasoativas. Palmer *et al.* (1987)⁽⁵¹⁾ e Ignarro *et al.* (1988)⁽⁵²⁾ demonstraram que o relaxamento vascular induzido por ACH foi dependente do endotélio e evidenciaram que o efeito demonstrado era mediado por um fator de relaxamento derivado do endotélio denominado NO.

O NO é sintetizado nas células endoteliais vasculares a partir da oxidação do aminoácido L-arginina pela ação da eNOS. É liberado em condições basais pelas células endoteliais, mantendo o vaso em estado de dilatação mediante estímulos que incluem as alterações do fluxo sanguíneo, estresse parietal e tensão do oxigênio. Atua como inibidor da adesão e agregação plaquetária, impede a proliferação de músculo liso vascular, limita o recrutamento de leucócitos pela célula endotelial e inibe a produção do fator tecidual. Assim, em condições como a hipercolesterolemia, hipertensão arterial sistêmica, entre outros, a produção de NO pode não se alterar, porém, sua biodisponibilidade pode ser diminuída pela excessiva produção de radical superóxido na parede vascular^(53 54). As células endoteliais, também produzem vasoconstritores potentes, como a ET, que tem por função regular o fluxo sanguíneo arterial. É liberada das células endoteliais ligando-se a receptores específicos nas células musculares lisas vasculares, que resulta em aumento da concentração intracelular de cálcio e leva à vasoconstrição. No endotélio funcionalmente intacto, a ET estimula produção do NO que então modula a ação vasoconstritora e reduz a síntese da própria ET. Os fatores de risco cardiovasculares mais frequentes levam a modificações nas funções regulatórias do endotélio com perda da ação vasodilatadora tornando-o incapaz de manter o homeostase vascular que aumenta a propensão à vasoconstrição, trombose, inflamação, proliferação celular na parede do vaso e diminuição na produção ou biodisponibilidade do NO. Essas modificações na

função vascular caracterizadas pelo desequilíbrio entre a ação vasodilatadora e a vasoconstritora, predominando a vasoconstrição, foram denominadas de disfunção endotelial ⁽⁴⁵⁻⁴⁸⁾. A disfunção endotelial foi caracterizada por Ludmer *et al.* (1986) ⁽⁵⁵⁾ em humanos ao verificar que artérias coronárias ateroscleróticas contraem em resposta à infusão de ACH, enquanto coronárias normais apresentam dilatação. Dentre as alterações ocasionadas, a diminuição na biodisponibilidade do NO pelo endotélio é considerada a mais importante devido à inativação oxidativa causada pela excessiva produção de radicais livres de oxigênio na parede vascular. O radical superóxido, uma das principais espécies reativas de oxigênio, reage rapidamente com o NO que inibe sua bioatividade e gera o peroxinitrito, que é capaz de oxidar moléculas de LDL - colesterol. As espécies reativas de oxigênio participam de várias vias sinalizadoras, inclusive aquelas relacionadas ao crescimento normal das células musculares lisas, mas, quando em excesso, levam à disfunção endotelial, oxidação de lipídeos e expressão de genes responsáveis pela modulação e transcrição de moléculas pró-inflamatórias, tais como as de adesão vascular (VCAM-1), de adesão intercelular (ICAM-1) e atrativas de monócitos (MPC-1). A via comum a vários estímulos aterogênicos, dentre os quais se incluem os receptores AT1 de ang II, a hipercolesterolemia, a hipertensão arterial, o diabetes melito, tabagismo, entre outros, é o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio radicais livres, principais componentes dessa via metabólica em células endoteliais, musculares lisas e fibroblastos. Desta forma, a disfunção endotelial pode também ser caracterizada como um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e mecanismos antioxidantes ⁽⁵⁴⁾.

Independente de outros fatores cardiovasculares, a disfunção endotelial representa um marcador precoce da aterosclerose ocorrendo antes mesmo que se possa detectar qualquer alteração morfológica no vaso ⁽⁵⁵⁾. Sendo a hipercolesterolemia um dos fatores responsáveis pela disfunção endotelial e aterosclerose, a terapêutica com os agentes hipolipemiantes tem demonstrado ser uma estratégia adequada ao tratamento e prevenção. Dentre os diversos

medicamentos utilizados na redução do colesterol plasmático, as estatinas têm se destacado na redução de eventos cardiovasculares, como o infarto do miocárdio.

Desde que as estatinas foram aprovadas para uso no tratamento da hipercolesterolemia em 1987, houve um considerável avanço na compreensão de sua ação farmacológica e seu benefício terapêutico na prevenção primária e secundária em eventos coronarianos. Considerada a primeira linha no tratamento da hiperlipidemia, as estatinas foram desenvolvidas e testadas clinicamente com base na sua capacidade em interromper a biossíntese do colesterol, de forma potente e eficaz ⁽⁵⁶⁾. Originárias em culturas de fungos, a primeira substância desta família, a vastatina, foi isolada da cultura de *Penicillium citrinum* em 1976 e chamada de compactina. Desde então, foram produzidas outras substâncias com fórmulas estruturais semelhantes, porém mais potentes. A pravastatina foi obtida da cultura do fungo *Nocardia autrophica*, sendo fármaco ativo em sua forma de administração, hidrossolúvel com absorção de 30% a 50% da dose ingerida ⁽⁵⁷⁾. As estatinas exercem seus efeitos através da inibição por competição com a hidroximetilglutaril – coenzima – A (HMG – CoA) redutase, enzima que catalisa a etapa inicial limitante da velocidade de biossíntese de colesterol, ao impedir a síntese do ácido mevalônico impedindo também, a síntese de intermediários isoprenóides da via do mevalonato e da biossíntese do colesterol ⁽⁵⁸⁾. Os isoprenóides participam da modificação pós-tradução de um conjunto de proteínas sinalizadoras intracelulares que, ao intervirem na transdução de sinal, afetam, por exemplo, a regulação do crescimento e da diferenciação celular, o transporte protéico e lipídico, processo esse conhecido como prenilação. As estatinas bloqueiam a síntese dos isoprenóides que resulta em menor expressão de substâncias inflamatórias ou relacionadas com a aterogênese, como IL-6, moléculas de adesão de monócitos, proteínas relacionadas com a hemostasia, como o inibidor do ativador do plasminogênio tecidual (PAI). Ao ocorrer redução intracelular do colesterol com o uso de inibidor da HMG- CoA redutase, há estímulo para formação de receptor de LDL – colesterol na membrana celular o que determina maior captação de LDL – colesterol da circulação, com diminuição

no seu nível plasmático. As estatinas também reduzem a LDL - colesterol através da inibição da síntese hepática da VLDL – colesterol ^(58 59). As estatinas atuam primeiramente no fígado onde um sistema especial de transporte permite sua incorporação ao tecido hepático para biotransformação. O transporte para o tecido hepático é influenciado pelos OATPS (Organic Anion Transporting Polypeptides), uma família de transportadores expressa em vários órgãos responsáveis pelo transporte de várias substâncias, entre elas as estatinas ⁽⁵⁹⁾. Apesar dos efeitos das estatinas serem atribuídos à sua capacidade de reduzir o colesterol plasmático, estudos clínicos ^(60, 61) sugerem que estas possuem efeitos que independem da diminuição no colesterol plasmático, conhecido por efeitos pleiotrópicos. Do ponto de vista farmacodinâmico, as estatinas são bastante seletivas para atuação junto a HMG-CoA redutase e os efeitos pleiotrópicos desses fármacos parecem depender de uma menor ativação de algumas proteínas que interferem em várias e importantes vias de sinalização celular relacionada a genes que condicionam a síntese de citocinas inflamatórias, fatores de coagulação ou relacionadas à maior expressão do NO. Assim, a redução do mevalonato determina menor ativação das proteínas Ras e Rho promovendo efeitos antiinflamatórios, melhora da disfunção endotelial, redução do estresse oxidativo, redução da adesividade plaquetária e da formação de trombos ^(59 60,61).

O aumento na evidência da eficácia da estatina na proteção contra eventos vasculares independente dos níveis de colesterol tem elucidado a pesquisa sobre os efeitos pleiotrópicos deste fármaco. Acredita-se que esses efeitos ocorrem através da ativação de vias mediadas pela proteína quinase que aumenta a atividade da eNOS com aumento na produção do NO, síntese protéica e proliferação celular, que acarreta inibição da apoptose ⁽⁶²⁾. O pioneiro estudo Scandinavian Simvastatin Survival Study Group ⁽⁶³⁾ (4S) publicado em 1994 demonstrou o benefício da sinvastatina na prevenção secundária em eventos cardiovasculares. O uso da sinvastatina em indivíduos com infarto do miocárdio ou angina prévia e níveis médios de colesterol total demonstrou redução na taxa da mortalidade e também no risco cardiovascular. Outros estudos como o West of

Scotland Prevention Study Group ⁽⁶⁴⁾ (WOSCOP), Reduction of Cholesterol in Ischemia and Function of the Endothelium ⁽⁶⁵⁾ (RECIFE), Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy – Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 ⁽²²⁾ (Prove It – 22), entre outros, também sugerem que as estatinas apresentam efeitos benéficos que vão além da redução do colesterol plasmático. O Laboratório de estudos em Endotélio, Lípidos e Aterosclerose - FCM – UNICAMP por meio de estudos experimentais tem comprovado os efeitos das estatinas de modo especial sobre a função endotelial, quando administrada na presença de fatores de risco, como a hipercolesterolemia.

Desde que as estatinas foram reconhecidas como os principais agentes redutores de lipídios, sua administração no infarto do miocárdio tem apresentado efeitos benéficos independentes da sua ação sobre o colesterol plasmático e LDL – colesterol. A IV Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio, bem como a diretriz americana, indica as estatinas no infarto do miocárdio tendo como meta terapêutica lipídica LDL < 70 mg/dl. Sendo assim, objetivamos verificar os mecanismos da ação da pravastatina no infarto experimental do miocárdio em ratos com ausência de fatores de riscos conhecidos para tal situação, em relação à função endotelial, colesterol e peroxidação lipídica tecidual e lípidos plasmáticos, no intuito de justificar sua utilização independentemente da existência de hipercolesterolemia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação da pravastatina no infarto experimental do miocárdio em ratos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a ação da pravastatina no infarto experimental do miocárdio em relação aos:

- Lípides plasmáticos
- Colesterol tecidual
- Peroxidação lipídica tecidual
- Função endotelial

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e divisão da casuística

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA) conforme protocolo número 1103-1. O experimento foi realizado de acordo com as resoluções brasileiras específicas de bioética de pesquisa com animais Lei nº 11.794/2008 ⁽⁶⁷⁾.

Para realização deste experimento foram utilizados ratos wistar machos com três meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas pesando entre 350 a 400 gramas. Os animais foram mantidos no biotério, em gaiolas coletivas, sob condições ambientais controladas de temperatura 25°C com ciclo claro/escuro (12/12horas), água, ventilação e ruído e, ração à vontade. No decorrer do experimento os mesmos apresentaram aspectos saudáveis o que indicou que, tanto o estado sanitário, quanto o manejo foram realizados de forma adequada e eficiente.

Os ratos foram divididos em cinco grupos (n=10):

Grupo 1 (G1) – ratos controle, sem nenhum procedimento.

Grupo 2 (G2) - ratos sham, nos quais se transpassou o fio sob a coronária, mas sem dar nó.

Grupo 3 (G3) - ratos controle com infarto do miocárdio.

Grupo 4 (G4) - ratos com infarto do miocárdio + pravastatina pós – infarto durante sete dias.

Grupo 5 (G5) - ratos com infarto do miocárdio + pravastatina durante sete dias antes do infarto e sete dias pós – infarto.

3.2 Duração do experimento, dose e forma de administração da pravastatina.

O experimento teve duração de sete dias para os grupos G2, G3 e G4 e de catorze dias para o grupo G5. Nos grupos G2, G3, G4 e G5 o sacrifício foi realizado após sete dias da cirurgia. Antes do sacrifício foi verificado o valor da pressão arterial na artéria carótida e colhido sangue para dosagem dos lípides plasmáticos, colesterol e peroxidação lipídica tecidual e, após, realizado o estudo da função endotelial.

A pravastatina foi administrada via gavagem na dose 7,5mg/kg/dia após ser diluída em água destilada com o uso de seringa de 3ml e conectada a uma sonda nasogástrica número 06.

No final do experimento os animais foram sacrificados com aprofundamento anestésico do tiopental na dose de 30 mg/kg.

