

**DORIVAL BLAQUER HERNANDES**

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DA  
ROSUVASTATINA E ATORVASTATINA NOS LÍPIDES  
PLASMÁTICOS, PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA  
E FUNÇÃO ENDOTELIAL EM COELHOS  
HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2007**

**DORIVAL BLAQUER HERNANDES**

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DA  
ROSUVASTATINA E ATORVASTATINA NOS LÍPIDES  
PLASMÁTICOS, PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA  
E FUNÇÃO ENDOTELIAL EM COELHOS  
HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

Dissertação de Mestrado apresentado à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção de título de Mestre Clínica Médica,  
área de concentração em Ciências Básicas.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. EROS ANTONIO DE ALMEIDA**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2007**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

H43e                      Hernandes, Dorival Blaquer  
                                Estudo comparativo dos efeitos da rosuvastatina e atorvastatina nos  
                                lípidos plasmáticos, peroxidação lipídica e função endotelial em  
                                coelhos hipercolesterolêmicos. / Dorival Blaquer Hernandez.  
                                Campinas, SP : [s.n.], 2007.

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

                                1. Hipercolesterolemia. 2. Aterosclerose. 3. Arteriosclerose.  
                                4. Endotélio. I. Almeida, Eros Antonio de. II. Universidade  
                                Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Comparative study on effects of rosuvastatin and  
atorvastatin in plasmatic lipids, lipidic peroxidation, tissuel cholesterol and  
endothelium disfunction in hypercholesterolemic rabbits**

Keywords: . **Hypercholesterolemia**  
                  • **Atheroscleroses**  
                  . **Arterioscleroses**  
                  . **Endothelium**

**Área de concentração: Ciências Básicas**

**Titulação: Mestre em Clínica Médica**

**Banca examinadora: Profº. Drº. Eros Antonio de Almeida  
                                Profº. Drº. Avelino Bastos  
                                Profº. Drº. Francisco Keer Saraiva**

**Data da defesa: 05-10-2007**

---

**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

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

---

---

**Membros:**

---

1. Prof(a). Dr(a) . José Francisco Kerr Saraiva

2. Prof(a). Dr(a). Avelindo Basto

3. Prof(a). Dr(a). Eros Antonio de Almeida

---

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

---

**Data: 05/10/2007**

---

## **DEDICATÓRIA**

**A minha grande amiga Michiko Regina Ozaki.**

*“Pode ser que um dia deixemos  
de nos falar...*

*Mas, enquanto houver amizade,*

*Faremos as pazes de novo.*

*Pode ser que um dia o tempo passe...*

*Mas, se a amizade permanecer,*

*Um de outro se há-de lembrar.*

*Pode ser que um dia nos afastemos...*

*Mas, se formos amigos de verdade,*

*A amizade nos reaproximará.*

*Pode ser que um dia não mais existamos...*

*Mas, se ainda sobrar amizade,*

*Nascemos de novo, um para o outro.*

*Pode ser que um dia tudo acabe...*

*Mas, com a amizade construiremos*

*tudo novamente,*

*Cada vez de forma diferente.*

*Sendo único e inesquecível cada momento*

*Que juntos viveremos e nos lembraremos*

*para sempre.*

*Há duas formas para viver a sua vida:*

*Uma é acreditar que não existe milagre.*

*A outra é acreditar que todas as coisas*

*são um milagre.”*

**Muito obrigado por tudo.**

*“A Rosemeire, minha esposa pelo  
companherismo e pela dedicação,  
não medindo esforços para  
as minhas realizações.”*

## AGRADECIMENTOS

---

Aos meus pais, Alfonso Blaquer Hernandez e Geni Aparecida Rossine Hernandez, pela oportunidade que me propiciaram de ser a pessoa que sou hoje e pelos valores e princípios que tanto me ajudaram em minha formação.

Ao Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida, meu orientador, pela dedicação, persistência que tanto foram úteis para o meu desenvolvimento tanto pessoal quanto profissional e para a finalização deste trabalho.

Aos Prof. Drs.

Francisco Kerr Saraiva;

Avelino Bastos;

Jose Marco Nogueira;

Márcia Marília Fagian.