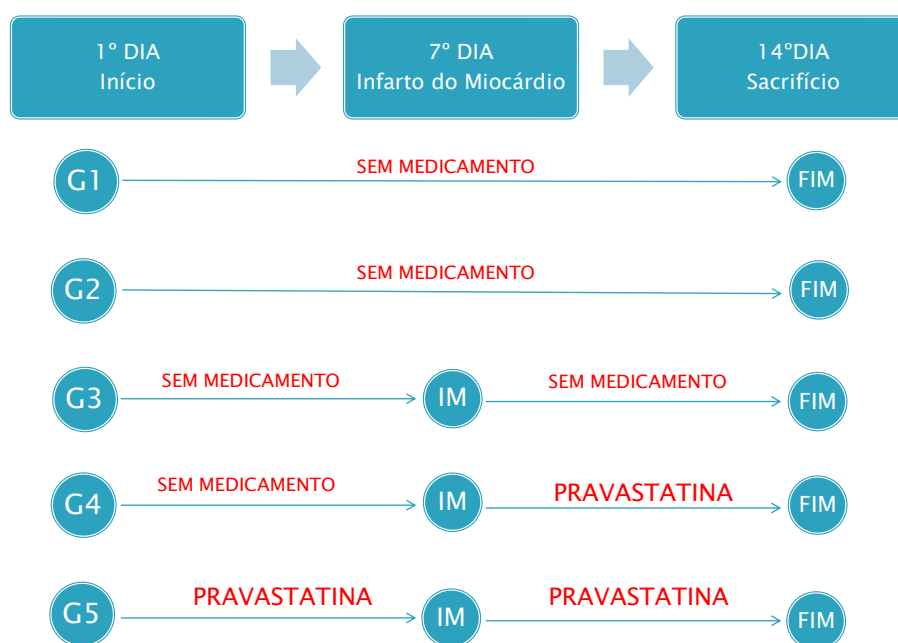


Figura 1- Esquema demonstrando divisão dos grupos, tratamento e tempo de duração de cada grupo.

3.3 Infarto experimental do miocárdio

O infarto experimental foi realizado segundo a técnica de Johns e Olson ⁽⁶⁸⁾ 1954, com modificações descritas a seguir.

Os animais foram anestesiados por meio da inalação de éter durante cinco minutos dentro de uma cuba cilíndrica fechada. Em seguida, foram imobilizados e submetidos a uma incisão entre quarto a quinto espaços intercostais. O coração foi exteriorizado por compressão lateral do tórax, realizado com o polegar e o indicador e após, seguro com pinça revestida de algodão na ponta, enquanto era feita a ligação da artéria coronária. A ligadura da artéria coronária descendente anterior foi feita cerca de 2 mm de sua origem, com fio 4.0 surgilene, entre a borda do átrio esquerdo e a artéria pulmonar. Logo após, o coração foi recolocado na cavidade torácica e o tórax suturado com fio 3.0 de algodão. Os animais ficaram em observação contínua por 12 horas (período de recuperação).

Foram considerados para estudo apenas os animais com infartos envolvendo, no mínimo, 40% da área total do ventrículo esquerdo, considerados infartos grandes ⁽⁶⁹⁾. A determinação do tamanho do infarto foi realizada através da quantificação da área infartada em relação à área total do ventrículo esquerdo e foi utilizado o cloreto de trifênil tetrazólio (TTC). Os corações foram cortados em partes perpendiculares do septo interventricular da base à ponta do órgão. Para facilitar tal procedimento foi injetada gelatina 50% por cânula inserida no ventrículo esquerdo através da aorta e, em seguida, resfriado para solidificação do gel. A coloração com TTC permite visualizar a perda da atividade enzimática na área infartada desaparecendo a coloração vermelha e dando lugar à coloração pálida.

Para verificação da microscopia os fragmentos foram deixados em formol 10%, envolvidos em bloco de parafina e corados com hematoxilina-eosina ⁽⁷⁰⁾. A partir dos cortes histológicos montados em lâminas e lamínulas, foi delimitada a área do ventrículo esquerdo e do infarto. O cálculo da área enfartada foi realizado através do cálculo da porcentagem da área enfartada em relação à área total do ventrículo esquerdo, utilizando software Scion.

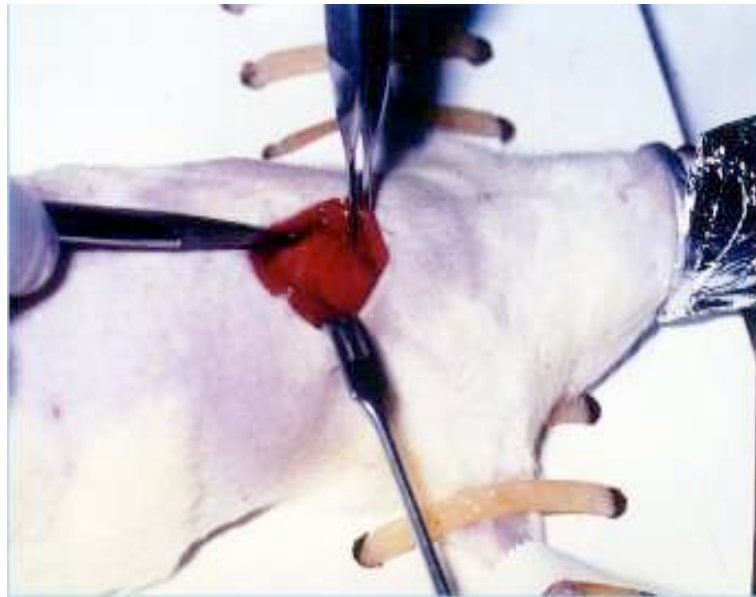


Figura 2: Demonstração da incisão no 4º espaço expondo gradeado costal por afastamento da musculatura do tórax

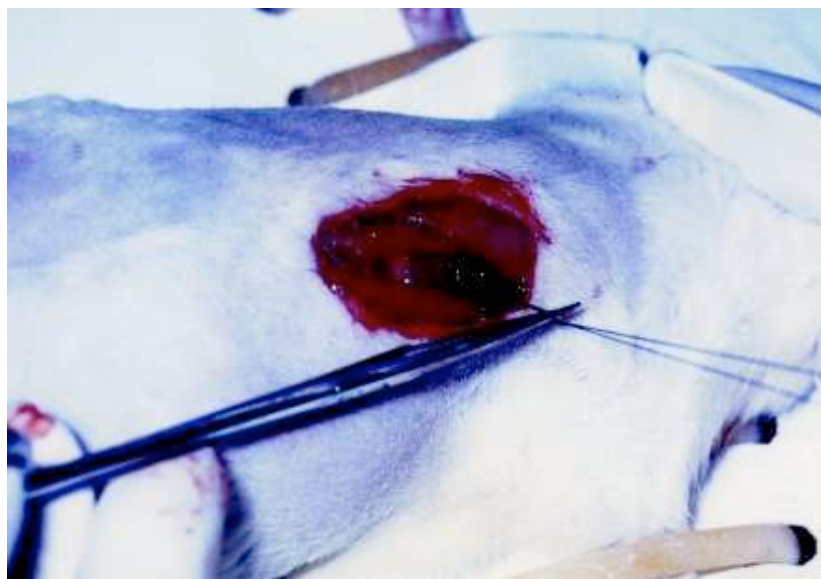


Figura 3 Demonstração do coração dentro da cavidade torácica após a ligadura da artéria coronária descendente.

3.4 Dosagens bioquímicas.

Os ratos foram deixados em jejum por 16 horas antes da coleta de sangue. A amostra de sangue foi retirada através da punção cardíaca realizada antes do sacrifício em todos os animais. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

O plasma foi separado por ultracentrifugação na centrífuga refrigerada marca HITACHI (Modelo RC% C , Du Pont Company, Newtown, ct, EUA), a 4°C por 20 minutos a 3.000 r.p.m e imediatamente processados.

As dosagens bioquímicas foram realizadas utilizando *Kits* enzimáticos da marca Laborlab e espectrofotômetro da marca Genesys 10 vv .

Os níveis plasmáticos de colesterol total, LDL – colesterol, HDL – colesterol e triglicérides foram expressos em mg/dl.

3.4.1 Determinação do colesterol total e triglicérides plasmáticos.

A medida do colesterol plasmático foi realizada pelo método enzimático onde a hidrólise do colesterol e ésteres de colesterol estão acoplados a uma reação de cor, monitorada a 500nm. Para cada 10 μ de plasma foi adicionado um (01) ml de reativo. A amostra foi incubada a 37°C por 5 minutos. Foi utilizada como padrão uma concentração de 200mg/dl.

A quantificação dos triglicérides foi realizada pelo método enzimático por meio do qual ocorre a liberação do glicerol que é determinado por uma reação de cor com leitura 500nm. Para cada 10 μ de amostra foi adicionado um (01) ml de reativo. A amostra foi incubada a 37°C por 5 minutos. Foi utilizada como padrão uma amostra de 200mg/dl.

3.4.2 Determinação da HDL – colesterol e da LDL - colesterol.

A determinação da fração da HDL - colesterol foi obtida pelo mesmo método utilizado na determinação do colesterol total, após a precipitação das lipoproteínas que contêm apo B com solução precipitante composta de cloreto de magnésio e ácido fosfotungstico.

As frações de LDL – colesterol e VLDL – colesterol foram obtidas por meio da fórmula de Friedwald (1982) ⁽⁷¹⁾, que consiste em calcular a diferença entre o colesterol total e a somatória das frações de HDL e VLDL do colesterol. A determinação da fração da VLDL colesterol foi obtida através da divisão dos níveis plasmáticos de triglicérides por 5 e é válida para valores de triglicérides até 400mg/dl. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.4.3 Determinação do colesterol e peroxidação lipídica tecidual.

O teor do colesterol tecidual foi medido em anéis da aorta de acordo com o método de Naito e David (1981)⁷². Os espécimes foram secos e homogeneizados a 4°C em 1,5mL de tampão TRIS HCL (pH 7,4), acrescido de 0,01 NaNO₃. Os lípides totais foram extraídos e homogeneizados em 10 vol. de clorofórmio metanol contendo 0.001% de hidroxitolueno butilado, como antioxidante e, em seguida, medido por ensaio enzimático. O conteúdo aórtico de colesterol foi expresso em mg/g de tecido.

A peroxidação lipídica foi realizada em tampão fosfato, pH 7,4 em presença de sulfato de cobre (5mM) a 37°C, por 24h. A medida da peroxidação lipídica foi feita pela produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), expressas como equivalentes de malondialdeído (MDA) por mg de proteína. O segmento da aorta torácica próximo ao arco aórtico (10mg de tecido) foi macerado e homogeneizado com 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% e depois de misturado a um (01) ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%. A mistura foi aquecida a 100°C por 30 minutos e em seguida centrifugado durante 15 minutos. O teor das

substâncias reativas com TBA foi determinado pelo método de Bueg *et al.* (1978)⁽⁷³⁾ com a leitura a 532 nm de absorbância realizada mediante incubação de 100 µ de proteína de LDL/mL em tampão fosfato pH 7,4. O conteúdo aórtico de MDA foi expresso em nmol/mg de tecido x 10⁻⁷. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.5 Estudo da função endotelial.

O estudo da função endotelial foi realizado em segmento de 4-5 mm de aorta torácica após a limpeza com cuidado para que o endotélio pudesse permanecer intacto. Os anéis foram suspensos em uma solução de Krebs – Henseleit com a seguinte composição (mmol/l): NaCL, 113; KCL, 4,74; CaCL₂, 1,9; NaHCO₃, 25,0; MgSO₄, 0,44; KH₂PO₄, 1,18; EDTA, 0,03; C₆H₁₂O₆, 11,0, com pH 7,4. A solução foi continuamente aerada com 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico. Os anéis da aorta foram suspensos em dois ganchos de metal ligados a um transdutor de força e um registrador de eventos fisiológicos (Registrador Narcotrace 40). Após, uma hora de equilíbrio, com troca da solução de Krebs a cada 20 minutos, foram distendidos a uma tensão basal de 1g e contraídos com noradrenalina (NE) (10⁻⁷M) por 10 minutos. Depois da estabilização da contração foi adicionado ACH de forma cumulativa (10⁻⁸ a 10⁻⁵M) para verificar a reatividade do endotélio através de curvas de concentração/efeito. Após, um novo período de estabilização de 30 minutos, foram feitas duas trocas da solução de Krebs – Henseleit, os anéis de aorta foram contraídos com NE (10⁻⁷ M) e uma nova curva de concentração/efeito com nitroprussiato de sódio (NPS) de forma cumulativa foi obtida para verificar a contração da musculatura lisa da camada média da arterial, independente do endotélio⁽⁷⁴⁾.



Figura 4 Transdutor de força e registrador de eventos fisiológicos (Registrador Narcotrace 40)

3.6 Pressão arterial.

A verificação da pressão arterial foi realizada diretamente na artéria carótida⁽⁷⁵⁾ em todos os animais, antes do sacrifício. A cateterização da artéria carótida ocorreu após o animal ser anestesiado com pentobarbital sódico a 3% através da punção da veia caudal. Foram administrados 0,3ml a cada 100 gramas e efetuada a dissecação da artéria. Em seguida, foi introduzido um cateter de polietileno conectado à torneira de três vias ligada a um tubo extensor de polietileno e conectado a um fisiógrafo modelo biomonitor 7 - Bese. A medida da pressão arterial foi realizada com a calibração do equipamento em zero, tendo como base a linha axilar média. Os animais permaneceram um período em repouso depois da instalação dos catéteres. Ao término da verificação da pressão os animais foram sacrificados com aprofundamento anestésico do tiopental na dose de 30 mg/kg.



Figura 7 Dissecção da artéria carótida

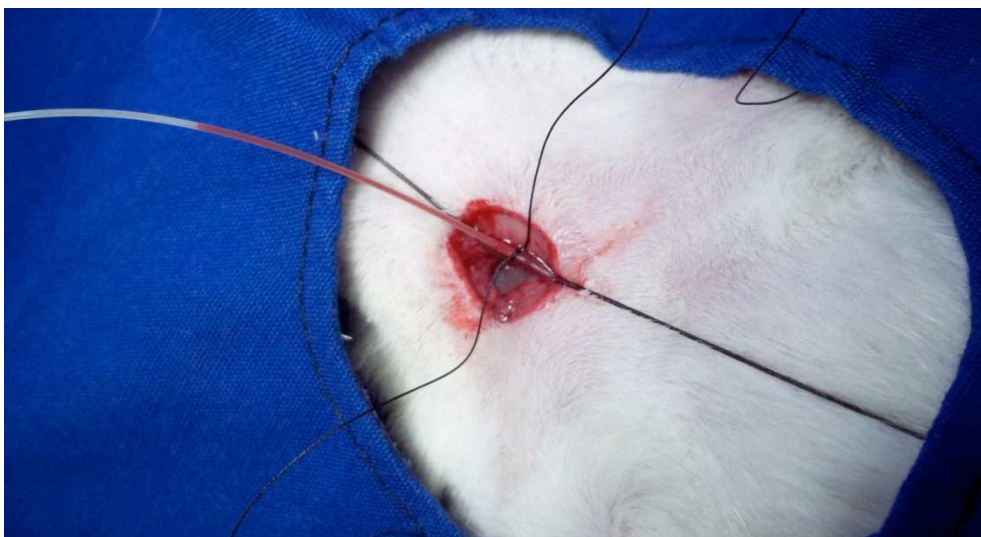


Figura 8 Canulação da artéria carótida

3.7 Estatística

Os dados foram analisados no setor de estatística da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Para comparação das variáveis foi utilizado o teste de Kruskal – Wallis ou a ANOVA com transformação por postos seguida pelo teste de Tukey para localização das diferenças, quando necessário^{76,77}. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%. ($p < 0,05$).

As curvas que expressam o relaxamento dependente do endotélio foram comparadas por análise de co-variância.

4. RESULTADOS

Os resultados estão apresentados em médias e desvios padrões demonstrados em gráficos e tabela.

4.1 Colesterol Plasmático

O gráfico 1 representa as concentrações plasmáticas do colesterol total nos diferentes grupos. O grupo G4 apresentou redução significativa na concentração plasmática do colesterol total quando comparado aos grupos G1, G2, G3 e G5.

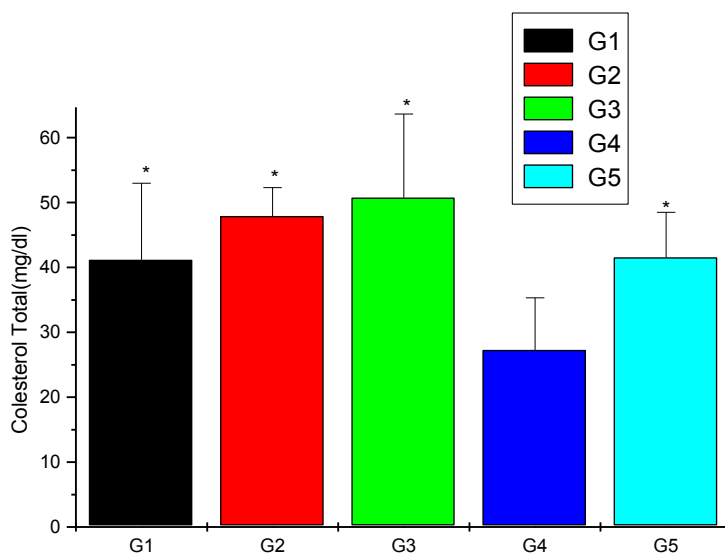


Gráfico 1 Colesterol total plasmático (mg/dl). Os valores são expressos em médias e desvios padrões com * $p < 0,05$ para G4.

4.2 Triglicérides

O gráfico 2 representa as concentrações plasmáticas dos triglicérides entre os grupos G1, G2, G3, G4 e G5. Não houve diferença significativa entre os cinco grupos.

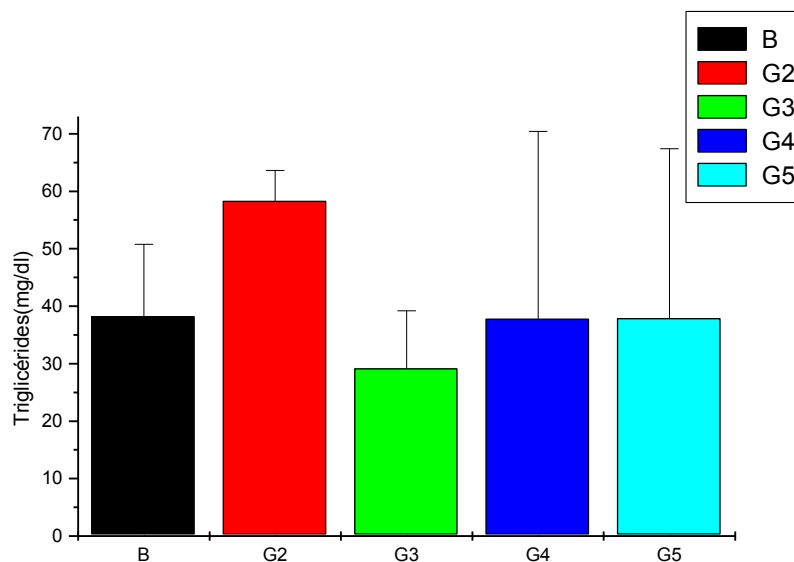


Gráfico 2– Triglicérides plasmático (mg/dl). Os valores são expressos em médias e desvios padrões com * $p \leq 0,05$.

4.3 Lipoproteínas Plasmáticas

4.3.1 HDL - colesterol

O gráfico 3 representa os valores da HDL - colesterol dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5. O grupo G3 não apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos G1 e G2. Houve diferença significativa quando comparado o grupo G5 aos grupos G3 e G4.

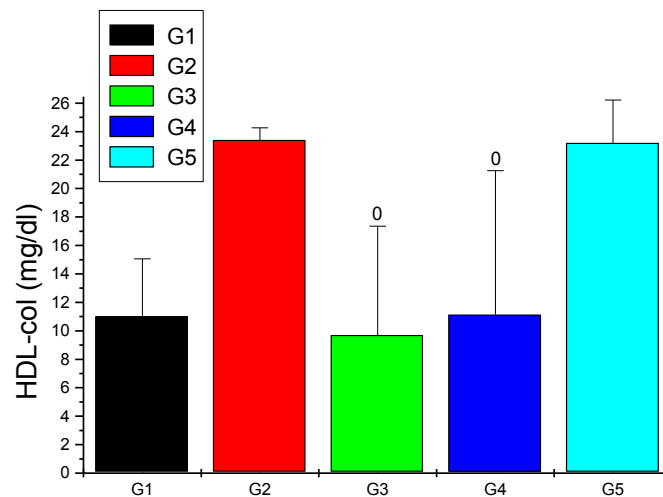


Gráfico 3– HDL – colesterol (mg/dl). Os valores são expressos em médias e desvios padrões com $^{\circ}p \leq 0,05$ para G5.

4.3.2 LDL - colesterol

O gráfico 4 representa a concentração do LDL - colesterol nos cinco grupos. Os grupos G2, G4 e G5 quando comparados ao grupo G3 apresentaram redução significativa na concentração da LDL – colesterol.

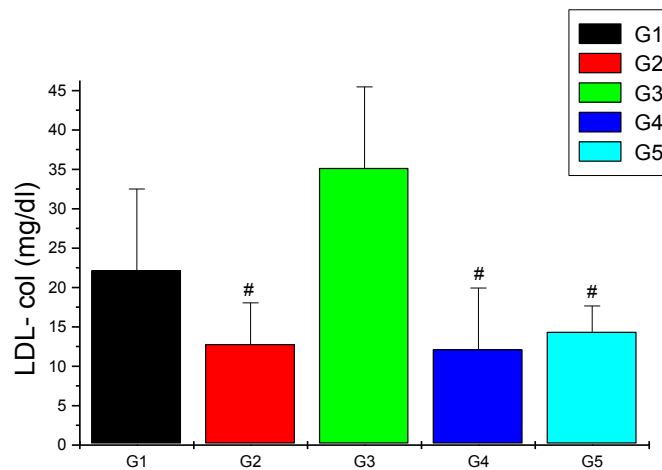


Gráfico 4— LDL – colesterol (mg/dl). Os valores são expressos em médias e desvios padrões com # $p \leq 0,05$ para G3.

4.4 Colesterol Tecidual

O gráfico 5 representa a concentração do colesterol tecidual nos cinco grupos. Os grupos G4 e G5 apresentaram redução significativa na concentração do colesterol tecidual quando comparados ao grupo G3. Houve diferença significativa também quando comparado o grupo G1 aos grupos G2 e G4.

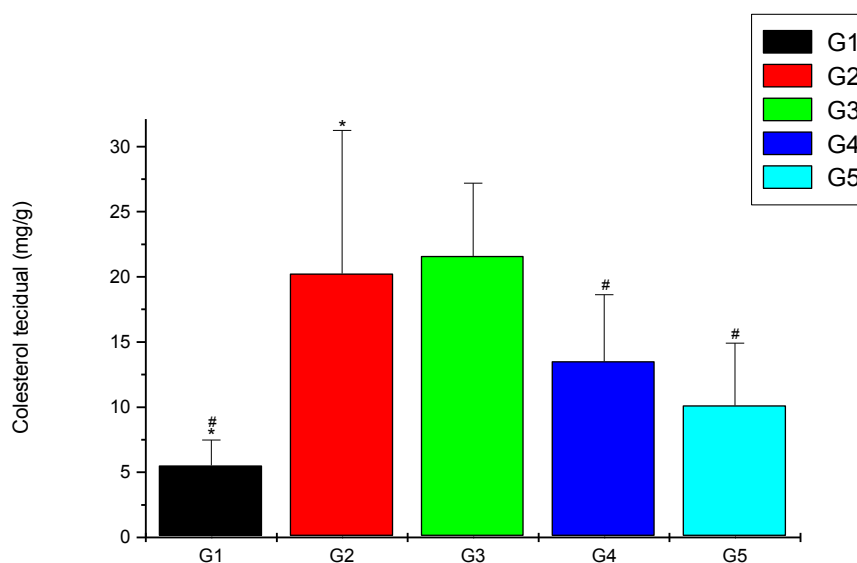


Gráfico 5– Colesterol tecidual (mg/g). Os valores são expressos em médias e desvios padrões com # $p \leq 0,05$ para G3 e * $p \leq 0,05$ para G4.

4.5 Peroxidação Lipídica Tecidual

O teor de MDA na parede da aorta foi encontrado significativamente menor no grupo G4 quando comparado ao grupo G2. Em relação aos demais grupos não houve diferença significativa entre si.

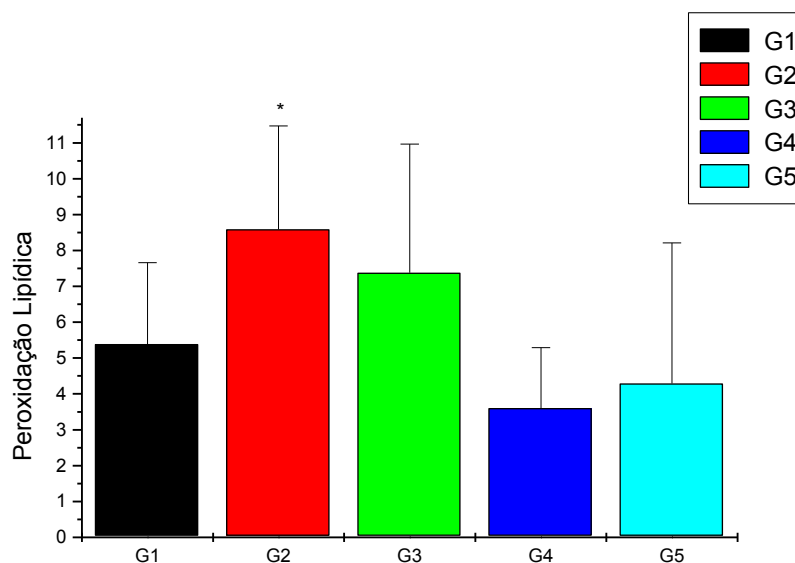


Gráfico 6- Peroxidação lipídica tecidual (mg/g de tecido x 10⁻⁷). Os valores estão expressos em médias e desvios padrões com *p≤0,05 para G4.

4.6 Função Endotelial

Os resultados em relação à função endotelial estão apresentados no gráfico 7. Observou-se que houve melhora significativa nos grupos G4 e G5 quando comparados aos grupos G2 e G3. Os grupos G4 e G5 apresentaram diferença significativa em relação ao grupo G1.