Que não mediram esforços no fornecimento de informações que facilitaram a concretização deste trabalho.

A Maria Madalena de Abreu Rodrigues, técnica de laboratório onde foi executada a tese por sua valiosa colaboração.

Às pessoas pelo espírito de solidariedade, profissionalismo e apoio que contribuíram de uma forma ou de outra para este trabalho:

Wilson Ranu Ramirez Nuñez

Dejair Rodolfi;

Ricardo de Souza;

Michel Brienzo;

Fernando Antonio Antunes de Oliveira;

Jorge Airton Cicala,

Sérgio Paulo Magalhães,

William Adalberto e Silva,

Ana Cristina de Moraes.

E a todos os colegas e docentes do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental.

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xiii</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xv</i>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>1.1- Metabolismo das Lipoproteínas Plasmáticas</b> .....	19
<b>1.2- Metabolismo de Quilomícrons</b> .....	21
<b>1.3- Metabolismo de VLDL</b> .....	22
<b>1.4- Metabolismo de LDL</b> .....	23
<b>1.5- Metabolismo das HDL</b> .....	24
<b>1.6- Endotélio e Função Endotelial</b> .....	25
<b>1.7- Lesão Aterosclerótica e LDL-oxidada</b> .....	29
<b>1.8- Antioxidantes</b> .....	32
<b>1.9- Drogas Hipocolesterolêmicas</b> .....	33
<b>1.10- Efeitos Pleiotrópicos das Estatinas</b> .....	34
<b>1.11- Efeitos Antioxidantes</b> .....	35
<b>1.12- Rosuvastatina</b> .....	36
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	37
<b>2.1- Objetivos Específicos</b> .....	38
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
<b>3.1- Material</b> .....	40
<b>3.2- Métodos</b> .....	40
3.2.1- Medicamentos e Dose.....	41

3.2.2- Coleta de Sangue.....	42
3.2.3- Determinação do Colesterol e Triacilgliceróis Plasmáticos.....	42
3.2.4- Isolamento da LDL Plasmática.....	42
3.2.5- Diálise de LDL.....	43
3.2.6- Determinação da Composição Química da LDL.....	43
3.2.7- Peroxidação Lipídica.....	44
3.2.8- Medida do Colesterol Plasmático e Tecidual.....	44
3.2.9- Função Endotelial.....	44
3.2.10- Estatística.....	45
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1- Colesterol Plasmático.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2- Triglicérides.....</b>	<b>49</b>
<b>4.3- Lipoproteínas Plasmáticas.....</b>	<b>51</b>
4.3.1- LDL-colesterol.....	51
4.3.2- HDL-colesterol.....	52
4.3.3- Colesterol Tecidual.....	53
4.3.4- Peroxidação Lipídica.....	54
4.3.5- Função Endotelial.....	55
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>6- CONCLUSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ACAT	Acil-colesterol-acil transferase.
ACH	Acetilcolina.
ALT	Alanina aminotransferase
Apo	Apolipoproteínas.
AST	Aspartato aminotransferase
CETP	Proteína de transferência de colesterol esterificado.
CO	Monóxido de carbono.
COX	Cicloxigenase.
CT	Colesterol total.
DAC	Doença arterial coronariana.
EDCFs	Fatores constritores do endotélio.
EDHFs	Fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio.
EDRFs	Fatores relaxantes derivados do endotélio.
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetra acético
EET	Ácido epoxieicosatrienóico.
ELAMs	Moléculas endoteliais adesivas para leucócitos.
eNOs	Óxido nítrico sintetase endotelial.
ET	Endotelina.
GA	Grupo atorvastatina.
GGPP	Geranyl-geranyl pirofosfato.
GH	Grupo hipercolesterolêmico.
GMPC	Monofosfato-guanilato ciclase.
GN	Grupo não hipercolesterolêmico.

GPO	Glutationa peroxidase.
GR	Grupo rosuvastatina.
HDL	Lipoproteína de alta densidade.
HMG-CoA redutase	3hidroxil-metilglutaril coenzima A.
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária.
KDa	Quilodaltons.
LCAT	Lecitina-colesterol-acetiltransferase.
LDL	Lipoproteína de densidade intermediária.
LDL-OX	Lipoproteína oxidada.
LRP-LDL	Receptor relacionado a proteína.
MCP-1	Proteína-1 quimiotática para monócitos.
MDA	Malondialdeído.
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro.
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato.
NE	Noradrenalina.
NO	Óxido nítrico.
O <sup>-2</sup>	Superóxido.
PCR	Proteína C reativa.
PG	Prostaciclina.
PGH <sub>2</sub>	Endoperóxidos.
QM	Quilomícrons.
TBA	Ácido tiobarbitúrico.
TCA	Ácido tricloroacético.
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano.
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade.

## LISTA DE GRÁFICOS

---

	<b>PÁG.</b>
<b>Gráfico 1-</b> Colesterol total plasmático. Valores expressos em média e desvio padrão dos (GN) e tratados (GA e GR).....	49
<b>Gráfico 2-</b> Triglicéride Plasmático (mg/dl). Valores expressos em média e desvio padrão dos Grupos não hipercolesterolêmico (GN), Hipercolesterolêmico (GH) e Tratados (GA e GR).....	50
<b>Gráfico 3-</b> LDL Colesterol Plasmático (mg/dl). Valores expressos em média e desvio padrão dos Grupos GN, GH e Tratados (GA e GR).....	51
<b>Gráfico 4-</b> HDL Colesterol Plasmático (mg/dl). Valores expressos em média e desvio padrão dos grupos (GN), (GH) e tratados (GA e GR).....	52
<b>Gráfico 5-</b> Colesterol da Aorta (mg/g). Valores em média e desvio padrão dos grupos GN, GH e tratados GA e GR.....	53
<b>Gráfico 6-</b> Peroxidação Lipídica na parede da aorta (mg/g de tecido x $10^{-7,0}$ ). Valores expressos em média e desio padrão dos grupos GN, GH e tratados GA e GR.....	54
<b>Gráfico 7-</b> Peroxidação Lipídica nas partículas de LDL-oxidado (nMol/mg de proteína x $10^{-7,0}$ ). Valores expressos em média e desvio padrão dos grupos GN, GH e tratados GA e GR.....	55
<b>Gráfico 8-</b> Relaxamento Dependente do Endotélio de anéis aórticos pré contraídos com Noradrenalina (NE) em resposta à Acetilcolina (ACH). Relaxamento expresso em porcentagem na contração induzida pela NE ( $10^{-7,0}$ ). Os pontos representam a média e o desvio padrão dos grupos GN, GH e tratados GA e GR.....	56

# RESUMO

**Objetivo:** este estudo teve como objetivo detectar o efeito da rosuvastatina sobre os lípides plasmáticos, peroxidação lipídica, colesterol tecidual e disfunção endotelial e comparar seus efeitos com a atorvastatina em coelhos hipercolesterolêmicos. **Métodos:** Quarenta coelhos machos da raça Nova Zelândia foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo Hipercolesterolêmico (GH), Grupo não Hipercolesterolêmico (GN), Grupo Atorvastatina (GA) e Grupo Rosuvastatina (GR) (N = 10). Todos os animais foram alimentados com dieta complementada com gordura de côco 10% e colesterol 0,5% por 45 dias e água a vontade. Após 15 dias amostras de sangue foram colhidas dos grupos através de punção venosa para determinação do colesterol plasmático total. A rosuvastatina era administrada por gavagem, na dose de 2,5 mg/dia/animal e a atorvastatina na dose de 10 mg/dia/animal aos Grupos GR e GA. No final do experimento, novas amostras de sangue foram colhidas para determinação do colesterol total e isolamento de LDL. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, era realizada Toracotomia, a aorta era removido e preparado anéis de 5mm para o estudo da função endotelial, medindo colesterol tecidual, MDA na parede da aorta e LDLs. Os resultados foram comparados por métodos estatísticos não - paramétricos. **Resultados:** Ao analisar os resultados deste trabalho, podem ser observadas redução dos níveis de CT, 44,1% e 66%, TG 53,16%, 23,11%, LDL 53% e de, 40,68%, e um aumento de 17,23%, 36,98% do HDL e uma melhora na função endotelial de 33,09%, 22,37%, respectivamente, em relação a comparação GA e GR. Com o GH. **Conclusão:** Os resultados mostraram que rosuvastatina e atorvastatina foram equivalentes na redução das susceptibilidades de LDL de sofrer peroxidação, diminuindo o colesterol tecidual e melhorando a função endotelial.