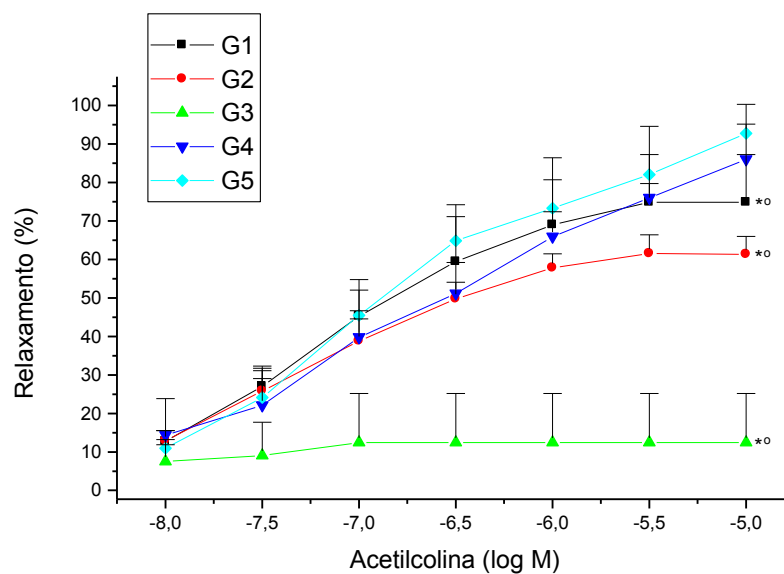


Gráfico 7– Função endotelial. Relaxamento expresso em porcentagem na contração induzida pela NE. Os pontos representam as médias e os desvios padrões com # $p \leq 0,05$ para G3, * $p \leq 0,05$ G4 e ° $p \leq 0,05$ para G5.

4.7 Pressão Arterial

No gráfico 8 estão expressos os valores da pressão arterial. Houve diferença significativa somente entre o grupo G3 em relação ao grupo G4.

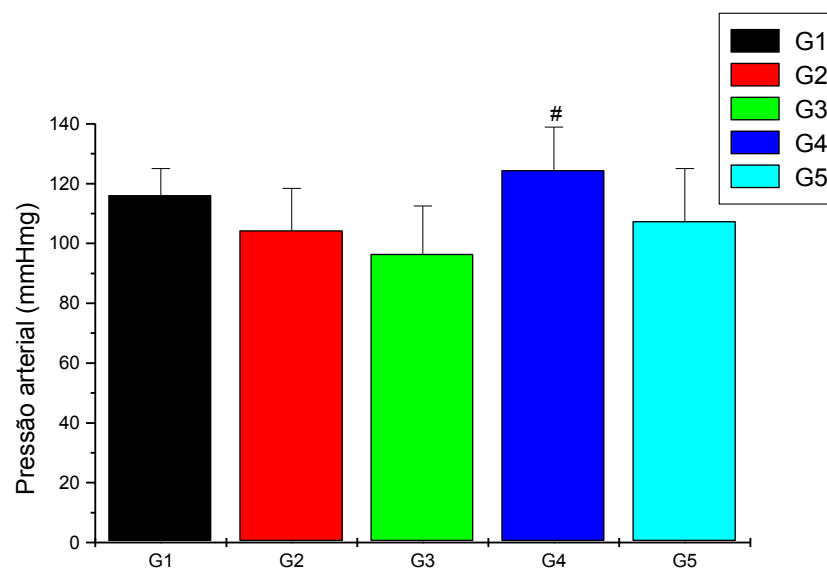


Gráfico 8– Pressão arterial (mmHg). OS valores são expressos em médias e desvios padrões com * $p \leq 0,05$ para G3.

Tabela 1- Lípides plasmáticos e suas frações.

	G1	G2	G3	G4	G5
CT	41,17 ±11,83*	47,90 ±4,42*	50,78 ±12,89*	27,29 ±8,05	41,55 ±6,94*
TG	38,26 ±12,53	58,35 ±5,29	29,18 ±10	37,85 ±32,56	37,92 ±29,47
HDL	11,03 ±4,03	23,41 ±0,86	9,70 ±7,65°	11,15 ±10,10°	23,21 ±3,01
LDL	22,17 ±10,33	12,82 ±5,24▪	35,17 ±10,29	12,15 ±7,80▪	14,37 ±3,30▪

- Os valores são expressos em médias e desvios padrões da glicose, colesterol total e suas frações. CT (colesterol total), TG (triglicérides), HDL (lipoproteína de alta densidade), LDL (lipoproteína de baixa densidade). Significância *p<0,05 em relação ao grupo G4, °p<0,05 em relação ao grupo G5 e ▪p<0,05 em relação ao grupo G3.

Tabela 2- Colesterol e peroxidação lipídica tecidual, função endotelial e pressão arterial.

	G1	G2	G3	G4	G5
Cte	5,53 ±1,94*	20,24 ±10,99	21,59 ±5,59	13,53 ±5,09*	10,14 ±4,78*
MDA	5,39 ±2,27	8,59 ±2,88	7,38 ±3,58	3,60 ±1,69°	4,29 ±3,92
Rmax	74,87 ±12,44▪▪	61,33 ±5,69▪▪	12,45 ±14,42▪▪	86,26 ±9,75	92 ±8,37
PA	116,13 ±8,95	104,4 ±14,04	96,50 ±16,03	124,5 ±14,43	107,5 ±17,52

Os valores são expressos em médias e desvios padrões do colesterol e peroxidação lipídica tecidual, função endotelial e pressão arterial. Cte (colesterol tecidual), MDA (peroxidação lipídica tecidual), Rmax (relaxamento máximo do endotélio), PA (pressão arterial). Significância *p<0,05 em relação ao grupo G3, °p<0,05 em relação ao grupo G2, ▪p<0,05 em relação ao grupo G4 e ▪▪p<0,05 em relação ao grupo G5.

5. *DISCUSSÃO*

Neste estudo foi utilizado pravastatina 7,5mg/kg/dia via gavagem. Anteriormente, essa mesma dose ^(78, 79) e dose semelhante ⁽⁸⁰⁾ já haviam sido utilizadas em ratos wistar machos. Em todos estes estudos os animais toleraram bem o fármaco, não se verificando efeitos colaterais. A escolha da dose no presente estudo se deu devido à praticidade na técnica de preparação do medicamento, já que cada comprimido continha 10mg de pravastatina. A dose administrada em ratos pode ser considerada alta quando comparada à dose administrada em humanos, portanto, provavelmente diferenças biológicas entre as espécies justificam a necessidade desta dose para se ter a mesma eficácia na redução do colesterol.

O modelo da oclusão coronariana para desenvolvimento do infarto do miocárdio é bastante eficaz devido à facilidade destes animais em produzir infarto transmural, isto em consequência à ausência de vasos colaterais e, em relação à resposta morfológica, funcional e à mortalidade, cujos resultados se assemelham àqueles encontrados em humanos. Outro ponto favorável é a variação do tamanho do infarto que é relativamente pequena entre os animais além de serem resistentes ao desenvolvimento da hipercolesterolemia⁸¹.

Os animais utilizados neste estudo pesavam entre 350 a 400g. Em ratos o peso corporal e a idade estão correlacionados, pois quanto mais idoso o animal, mais obesos se tornam e, conseqüentemente, podem apresentar disfunção endotelial. Neste estudo, por serem considerados ratos adultos jovens, foram capazes de apresentar mortalidade cirúrgica menor que em animais mais velhos, em torno de 40%. Dados semelhantes encontrados ao monitorar com eletrocardiograma um grupo de ratos infartados comprovaram que o grupo com maior número de óbitos apresentava uma frequência elevada de arritmias cardíacas, o que justifica a alta mortalidade ⁽⁸²⁾. Os animais selecionados para o presente estudo foram aqueles que tiveram infarto do miocárdio grande, ou seja, $\geq 40\%$ da área total do ventrículo esquerdo ⁽⁶⁹⁾.

De acordo com Yamazaki *et al.* (1993)⁽⁸³⁾, o que determina o tamanho do infarto são o tempo de duração da isquemia e o tamanho da região isquêmica. O mesmo relata que a ligadura da artéria coronária esquerda em ratos é um bom modelo para o estudo da lesão de reperfusão do miocárdio.

O infarto do miocárdio é caracterizado por alterações lipídicas que se manifestam dentro de 24 a 48 horas após o início da dor precordial. Em humanos se observa queda do colesterol total (24% a 70% do basal), do LDL – colesterol (31%), do HDL – colesterol (12 – 18%) e aumento das triglicérides (18%)⁽⁸⁴⁾. Essas alterações acontecem devido à associação do infarto do miocárdio com distúrbios metabólicos e hormonais durante a resposta de fase aguda, mas, provavelmente, também, devido à utilização do colesterol no processo de reparação celular por ser o componente principal de todas as membranas plasmáticas e intracelulares^(41, 44, 85).

Estudos diversos^(39, 41, 42, 43) relataram que os valores dos lípides obtidos nas primeiras 24 horas após o infarto do miocárdio refletem os valores pré-infarto. Após esse período ocorre declínio do colesterol plasmático, tendo diminuição máxima entre o quarto e quinto dia, retornando em seguida aos valores basais, num período que varia até quatro semanas⁽⁴⁴⁾. Este processo é secundário à resposta inflamatória decorrente da lesão tecidual. Durante a resposta de fase aguda ocorre vasoconstrição, infiltração de leucócitos e quimiotaxia, ativação de monócitos e macrófagos e liberação de citocinas. As citocinas, ao atuarem sobre o fígado, geram mudanças na concentração de várias proteínas plasmáticas que são conhecidas coletivamente como reagentes de fase aguda, incluindo as lipoproteínas e a PCR, ocasionando uma significativa diminuição na concentração da apoproteína A-I e apoproteína B, refletindo na diminuição máxima do colesterol plasmático⁽⁴⁰⁾.

Neste estudo, o valor do colesterol total no grupo G3 não apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo G1. Em relação ao grupo G2 não houve diferença significativa quando comparado com os grupos G1 e G3. O valor do colesterol total em ratos wistar normocolesterolêmicos encontrados na

literatura ^(78, 79, 86, 87,88) foram superiores ao obtido neste estudo. Em relação aos ratos infartados, o que se tem observado é que o valor do colesterol total tende a aumentar na vigência do infarto ^(86 88). Neste estudo o nível do colesterol total no grupo G3 não apresentou diferença significativa em relação ao grupo G1, concordante com os dados em humanos, justificado, talvez, pela utilização do colesterol para a reparação celular após o infarto do miocárdio, no entanto, diferente do que é observado em outros estudos em ratos ⁽⁴⁴⁾.

Em relação às triglicérides não houve diferença significativa entre os grupos G3 e G1, o mesmo ocorreu quando comparado com o grupo G2. Os valores encontrados na literatura sobre a dosagem de triglicérides em ratos foram superiores ao deste estudo ^(87 89). Em humanos, observa-se um aumento no nível das triglicérides na vigência do infarto do miocárdio. Isso se dá devido ao aumento na PCR que se liga seletivamente à LDL – colesterol e interfere em seu catabolismo, levando ao aumento nos níveis das triglicérides ⁽⁴⁰⁾. Antes, os triglicérides não eram considerados importantes fatores de risco para o desenvolvimento da doença aterosclerótica. Atualmente, é reconhecido que a hipertrigliceridemia prolongada induz disfunção endotelial e contribui para o infarto do miocárdio. O estudo realizado por Bartus *et al.* (2005) ⁽⁹⁰⁾ verificou que os ratos são resistentes ao desenvolvimento da aterosclerose em resposta à hipercolesterolemia prolongada, sendo a hipertrigliceridemia responsável pela disfunção endotelial nesta espécie. De acordo com este autor a hipercolesterolemia não prejudica a atividade do NO e da prostaglandina endotelial.

Em relação a LDL – colesterol os valores obtidos nos grupos G1 e G3 não apresentaram diferenças significativas quando comparados entre si. Já em relação ao G2 houve diferença significativa quando comparado com o G3. Resultados semelhantes ao grupo G1 foram encontrados por outros autores ^(87 91). É conhecido que durante o processo de isquemia e/ou reperfusão miocárdica, tal como o infarto do miocárdio, ocorre alteração no nível de LDL – colesterol. De acordo com a literatura ⁽⁹²⁾, em humanos ocorre diminuição que se inicia no

primeiro dia após o infarto do miocárdio atingindo o máximo no sétimo dia e retornando aos valores basais após trinta dias. Porém, de acordo com o estudo realizado por Chacra (2000) ⁽⁴⁴⁾ não ocorrem diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de LDL – colesterol entre as primeiras 48 horas e o sétimo dia pós – infarto. Esses valores se tornam menores quando comparados aos valores obtidos no quadragésimo quinto dia.

A concentração elevada de LDL – colesterol tem relação direta com o desenvolvimento de doença arterial coronariana ⁽⁸⁴⁾ e, para qualquer nível de concentração plasmática de lipoproteína, sua retenção na parede arterial é mais importante do que a taxa de transporte na mesma, uma vez que ao ficar aprisionada na íntima, a LDL sofrerá oxidação lipídica ⁽³²⁾. O nível desejado para LDL – colesterol é menor que 100mg/dl e, para indivíduos com alto risco para doença arterial coronariana, menor que 70mg/dl ⁽⁹³⁾. Está bem estabelecido que o nível de colesterol total seja o principal fator de risco para doença aterosclerótica e a LDL – colesterol e por ser o seu principal componente tornou-se, também, um importante fator de risco para eventos coronarianos ⁽⁹⁴⁾.

Há uma relação inversa entre LDL – colesterol e HDL – colesterol em relação ao infarto do miocárdio. A HDL – colesterol apresenta efeito cardioprotetor devido sua capacidade em inibir a oxidação da LDL – colesterol com consequente inibição da adesão de monócitos na parede vascular ⁽⁹⁴⁾. Segundo as diretrizes mais recentes, os valores inferiores a 40mg/dl são considerados indesejáveis e os valores superiores a 60mg/dl são considerados como protetores contra a doença cardiovascular aterosclerótica ⁽⁹⁵⁾. A alteração ocorrida no metabolismo da HDL - colesterol é devido à interação dessa lipoproteína com os agentes inflamatórios de fase aguda em resposta ao infarto do miocárdio e ocorre na presença do aumento de lipoproteínas aterogênicas, em especial a LDL – colesterol ⁽⁴⁴⁾.

A HDL - colesterol tem como função principal o transporte reverso de colesterol, porém outras ações foram atribuídas a ela permitindo reconhecê-la como antiaterogênica. Dentre estas funções estão as ações antioxidante, antiinflamatória, antiagregante plaquetário, anticoagulante, pró-fibrinolítico e de

proteção endotelial. A presença da enzima paraoxonase permite à HDL a capacidade de hidrolisar os peróxidos lipídicos, catalisando a ruptura dos fosfolípidos oxidados em LDL e eliminar os produtos da oxidação da LDL. As ações anticoagulantes e pro-fibrinolítica baseiam-se na inibição da ativação do fator X, plaquetária, da secreção de plasminogênio tecidual e do inibidor do plasminogênio ⁽⁹⁶⁾.

Neste estudo não houve diferença significativa entre os níveis de HDL – colesterol entre os grupos G1 e G3, o mesmo ocorrendo quando comparado com o grupo G2. Na literatura ^(89, 91), os valores de HDL – colesterol em ratos normocolesterolêmicos foram superiores aos do presente estudo. O HDL – colesterol, em humanos, apresenta diminuição na concentração plasmática no sétimo dia após o infarto do miocárdio retornando aos valores pré – infarto após quarenta e cinco dias ⁽⁴⁴⁾.

Em relação à função endotelial, o infarto experimental do miocárdio provocou redução significativa no relaxamento dependente do endotélio nos animais do grupo G3 em relação ao G1. Porém, ao compararmos o grupo G1 com o G2, não houve diferença significativa entre os mesmos, caracterizando o grupo sham como adequado para o controle do infarto experimental do miocárdio. Neste grupo a ocorrência do processo inflamatório devido ao trauma na parede torácica e no miocárdio em função da passagem da agulha e do fio não ter sido suficiente para determinar disfunção endotelial.

Os valores encontrados na literatura em relação à função endotelial de ratos são semelhantes aos encontrados neste estudo. Ozaki *et al.* (2009) ⁽⁹⁷⁾ verificaram o relaxamento dependente do endotélio em ratos com infarto experimental e em ratos controle e as médias foram $14,04 \pm 5,30$ e $78,24 \pm 3,95$, respectivamente. O comprometimento da função endotelial apresenta-se em torno de 29,9% e 14,04% na presença de infarto médio e grande, respectivamente.

A redução no relaxamento dependente do endotélio em resposta a ACH ocorre devido ao desequilíbrio existente entre as ações vasodilatadoras e

vasoconstritoras mediada pelo endotélio, com consequente diminuição na biodisponibilidade basal do NO pelas células endoteliais. O NO é um potente vasodilatador secretado continuamente e responsável pelo controle do tônus vasomotor em situações fisiológicas. Nas células musculares lisas isto reduz a concentração intracelular de cálcio e causa relaxamento vascular. Neste estudo, a verificação da integridade da musculatura lisa e a confirmação do déficit de relaxamento dependente do endotélio foram realizadas pelo uso do NPS que é um vasodilatador independente do endotélio muito utilizado para o estudo da função da musculatura lisa vascular ⁽⁷⁴⁾.

Segundo Furchgott e Zawadzki (1980) ⁽⁴⁹⁾ o endotélio é a sede do desencadeamento de várias doenças cardiovasculares. O processo de isquemia miocárdica aguda, tal como o infarto do miocárdio, provoca disfunção endotelial, permitindo o maior influxo e permanência da LDL – colesterol no espaço subendotelial, assim como pode ser causada por ela. A LDL nativa não é patogênica, torna-se agressiva somente quando modificada na presença dos radicais livres que se formam na parede do vaso consequente às reações metabólicas desencadeadas por fatores de risco como, por exemplo, hipercolesterolemia, hipertensão, diabetes, entre outros. O início da oxidação da LDL ocorre com sua exposição a metais de transição. Esse processo acontece na parede vascular e, tanto a célula endotelial como os monócitos/macrófagos são os responsáveis. O mecanismo fundamental para o processo de oxidação da LDL é o estresse oxidativo, onde os mecanismos de defesa vascular estão esgotados por excesso de produção de radicais livres formados a partir do oxigênio. Este, juntamente com a ativação das plaquetas está associado à transformação do ácido araquidônico em aldeídos como, por exemplo, o MDA que é um subproduto tóxico marcador do processo de oxidação. Nos vasos, devido ao rápido consumo de NO pelo radical superóxido a disfunção endotelial é um marcador sensível de estresse vascular ⁽⁹⁸⁾.

As modificações oxidativas da LDL – colesterol estão na dependência de substâncias existentes no tecido vascular e de células inflamatórias que assumem

papel de grande importância no processo aterogênico, já que um grande número de fatores de crescimento, hormônios locais e mediadores inflamatórios podem desencadear a produção de espécies reativas de oxigênio em células vasculares determinando a destruição do NO pelo radical superóxido e produzindo espécies reativas oxidantes secundárias como o peroxinitrito ⁽⁹⁸⁾.

Na avaliação da peroxidação lipídica no presente estudo as médias de malondialdeído encontradas nos grupos G1 e G3 não apresentaram diferenças significativas, o mesmo ocorrendo quando comparados com o grupo G2. Já em relação ao colesterol tecidual houve diferença significativa quando comparado o grupo G1 aos grupos G2 e G3. A diferença entre o colesterol tecidual no grupo G1 em relação ao G3 provavelmente ocorreu em função do processo isquêmico que resultou na modificação da LDL – colesterol na íntima arterial. Não houve relação entre a quantidade de colesterol presente nos anéis da aorta e a peroxidação lipídica nesta região, uma vez que em relação à dosagem do MDA não houve diferença significativa entre os grupos G1 e G3. Almeida *et al.* (2007) ⁽⁹⁹⁾ ao estudar coelhos hipercolesterolêmicos e verificar a relação entre os lípides plasmáticos e a peroxidação lipídica, relatou que não há relação direta entre o aumento do colesterol total e LDL – colesterol no plasma e a quantidade ou grau de peroxidação lipídica na parede arterial. Isso ocorreria devido à capacidade protetora da parede vascular para prevenir a peroxidação lipídica em resposta ao aumento no nível circulante de colesterol total e LDL – colesterol.

Os resultados encontrados na literatura da dosagem do MDA e colesterol tecidual em ratos wistar normocolesterolêmicos e sem fatores que pudessem interferir no resultado foram semelhantes ao obtido neste estudo ^(87 91). Em humanos, a avaliação da peroxidação lipídica em pacientes com infarto agudo do miocárdio, apresentou maiores valores de MDA nos indivíduos fumantes e com idade maior que 60 anos ⁽⁹⁸⁾.

O infarto do miocárdio interfere também na parte hemodinâmica do indivíduo provocando diminuição do volume de ejeção. Isso se dá por diminuição da perfusão, consequente a diminuição da pressão arterial, como por redução

significativa da contratilidade miocárdica. O aumento da frequência cardíaca é um dos primeiros mecanismos compensatórios utilizados pelo coração insuficiente para manter o débito cardíaco. Quando o volume sistólico está reduzido a taquicardia contribui para suprir as necessidades orgânicas por aumentar o fluxo sanguíneo, porém aumenta também, o consumo do oxigênio miocárdico. A resposta vasoconstritora se faz necessária para compensar a hemodinâmica comprometida em decorrência da disfunção ventricular ocasionada pelo infarto para manter fluxo periférico a todo organismo. Já a disfunção endotelial consequente ao infarto do miocárdio prejudica o fluxo sanguíneo periférico por provocar aumento na pressão arterial de 74,5% em vinte e cinco dias e 90,2% em quarenta dias ⁽¹⁰⁰⁾. Pereira *et al.* (1999) ⁽¹⁰¹⁾ demonstrou este evento em ratos ao administrar L-NAME.

No presente estudo os valores da pressão arterial média nos grupos G1 e G3 apresentaram diferenças não significativas. O resultado obtido no grupo G3 é concordante com o estudo realizado por Frimm *et al.* (2003) ⁽¹⁰⁰⁾ que, ao verificar a pressão arterial de ratos infartados também pela técnica da canulação da artéria carótida, comprovou que a pressão arterial sistólica e diastólica tendem a diminuir sem significância estatística, em ratos com infarto grande. Em relação aos ratos sham, o autor relata que a cirurgia não causa alteração em nenhuma variável hemodinâmica. O mesmo ocorreu neste estudo quando se comparou o grupo G1 ao grupo G2. Não houve diferença significativa entre os mesmos.

Campos de Souza (2002) ⁽¹⁰²⁾ verificou a pressão arterial de ratos wistar normocolesterolêmicos, sem infarto do miocárdio, através da canulação da artéria femoral em função da idade do animal: um mês, dois meses, quatro meses e seis meses e os valores da pressão arterial média obtido foram: 99.2 ± 1.21 , 102.3 ± 1.13 , 101.4 ± 0.90 , 103 ± 1.34 , respectivamente. Singi *et al.* (2005) ⁽¹⁰³⁾ verificou a pressão arterial em ratos anestesiados com pentobarbital sódio 30mg/kg e obteve média de 122.2 ± 2 , resultado semelhante ao grupo G1 do presente estudo, cuja pressão foi verificada também com o animal anestesiado, porém com outro tipo de anestésico.

Neste estudo, ao verificarmos a pressão arterial sistêmica comprovamos que os animais que não são hipertensos já que possuíam valores abaixo de 130 mmHg⁽¹⁰⁴⁾. Desta forma, as alterações hemodinâmicas ocorridas não podem ser responsabilizadas pela disfunção endotelial. Todos os animais foram submetidos às mesmas condições experimentais, e, assim, qualquer efeito sobre os resultados foi similar em todos os grupos estudados.

A pravastatina faz parte de uma classe de medicamentos com expressiva capacidade na diminuição na taxa de mortalidade e morbidade em indivíduos com infarto do miocárdio, além de ter atuação na prevenção primária e secundária da cardiopatia isquêmica, com mecanismo de ação que vai além do hipocolesterolemizante^(59 60).

Estudos clínicos^(64, 65) indicaram que indivíduos tratados com estatinas apresentam significativamente menores riscos de eventos cardiovasculares quando comparados com outros agentes redutores de colesterol, apesar da redução semelhante no colesterol plasmático. Isto sugere que as estatinas apresentam efeitos benéficos que vão além da redução dos níveis de colesterol. No presente estudo a taxa de mortalidade nos grupos que receberam pravastatina ficou em torno de 30%.

A concentração do colesterol plasmático nos animais do grupo G4 apresentou redução significativa quando comparados a todos os grupos, com a pravastatina reduzindo a concentração do colesterol plasmático abaixo dos valores obtidos no grupo G1. No grupo G5 não houve redução significativa mantendo seu valor semelhante ao encontrado no grupo G1.

Os medicamentos redutores de colesterol plasmático apresentam diferentes mecanismos de ação sobre o metabolismo dos lipídios. Os inibidores da HMG - CoA redutase diminuem as concentrações intracelulares do colesterol hepático através da inibição por competição com a HMG - CoA redutase, enzima que catalisa a biossíntese de colesterol. Ao inibir a conversão da HMG - CoA para mevalonato, conseqüentemente ocorre inibição da síntese de colesterol e

aumento dos receptores específicos para a captura da LDL – colesterol ⁽⁵⁸⁾. Desta forma, aumenta a remoção plasmática do colesterol e também da LDL - colesterol. A pravastatina é capaz de reduzir a concentração do colesterol no plasma em humanos até 30 a 40% e estas diminuições estão relacionadas à redução nos eventos coronarianos ⁽¹⁰⁵⁾.

A administração da pravastatina, no presente estudo, sete dias antes ao infarto do miocárdio (grupo G5), não demonstrou ser mais eficiente no que se refere à diminuição do colesterol plasmático quando comparado à administração iniciada na vigência do infarto e seguido por sete dias (grupo G4). Esperava-se que a administração da pravastatina iniciada antes ao infarto do miocárdio apresentasse redução maior em relação ao colesterol plasmático quando comparado aos animais que receberam pravastatina sete dias após. Tal resultado pode ser atribuído ao método utilizado para a administração do fármaco, em especial, quando administrado por um tempo maior. A relação dose/resposta para todas as estatinas é bastante previsível já que é dose-dependente, como demonstrou Jones *et al.* (1991) ⁽¹⁰⁶⁾, ao administrar pravastatina em indivíduos com hipercolesterolemia primária. De acordo com os autores a administração da pravastatina 40mg/dia é suficiente para reduzir o colesterol total, não somente em indivíduos hipercolesterolêmicos, mas, também em normocolesterolêmicos. No entanto, de acordo com os autores, a redução do colesterol total foi significativa em todas as doses administradas quando comparada ao grupo placebo.

Em relação aos triglicérides não houve diferença significativa entre os grupos G4 e G5 quando comparados ao grupo G3. De acordo com a literatura ⁽¹⁰⁶⁾ os inibidores da HMG-CoA redutase não são bons redutores de triglicérides.

Os animais do grupo G5 apresentaram aumento significativo da HDL – colesterol quando comparados aos animais dos grupos G3 e G4. Dentre as medidas para reduzir a incidência de morte por infarto do miocárdio destaca-se a administração das estatinas devido a sua capacidade em aumentar a HDL – colesterol, uma vez que esta lipoproteína é considerada antiaterogênica ⁽⁹⁶⁾. Diante do exposto, a administração da pravastatina no infarto do miocárdio pode ser

considerada benéfica quando se observa o aumento da HDL – colesterol. Suas ações refletem em melhora na função endotelial que, em indivíduos infartados, encontra-se comprometida. Embora, no presente estudo, no grupo G4 o aumento da HDL - colesterol não tenha sido significativo quando comparado ao grupo G3, o resultado foi semelhante ao grupo G1, demonstrando que o uso da pravastatina por sete dias foi suficiente para isto.

Durante a isquemia miocárdica ocorre aumento da LDL – colesterol como demonstrou Abhilash *et al.* (2010) ⁽⁸⁶⁾ em ratos normocolesterolêmicos com indução de isquemia miocárdica com isoproterenol. Porém, a administração da pravastatina nos grupos G4 e G5 resultaram em redução significativa da LDL – colesterol em ambos os grupos quando comparado com o grupo G3. A redução na concentração da LDL – colesterol promove benefícios no infarto do miocárdio já que o aumento dessa lipoproteína no plasma é considerado um importante fator de risco ⁽⁹⁸⁾. No infarto do miocárdio o aumento da LDL – colesterol aumenta a produção de ERONS pela célula endotelial com indução das moléculas de adesão, estímulo à proliferação e migração da célula muscular lisa vascular, aumento da peroxidação lipídica e da ativação das metaloproteinases e, alteração da atividade vasomotora do vaso devido a diminuição na biodisponibilidade do NO ⁽⁹⁹⁾. Embora, a LDL – colesterol esteja na circulação protegida pelos antioxidantes plasmáticos, acredita-se que uma pequena porção dessa lipoproteína seja modificada ainda na circulação e que a oxidação continue após sua entrada na íntima arterial, ambiente pro - oxidante, com ausência de antioxidantes plasmáticos ⁽⁹³⁾. O estresse oxidativo atua na modificação da LDL – colesterol comprometendo sua remoção da circulação e aumentando sua capacidade de agressão ao endotélio ⁽⁵⁴⁾. Para qualquer nível de concentração plasmática de lipoproteína, sua retenção na parede arterial é mais importante do que sua taxa de transporte ⁽³²⁾. No presente estudo, o uso da pravastatina durante sete e/ou catorze dias demonstrou ser eficaz na redução da LDL – colesterol contribuindo assim na fase recente do infarto do miocárdio. De acordo com a literatura, a redução da LDL – colesterol com o uso da pravastatina nas doses que variam entre 5mg/dia e 40mg/dia em indivíduos hipercolesterolêmicos apresenta redução

significativa dentro de duas semanas após o início do tratamento. A redução máxima ocorre na quarta semana e se mantém até a oitava ⁽¹⁰⁶⁾. Estudos ^(56, 58,59) apontam esta redução como resultado da ação da pravastatina no aumento no número de receptores de LDL na superfície da célula do hepatócito, com consequente aumento do catabolismo mediado por receptores e remoção da LDL circulante. Law MR *et al.*(2003)⁽¹⁰⁷⁾ relataram que rosuvastatina 5mg/dia, atorvastatina 10/mg dia e lovastatina ou sinvastatina 40mg/dia reduz a concentração do LDL – colesterol aproximadamente 35%. Já a fluvastatina e a pravastatina produzem menores reduções mesmo nas maiores doses testadas (80mg dia). Porém, independente do tipo de estatina e da dose administrada ocorre redução na concentração da LDL – colesterol e, de acordo com o estudo, LDL – colesterol de 1.6mmol/l durante dois anos reduz a metade o risco de doenças isquêmicas do coração, podendo esta redução ser encontrada mesmo com baixas doses de estatina.

O infarto do miocárdio desencadeia imediatamente estresse oxidativo como parte da resposta vascular à lesão, o que leva à inativação do NO. A atividade da NADPH oxidase vascular é um dos principais mecanismos produtores de superóxido e na resposta de reparação ocasiona rápido consumo do NO pelo radical superóxido. Sendo assim, a disfunção endotelial é considerada um marcador sensível de estresse oxidativo vascular. Um grande número de fatores de crescimento, hormônios locais e mediadores inflamatórios podem desencadear a produção de espécies reativas de oxigênio em células vasculares, determinando a destruição do NO pelo radical superóxido e produzindo espécies reativas oxidantes secundárias como o peroxinitrito, um potente oxidante capaz de oxidar moléculas de LDL ⁽⁵³⁾.

O nível de oxidação das partículas de LDL – colesterol na íntima arterial é avaliado pela medida do MDA, um dos produtos finais da peroxidação lipídica e que no vaso reflete o grau de oxidação vascular. Neste estudo não houve redução significativa na oxidação da LDL - colesterol nos animais dos grupos G4 e G5 quando comparados ao grupo G3, embora os valores absolutos tenham sido

inferiores aos encontrados no grupo G1. Admite-se que as estatinas atuem como antioxidante sobre as lipoproteínas ⁽¹⁰⁸⁾. A reversão dos efeitos inibitórios da LDL oxidada por ação das estatinas sobre a NOS tem apresentado benefícios sobre a disfunção endotelial podendo seus efeitos antioxidantes ser considerados importantes na prevenção da função endotelial ⁽¹⁰⁹⁾. As estatinas inibem a captação da LDL oxidada por seu receptor e, também, tem mostrado diminuir a atividade do macrófago CD36, um receptor reconhecido da LDL oxidada ⁽¹⁰⁸⁾. Laufs *et al.* (1998) ⁽¹¹⁰⁾ demonstrou in vitro que a LDL oxidada quando associada ao tratamento com sinvastatina dentro de vinte e quatro horas atenua os efeitos da LDL oxidada sobre a NOS e, entre setenta e duas e noventa e seis horas, não somente reverte os efeitos inibitórios da NOS sobre a LDL oxidada como também o nível da NOS. Desta forma, o uso da pravastatina no infarto do miocárdio, como mostrou esse estudo parece ser benéfica, pois ao reduzir a LDL oxidada na intima, conseqüentemente melhora a disfunção endotelial, presente em indivíduos infartados.

Em relação à concentração do colesterol no tecido houve redução significativa nos grupos G4 e G5 quando comparados ao grupo G3. Também o grupo G4 apresentou redução significativa quando comparado ao grupo G1. A ação da pravastatina sobre o colesterol tecidual mostrou ser independente da redução do colesterol no plasma, pois, a redução significativa do colesterol plasmático ocorreu apenas no grupo G4, quando comparado aos grupos G1 e G3. Já a redução na concentração do colesterol tecidual ocorreu em ambos os grupos, G4 e G5 de forma significativa quando comparados ao grupo G3. Não há relação direta entre o aumento do colesterol e LDL - colesterol no plasma e, o colesterol contido ou o grau de peroxidação lipídica na parede arterial como demonstrou Almeida *et al.* (2007) ⁽⁹⁹⁾, porém, a disfunção endotelial é proporcional à peroxidação lipídica na parede arterial.

Como é de conhecimento, a pravastatina é hidrossolúvel e circula ligada à proteína em 50%, o que lhe confere uma maior afinidade para os tecidos periféricos com maior facilidade para a penetração no tecido vascular,

diferentemente das demais estatinas que são lipossolúveis e, portanto encontram-se ligadas a proteínas em 95%, o que dificulta sua passagem ao tecido ⁽¹¹¹⁾. De acordo com a literatura ⁽¹¹²⁾, a redução na concentração do colesterol tecidual de forma independente do plasmático é sugerida devido à maior facilidade de penetração da pravastatina no tecido vascular e à reversão dos efeitos inibitórios da LDL oxidada sobre a eNOS. Essas ações resultam na melhora da função endotelial.

No infarto do miocárdio ocorre o comprometimento da função endotelial como demonstrou Ozaki e Almeida (2009) ⁽⁹⁷⁾. A administração da pravastatina nos grupos G4 e G5 melhoraram significativamente a disfunção endotelial, quando comparados aos grupos G3 e G1. Não houve diferença significativa quando comparados entre si.

A ação da pravastatina na função endotelial em ratos normocolesterolêmicos foi também estudada por Coelho – Filho *et al.* (2001) ⁽⁸⁰⁾ porém, em um modelo diferente de lesão no miocárdio, através da inibição aguda da biossíntese de NO com L – nitro arginina metil éster (L-NAME). A pravastatina foi administrada na dose de 6mg/kg/dia durante catorze dias, e a L- NAME a partir do décimo quarto até o décimo oitavo dia quando os animais foram sacrificados. No final do experimento concluiu-se que a pravastatina previne a lesão miocárdica com consequente melhora na função endotelial, mesmo quando administrada junto à L-NAME. Os autores atribuem esses resultados à ação da pravastatina na manutenção do fluxo sanguíneo por diminuir a vasoconstrição desencadeada pela disfunção endotelial através do aumento na expressão da eNOS.

No presente estudo optamos pela oclusão coronariana para estudar o modelo do infarto do miocárdio. Essa técnica é a mais utilizada para esse tipo de estudo devido a sua similaridade com as alterações que ocorrem após o infarto em humanos e obteve-se o mesmo resultado.

Outro estudo, realizado por Egashira *et al.* (2000) ⁽¹¹³⁾ em ratos normocolesterolêmicos verificou a ação da pravastatina com a inibição crônica da

síntese da eNOS através da administração da L – NAME. A L – NAME foi administrada durante três dias, mas dois dias antes foi administrado pravastatina nas doses 50, 100 e 250 mg/Kg/dia. Não houve diferença significativa em relação ao colesterol plasmático entre os grupos tratados e o grupo controle L – NAME. De acordo com o autor, após três dias da administração da L- NAME ocorre inflamação vascular com adesão e infiltração de monócitos para dentro do vaso e indução da proteína quimio – atratora de monócitos – 1 (MPC – 1). Porém, quando administrado pravastatina 100mg/Kg/dia junto a L – NAME houve redução significativa no processo inflamatório, com redução na adesão quanto à infiltração dos monócitos. Esses efeitos foram atribuídos à pravastatina, provavelmente por sua capacidade em reduzir a expressão do gene da proteína quimio – atratora de monócitos – 1 (MPC – 1) e, também, a proliferação celular nuclear (PCNA). O autor também relata que a pravastatina pode ter efeitos antiinflamatórios através da redução do estresse oxidativo, do fator nuclear kappa B (NF – κ B) e regulação da atividade da NOS resultando em aumento na produção do NO. O estudo realizado por Kaesemeyer *et al.* (1999) ⁽¹¹⁴⁾, comprovou que a pravastatina estimula a produção do NO e o relaxamento em cultura de células endoteliais aórticas bovinas independente da sua ação sobre o colesterol plasmático e a LDL – colesterol, uma vez que, as células endoteliais foram mantidas em cultura, o que exclui a influência da pravastatina sobre o metabolismo dos lipídios. A liberação do NO aconteceu de forma rápida, semelhante ao observado por ação da ACH, e a ausência da LDL – colesterol no meio de cultura não interferiu sobre sua ação, comprovando assim seus efeitos pleiotrópicos. Resultados semelhantes foram encontrados, também, por Laufs *et al.* (1998)⁽¹¹⁰⁾ utilizando sinvastatina e lovastatina. Em humanos, o uso das estatinas também tem apresentado melhora na função endotelial. A administração da atorvastatina em homens jovens, saudáveis e normocolesterolêmicos resultou em melhora na função endotelial observada dentro de 24 horas antes mesmo das alterações no colesterol plasmático e PCR ⁽¹⁰⁸⁾.

No laboratório de Estudos em Endotélio, Lipídes e Aterosclerose – FCM – UNICAMP realizaram – se estudos que verificaram a ação das estatinas sobre a

função endotelial, porém, sempre na presença de fatores que poderiam ocasionar disfunção endotelial, como hipercolesterolemia e envelhecimento. Em 1994, Ribeiro Jorge *et al.* ⁽¹¹⁴⁾ verificaram a ação da sinvastatina e da pravastatina sobre a função endotelial de coelhos hipercolesterolêmicos. A pravastatina, com quinze dias de administração, foi capaz de reverter a função endotelial parcialmente, mesmo na presença de níveis razoavelmente elevados de colesterol plasmático. Em 2005, Ribeiro Jorge *et al.* ⁽¹¹¹⁾ concluíram, após estudo comparando a ação de diferentes estatinas (atorvastatina, fluvastatina, pravastatina, sinvastatina) sobre a função endotelial e peroxidação lipídica em coelhos hipercolesterolêmicos, que todas apresentaram efeitos semelhantes em reduzir a peroxidação lipídica e colesterol tecidual. Em relação à função endotelial, o relaxamento dependente do endotélio, foi mais significativo quando administrado pravastatina. De acordo como os autores, a redução na disfunção endotelial deve estar relacionada à redução do colesterol tecidual e do estresse oxidativo da parede arterial. Outro estudo, realizado no laboratório por Ribeiro Jorge PA *et al.*; 1996 ⁽¹¹⁵⁾, verificaram que coelhos alimentados com dieta enriquecida com colesterol, por oito semanas, administrando pravastatina e sinvastatina nos últimos dois, quatro e seis dias do experimento, concluíram que a pravastatina melhorou a função endotelial a partir do quarto dia acompanhada de redução do colesterol na parede do vaso e redução do malondialdeído, sem redução significativa sobre o colesterol plasmático. A melhora na função endotelial tem sido relacionada à redução na peroxidação lipídica dos ácidos graxos da LDL e da própria membrana celular. Em 2008, Almeida *et al.* ⁽⁷⁹⁾ verificaram a ação da pravastatina em ratos idosos (dois anos de idade). Sabendo que o envelhecimento desencadeia disfunção endotelial e hipercolesterolemia, o uso da pravastatina 7,5mg/kg/peso durante oito meses, resultou na melhora da disfunção endotelial e da hipercolesterolemia quando comparado aos ratos com dois anos de idade sem receber pravastatina.

Dentre os efeitos pleiotrópicos atribuídos às estatinas está a melhora na disfunção endotelial. Apesar, de ser atribuída primeiramente à inibição hepática da HMG – CoA redutase e subsequente diminuição no colesterol plasmático, a discussão sobre os efeitos das estatinas no que diz respeito à função endotelial

tem prevalecido. Há questionamentos se os mecanismos de ação das estatinas dependem totalmente, parcialmente ou se são independentes da sua ação sobre a colesterolemia. No que se refere à pravastatina, estudos relatam que seus efeitos independem da sua ação sobre o colesterol plasmático e, estes se relacionam com a regulação na biodisponibilidade da eNOS^(116,117). O NO previne a oxidação da LDL – colesterol e inibe a adesão de monócitos na superfície da célula, a agregação plaquetária, a proliferação das células musculares lisas e a vasoconstrição endotelial¹¹⁰. De acordo com a literatura, o aumento na disponibilidade do NO acontece devido à redução nos níveis de caveolina – 1, um potente inibidor da eNOS¹⁰⁸. Outros mecanismos estão envolvidos, como a estabilização do RNA mensageiro da eNOS, redução das ERONS que inativam o NO e, inibição da síntese de importantes isoprenóides intermediários, as proteínas Rho, Ras e Rac que participam da sinalização de moléculas intracelulares, através da inibição do ácido mevalônico⁽¹¹²⁾. Além disso, as estatinas possuem efeitos antiinflamatórios através da diminuição da PCR, E – selectina, P – selectina, ICAM, VCAM, IL – 1, IL – 6, TNF e inibição da ativação do NF – κ B; efeitos antitrombóticos através da síntese do ativador do plasminogênio tecidual (t – PA) e redução da síntese do inibidor do ativador do plasminogênio – 1 (PAI – 1) As estatinas também inibem a expressão dos receptores AT1 da ang II contribuindo para menor proliferação celular, para redução do estresse oxidativo e da transcrição da endotelina com benefícios na disfunção endotelial^(108,112,116).

No presente estudo, a melhora na disfunção endotelial ocorreu acompanhada da redução na concentração do colesterol tecidual tanto no grupo G4 quanto no G5, consequentemente redução na oxidação da LDL – colesterol, porém, de forma independente da redução na concentração do colesterol no plasma, uma vez que no grupo G5 não houve redução significativa quando comparado ao grupo G3, sugerindo assim, que o efeito da pravastatina provavelmente ocorreu de forma independente da redução nos lipídeos plasmáticos. Isto deve justificar o uso das estatinas no infarto agudo do miocárdio independentemente dos níveis lipídicos plasmáticos.

6. CONCLUSÃO

A pravastatina, quando administrada em ratos normocolesterolêmicos com infarto do miocárdio, diminuiu colesterol total, LDL – colesterol e colesterol tecidual, peroxidação lipídica e, aumentou a HDL – colesterol. Quanto à função endotelial, quando administrada antes, durante e/ou após o infarto resultou em melhora significativa da disfunção endotelial cujos valores foram maiores do que os obtidos no grupo controle. Desta forma, independente dos valores dos lípides plasmáticos, a administração da pravastatina no infarto do miocárdio resulta em efeitos benéficos. Isso se dá devido aos seus mecanismos de ação sobre o colesterol tecidual e a peroxidação lipídica refletindo, na melhora da disfunção endotelial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Afiune Neto A, Mansur AP, Avakian SD, Gomes EPSG, Ramires JAF. Monocytosis is an independent risk marker for coronary artery disease. *Arq Bras Cardiol.* 2006; (86): 3.
2. Oliveira EM, Spiandorelli FSA. Síndromes coronarianas agudas: Protocolo de avaliação e manejo inicial de paciente com dor torácica. *Revista Científica AMECS.* 2001; 10 (1): 59-63.
3. Silva MAD, Souza GMR, Schargodsky H. Fatores de risco para infarto do miocárdio no Brasil (Estudo FRICAS). *Arq Bras Cardiol.* 1998; 71(5): 667-675.
4. Sarmiento - Leite R, Krepsky AM, Gottschall CAM. Infarto agudo do miocárdio. Um século de história. *Arq Bras Cardiol.* 2001; 77 (6): 593-601.
5. Avezum A, Guimarães HP, Berwanger O, Piegas L. Aspectos epidemiológicos do infarto do miocárdio no Brasil. *Rev Bras Med.* 2005; p. 93 – 96.
6. Pereira JL, Sakae TM, Machado MC, Castro CM. Escore TIMI no infarto agudo do miocárdio conforme os níveis de estratificação e prognóstico. *Arq Bras Cardiol.* 2009; 93 (2): 105-112.
7. III Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio. *Arq Bras Cardiol.* 2004; 83.
8. Kannel WB, Dawber TR, Friedman GD, Glennon WE, Namara PM. Risk Factors in Coronary Heart Disease. An evolution of several serum lipidis as predictors of coronary heart disease. The Framingham Study. *Annals of Internal Medicine – Medical.* 1964; 61: 888 – 999.
9. English JP, Willius FA, Berkson J. Tobacco and coronary disease. *JAMA* 1940; 115: 1327-9.
10. Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC, Campana AO. Comportamento de variáveis cardíacas em animais expostos a fumaça de cigarro. *Arq Bras Cardiol.* 2003; 81(3): 221-4.
11. Yusuf S, Hawken S, Ounpu S et al. INTERHEART study investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; 364: 973-952.
12. Piegas LS, Avezum A, Pereira JC, et al. AFIRMAR Study Investigators. Risk factors for myocardial infarction in Brazil. *American Heart Journal.* 2003; 146: 331-8.

13. Polanczyk CA. Fatores de risco cardiovascular no Brasil: os próximos 50 anos. *Arq Bras Cardiol.* 2005; ISSN 0066 – 782X.
14. Avezum A, Piegas LS, Pereira JCR. Fatores associados com infarto agudo do miocárdio na região metropolitana de São Paulo. Uma região desenvolvida em um país em desenvolvimento. *Arq Bras Cardiol.* 2005; 84 (3).
15. Ribeiro Jorge PA, Ozaki MR, Almeida EA. Endothelial dysfunction in coronary vessels and thoracic aorta of rats exposed to cigarette smoke. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 1995; 22: 410-413.
16. Seligman BGS, Clausell N. Disfunção endotelial no diabetes melito. *Ver Bras Hipertens.* 1999; 6 (3): 288-95.
17. Lerário AC. Epidemiologia da doença cardiovascular no diabetes e síndrome metabólica. *Manual de prevenção da doença cardiovascular no diabetes tipo 2.* 2009; p. 8.
18. Habib SS, Aslam M, Shah SFF, Naveed AK. Lipoproteína (a) esta associada com níveis basais de insulina em pacientes com diabetes melito tipo 2. *Arq Bras Cardiol.* 2009; 93 (1): 28-33.
19. Ribeiro C, Oliveira CAM, Mello MAR. Exercício e prevenção do diabetes melito: importância do modelo experimental utilizando ratos. *Motriz – UNESP – Rio Claro.* 2007; 13 (1) - p: 72-77.
20. Carvalho MHC, Colaço ALC, Fortes ZB. Citocinas, disfunção endotelial e resistência a insulina. *Arq Bras Endocrinologia & Metabologia.* 2006; 50 (2): 304 - 312.
21. Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Monson RR, Speizer FE, Hennekens CH. A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women. *New England Journal of Medicine.* 1990; 332 (13): 882-9.
22. Harris TB, Ballard Barbasch R, Madans J, MAkuc DM, Feldman JJ. Overweight, weight loss, and risk of coronary heart disease in older women: the Nhanes epidemiologic follow-up study. *American Journal Epidemiologic.* 1993; 137: 1318-27.
23. Ramos L, Labat R, Carvalho FAS, Martin AB, Lopes-Martins RAB. Efeito da administração oral de arginina sobre a pressão arterial e parâmetros cardíacos em ratos submetidos ao bloqueio crônico da síntese de óxido nítrico. *Rev Bras Med Esporte.* 2006; 12 (4): 169 - 174.

24. Marte AP, Santos RD. Bases fisiopatológicas da dislipidemia e hipertensão arterial. Rev Bras Hipertens. 2007; 14 (4): 252-257.
25. Favarato D, Luz PL. Hipertensão e Aterosclerose. Rev Soc Bras Hipertens. 2003; 6 (4): 131-134.
26. Almeida GPL, Lopes HF. Impacto da hipertensão arterial sistêmica sobre o risco cardiovascular. Rev Soc Bras Cardiol. 2003; 6 (4): 135-137.
27. Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of Genetic (Spontaneous) Hypertension. Man and Rat. Circulation Research. 1981; 48 (3): 309 – 319.
28. Consolim-Colombo FM, Krieger EM. Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial. Rev Soc Bras Hipertens. 2000; 3(3): 86 - 89.
29. Luna RL, Luna LC O surpreendente predomínio da pressão sistólica isolada na medicina atual. Rev Bras Hipertens. 2008; 15 (2): 94-99.
30. Saraiva RS, Barbosa ECD, Guimarães JI. A importância do bloqueio do sistema renina-angiotensina na doença arterial crônica. Rev Soc Cardiol do Rio Grande do Sul. 2008. Ano XVI, nº13.
31. Sampaio WO, Pinheiro SV, Santos RAS. Aspectos fisiológicos e fisiopatológicos do sistema renina-angiotensina: ênfase na função vascular. Rev Soc Bras Hipertens. 2009; 12 (2): 44-50.
32. Batlouni M. Hipótese oxidativa da aterosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronária. Arq Bras Cardiol. 1997; 68 (1): 55 - 63.
33. Evora PB *et al.*; Métodos experimentais no estudo da função endotelial. Arq Bras Cardiol. 1996; 66 (5): 291 - 297.
34. Zornoff AM, Paiva SAR, Minucucci MF, Spadaro J. Infarto do Miocárdio Experimental em ratos: Análise do modelo. Arq Bras Cardiol. 2009; 93(4): 434-440.
35. Zornoff LAM, Spadaro J. Remodelação ventricular após infarto agudo do miocárdio. Conceitos, fisiopatologia e abordagem terapêutica. Arq Bras Cardiol. 1997; 68 (6): 453 - 459.
36. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental Infarction in the Rat. American Journal of Pathology. 1978; 90 (1): 57 – 63.

37. Silva FL, Mazzotti NG, Picoral M, Nascimento DM, Klein AB. Infarto do miocárdio experimental e aumento do estresse oxidativo em diafragma de ratos. *Brazilian Journal of Pulmology*. 2005; 31 (6).
38. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steimberg BS, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial of long – term therapy with captopril. *Circulation*. 1985; 72: 406 – 12.
39. Wood CM, Bosanquet RC. Changes in serum lipid concentrations during first 24 hours after myocardial infarction. *British Medical Journal*. 1987; 294: 1588 - 1559.
40. Wattanasuwan N *et al*. Effect of acute myocardial infarction on cholesterol ratios. *American College of Chest Physicians*. 2001; 120 (4): 1196 - 1199.
41. Carlsson R, Lindberg G, Westin L, Israelsson BO. Serum lipids four weeks after acute myocardial infarction are a valid basis for lipid lowering intervention in patients receiving thrombolysis. *British Heart Journal*. 1995; 74: 18-20.
42. Watson EC, Buchanan KD, Dickson C. Serum cholesterol levels after myocardial infarction. *British Medical Journal*. 1963; p. 709-712.
43. Ryder REJ, Hayes TM, Mulligan IP, Kingswood JC, Williams S, Owens DR. How soon after myocardial infarction should plasma lipid values be assessed? *British Medical Journal*. 1984; 289: 1651 - 1653.
44. Chacra APM. Avaliação do metabolismo de quilomícrons e das concentrações plasmáticas das lipoproteínas em pacientes com infarto agudo do miocárdio. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo – 2001.
45. Caramori PRA, Zago AJ. Disfunção endotelial e doença arterial coronariana. *Arq Bras de Cardiol*. 2000; 75 (2): 163 - 171.
46. Casella Filho A, Araújo RG, Galvão TG, Chagas ACP. Inflamação e Aterosclerose: Integração de Novas teorias e valorização dos novos marcadores. *Rev Bras Cardiol*. 2003; 11 (3): 14-19.
47. Portal VL. Aterosclerose – Uma doença complexa. *Rev da Soc de Cardiol do Rio Grande do Sul*. 2004; XIII - 3.
48. Francischetti EA, Fagundes VGA, França MF. Endotélio vascular. Um importante sistema cibernético vaso-modulador e modulador cuja função participa do processo hipertensivo. *Arq Bras Cardiol*. 1995; 64 (1): 53 - 68.

49. Furchgott RF, Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288: 373-6.
50. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *J Biochem Pharmacol*. 1989; 38: 1709-15.
51. Palmer RMJ, Ferrig AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327:524-6.
52. Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity nitric oxide radical. In: Vanhoutte PM. Ed – *Vasodilation: Vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium*. New York, Raven Press. 1988; 427-36.
53. Bahia L, Aguiar LGK, Villela NR, Bottini D, Bouskela E. Endotélio e aterosclerose. *Rev SOCERJ*. 2004; 17 (1): 26-32.
54. Azevedo LCP, Almeida PM, Laurindo FRM. Participação do endotélio nas doenças cardiovasculares. *Rev Soc Cardiol do Estado de São Paulo*. 2000; 10 (6): 769 - 776.
55. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl Med*. 1986; 315:1046-51.
56. McCarey DW, Sattar N, McInnes B. Do the pleiotropic effects of statins in the vasculature predict a role in inflammatory diseases? *Arthritis Research & Therapy*. 2005; 7(2): 55 – 61.
57. Giannini SD *et al*. Aspectos Terapêuticos das Dislipidemias, Tratamento Farmacológico, Estatinas: Semelhanças e Diferenças. *Soc Bras Cardiol do Estado de São Paulo*. 1999.
58. Magalhães MEC. Mecanismos de rabdomiólise com as estatinas. *Arq Bras Cardiol*. 2005; 85: 42 - 43.
59. Fonseca FAH. Farmacocinética das estatinas. *Arq Bras Cardiol*. 2005; 55 (5).
60. Wannmacher L, Costa AF. Estatinas: uso racional na cardiopatia isquêmica. *ISSN 1810-0791*. 2004; 1(7): 1-6.

61. Miname MH, Santos RD, Frota N, Diamant J. O uso das estatinas é benéfico para pacientes com insuficiência cardíaca? Arq Bras Cardiol. 2007; 88 (5).
62. Davignon J, Leiter LA. Ongoing clinical trials of the pleiotropic effects of statins. Vascular Health and Risk Management. 2005; 1 (1): 29-40.
63. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomized trial of cholesterol lowering in 4,444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). Lancet. 1994; 344: 1383-9
64. West of Scotland Coronary Prevention Study Group (WOSCOP). Journal of the American College of Cardiology. 1995; 76: 485-491.
65. Cholesterol Reduction Rapidly Improves Endothelial Function After Acute Coronary Syndromes. The RECIFE (Reduction of Cholesterol in Ischemia and Function of the Endothelium) Trial. 1999; 99: 3227-3233
66. Prove IT – TIMI 22: Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy – Thrombolysis in Myocardial Infarction 22. American College of Cardiology (ACC) Annual Scientific Session 2004.
67. BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, v.126, n.66, p.6009, 8 abr. 1998. Seção 1, pt1.
68. Johns TNP, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animal. Annals of surgery. 1954; 140 (5): 675-682.
69. Minicucci MF *et al.* Comparação de diferentes métodos para medida do tamanho do infarto experimental crônico em ratos. Arq Bras Cardiol. 2007; 89 (2): 93 - 98.
70. Zornoff LAM, Matsubara BB, Matsubara LS, Paiva SAR, Tornero MTT, Spadaro J. Efeito do lisinopril na isquemia experimental em ratos. Influência do tamanho do infarto. Arq Bras Cardiol. 1999; 73 (4): 359-365.
71. Friedwald WT, Fredrickson DS. Estimation of the low density lipoprotein in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972; 18: 499 – 502.
72. Naito HK, David JA. Laboratory considerations: determination of cholesterol, triglycerides, phospholipids and others lipids in blood and tissues. In:

Laboratory and Research Methods in Biology and Medicine: Lipid Research Methodology. Alan R, Liss, INC. New York: 1981: 1-76.

73. Bueg JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods of Enzymology*. 1978; 52: 302 – 310.
74. Evora PRB, Pearson PJ, Seccombe JF, Discigil B, Schaff HV. Métodos experimentais no estudo da função endotelial. *Arq Bras Cardiol*. 1996; 66 (5): 291-297.
75. Quintas MARA. Avaliação de estocagem de dois tipos de soluções parenterais de grande volume em hospitais. Tese de Mestrado. Unicamp – 2004.
76. Conover WJ. *Practical Nonparametric Statistics*. John Wiley & Sons Inc. Nova Iorque. 1971.
77. Montgomery, DC. *Design and Analysis of Experiments*. 3ª. Edição. John Wiley & Sons. New York. 1991.
78. Ozaki MR, Almeida ER, Coelho O. A pravastatina e a disfunção endotelial em ratos com infarto do miocárdio. XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. (Fesbe); 2001.
79. Almeida EA, Ozaki MR, Taraborelli S. Avaliação da função endotelial, colesterol plasmático e glicemia em ratos tratados com pravastatina. XXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. (Fesbe); 2008.
80. Coelho – Filho OR *et al*. Pravastatin reduces myocardial lesions induced by acute inhibition of nitric oxide biosynthesis in normocholesterolemic rats. *International Journal of Cardiology*. 2001; (79): 215 – 221.
81. Morita M, Seinosuke K, Masahiro U, Akira K, Tadaaki I. Effects of late reperfusion on infarct expansion and infarct healing in conscious rats. *American Journal of Pathology*. 1993; 143 (2): 419-430.
82. Ozaki MR. Estudo do relaxamento dependente do endotélio em ratos submetidos a infarto experimental e tratados com inibidores da enzima conversora de angiotensina e bloqueadores específicos dos receptores AT1. Tese de Mestrado. Unicamp – 2001.
83. Yamazaki T, *et al*. Expression of intercellular adhesion molecule – 1 in rat heart with ischemia/reperfusion and limitation of infarct size by treatment with antibodies against cell adhesion molecules. *American Journal of Pathology*. 1993; 143 (2): 410-418.

84. Rosa Duarte E, Pellanda LC, Portal VL. Perfil inflamatório, metabólico e lipídico na síndrome isquêmica aguda: relação com eventos intra e pós – hospitalares. *Arq Bras Cardiol.* 2005; 84 (2): 122-129.
85. Anbinder AL, Quirino RS, Rocha RF. As estatinas e o tecido ósseo: da literatura. *Revista de Odontologia da UNESP.* 2006; 35 (4): 239 – 246.
86. Abhilash PA *et al.* Cardioprotective effects of aqueous extract of *Oxalis corniculata* in experimental myocardial infarction. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 2010. XXX – XXX.
87. Sena CM, Nunes E, Louro T, Proença T, Seíça RM. Disfunção endotelial na diabetes tipo 2: efeito antioxidante. *Rev Port Cardiol.* 2007; 26 (6): 609 – 619.
88. Almeida EA, Ozaki MR. Colesterol plasmático e infarto experimental do miocárdio em ratos. XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. (Fesbe); 2002.
89. Dantas JA, Ambiel CR, Cuman KN, Baroni S, Bersani – Amado CA. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de rato no biotério central da Universidade de Maringá, no Estado do Paraná. *Acta Sci Health Sci.* 2006; 28 (2): 165 – 170.
90. Bartus M, *et al.* Hypertriglyceridemia but not hypercholesterolemia induces endothelial dysfunction in the rat. *Pharmacological Reports.* 2005; 57, suppl. 127 – 137.
91. Kobayashi T, Matsumoto T, Kamata K. Mechanisms underlying the chronic pravastatin treatment – induced improvement in the impaired endothelium – dependent aortic relaxation seen in streptozotocin – induced diabetic rats. *British Journal of Pharmacology.* 2000; (131): 231 – 238.
92. Rosenson RS. Myocardial injury: the acute phase response and lipoprotein metabolism. *J Am Coll Cardiol.* 1993; 22: 933 – 940
93. Siqueira AEA, Abdalla DSP, Ferreira SRG. LDL: da Síndrome Metabólica a instabilização da placa aterosclerótica. *Arq Bras Endocrinol e Metab.* 2006; 50 (2): 335 - 343.
94. Preiss D, Sattar N. Lipids, lipid modifying agents and cardiovascular risk: a review of the evidence. *Clinical Endocrinology.* 2009; 70: 815 – 828.

95. Gotto AM, Brinton EA. Assessing low levels of high – density lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease. *Journal of American College of Cardiology*. 2004; 43: (5): 717-724.
96. Forti N, Diament J. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. *Arq Bras Cardiol*. 2006; 87 (5): 671-679.
97. Ozaki MR, Almeida EA. Ação do lisinopril e do losartan na função endotelial após infarto agudo do miocárdio. Estudo experimental em ratos. *Rev Bras de Clin Med*. 2009; (7): 100 – 103.
98. Santos TOC, Sá MPBO, Gomes RAF, Santos ACO, Cipriano DO, *et al*. Avaliação da peroxidação lipídica em pacientes com infarto agudo do miocárdio. *Rev Bras de Clin Med*. 2009; (7): 361 – 366.
99. Almeida EA, Morales RA, Ozaki MR. Endothelial dysfunction, lipid peroxidation and cholesterol level in rabbit arteries: relationship to progressive hypercholesterolemia. *Clin Invest Arterioscl*. 2007; 19 (6): 293 – 9
100. Frimm CC, Koike MK, Cúri M. A fibrose subendocárdica que acompanha o remodelamento ventricular do infarto do miocárdio está associado à redução da pressão de perfusão coronariana durante a fase aguda. *Arq Bras Cardiol*. 2003; 80 (5): 509 – 14.
101. Pereira LMM, Mandarim-de-Lacerda CA. Estudo quantitativo da microcirculação miocárdica na hipertensão arterial por progressiva inibição da síntese do óxido nítrico. *Arq Bras Cardiol*. 1999; 73 (5): 407 – 412.
- 102.** Campos de Souza LL. Ontogênese do remodelamento ventricular em ratos espontaneamente hipertensos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo. 2002.
103. Singi G, Damasceno DD, Andrea EDD, Silva GA. Efeitos agudos dos extratos hidroalcoólicos do alho (*Allium sativum* L.) e do capim – limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) sobre a pressão arterial média de ratos anestesiados. *Rev Bras Farmacogn*. 2005; 15 (2): 94 – 97.
104. Fazan VPS, *et al*. Ratos espontaneamente hipertensos e neuropatias periféricas. X Simpósio de Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular. Medicina, Ribeirão Preto. 2006. 39 (1): 39 – 50.
105. Koudy WJ, Sukhova GK, Herrington DM, Libby P. Pravastatin has cholesterol – lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J Am Coll Cardiol*. 1998; 31: 684 – 91.

106. Jones PH, *et al.* Once – daily pravastatin in patients with primary hypercholesterolemia: a dose – reponse study. Clin. Cardiol. 1991; 14: 146 – 151.
107. Law MR, Wald NJ, Rudnicka AR. Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta – analysis. British Medical Journal. 2003; 326: 1 - 17.
108. Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. Circulation. 2004; 109. Suppl III: III – 39 – III – 43.
109. Ribeiro Jorge PA. Endotélio, Lípides e Aterosclerose. Arq Bras de Cardiol. 1997; 68 (2): 129-134.
110. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG – CoA reductase inhibitors. Circulation. 1998; (97): 1129 – 1135.
111. Ribeiro Jorge PA, Almeida EA, Ozaki MR, Jorge M, Carneiro A. Efeitos da atorvastatina, fluvastatina, pravastatina e simvastatina sobre a função endotelial, a peroxidação lipídica e a aterosclerose aórtica em coelhos hipercolesterolêmicos. Arq Bras Cardiol. 2005; 84 (4): 314 - 319.
112. Liao JK. Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. J. Clinical Invest. 2002; 110 (3): 285 – 288.
113. Egashira K, *et al.* Pravastatin attenuates cardiovascular inflammatory and proliferative changes in a rat model of chronic inhibition of nitric oxide synthesis by its cholesterol-lowering independent actions. Hypertens Res. 2000; 23 (4): 353 – 358.
114. Kaesemeyer *et al.* Pravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of it cholesterol lowering action. J AM Coll Cardiol. 1999; 33: 234 – 241.
115. Jorge PAR, Neyra LC, Ozaki RM, Almeida EA, Bragagnolo M. Efeito da berinjela sobre os lípides plasmáticos, a peroxidação lipídica e a reversão da disfunção endotelial na hipercolesterolemia experimental. Arq Bras Cardiol. 1998; 70 (2): 87-91.
116. Massy ZA, Guijarro C. Statins: effects beyond cholesterol lowering. Nephrol Dial Transplant. 2001; 16: 1739 – 1741.

117. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic Effects of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Redutase Inhibitors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2001; 21: 1712-1719.