# **ABSTRACT**

**Objective:** The aim of this study was to detect the effect of the rosuvastatin on plasmatic lipids, lipidic peroxidation, tissuel cholesterol, and endothelium disfunction and to compare its effect with the atorvastatin in hypercholesterolemic rabbits. **Methods:** Forty male New Zealand white rabbits were randomized in Four Groups: Group Hypercholesterolemic (GH), Group No Hypercholesterolemic (GN), Group Atorvastatin (GA) and Group Rosuvastatin (GR). (N=10). All the animals were fed with diet supplemented with fat of coconut 10% and cholesterol 0.5% w/w per 45 days. After 15 days samples of blood were removed from the groups through venous punction for total plasmatic cholesterol determination. Then the rosuvastatin was managed by gavage, in the dose of 2,5mg and Atorvastatin in the dose of 10mg per day to each animal of Groups GR. and GA. In the end of the experiment, new samples of blood were removed for determination of the cholesterol and isolation of LDL. The animals were sacrificed by displacement of the cervical column. Medium Toracotomia was carried out and the aorta was removed for ring preparation for study of the endothelium function, measured of tissue cholesterol, MDA in the wall of aorta and LDLs. The results were compared by not-parametric statistical methods. **Results:** When analyzing the results of this work, a reduction in the CT levels can be observed, of 44,1% and 66%, TG 53.16%, 23.11%, LDL 53% and of, 40.68%, and an increase of 17,23%, 36.98% of HDL, 33.09%, 22.37% in the endothelium function respectively for the compared GA and GR. with the GH. **Conclusion:** The results have shown that rosuvastatin and atorvastatin were equivalent in reducing the susceptibilities of LDL to suffer peroxidation, in decreasing the tecidual cholesterol and improving the endothelium function.

# **1- INTRODUÇÃO**

Os estudos epidemiológicos pioneiros com mais de 40 anos de duração, realizados na cidade de Framingham (EUA), possibilitaram demonstrar que a doença aterosclerótica coronariana possui íntima relação com a hipercolesterolemia, sendo que, para valores progressivamente mais elevados de colesterol, correspondiam riscos proporcionalmente maiores (Kannel et al.,1979).

Hoje encontra-se comprovado que a hipercolesterolemia é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento precoce da aterosclerose resultante do aumento da lipoproteína de baixa densidade, LDL, (Carlson & Bottinger, 1985) e, também, é amplamente aceito que a oxidação da LDL tem um papel relevante na aterogênese (Goldstein et al., 1979).

A aterosclerose é uma doença progressiva caracterizada pelo espessamento focal da íntima, gerando numerosas investigações sobre os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na patogênese desta doença e, ainda não definiram conclusões para todos os mecanismos envolvidos na aterogênese. A hipótese mais aceita é que a aterosclerose é uma resposta imunoinflamatória da íntima arterial, com resposta à injúria, ocasionadas por vários fatores, entre eles, a hipercolesterolemia (Davies e Woolf.,1993).

A aterosclerose é caracterizada histologicamente pela proliferação de macrófagos, células musculares lisas e acúmulo de colesterol na íntima arterial, desenvolvendo-se em várias etapas. Inicialmente, ocorre formação de faixas ou linhas de gorduras na íntima arterial, caracterizadas pelo acúmulo de colesterol no interior dos macrófagos transformando-se em células espumosas. (Steinberg et al.,1989),

Posteriormente, às faixas de gorduras, acrescentam-se fibroses e diferentes tipos celulares, que incluem os macrófagos e linfócitos T, células musculares lisas e fibroblastos, constituindo as placas ateroscleróticas.

Na fase de formação da placa aterosclerótica há um maior recrutamento de macrófagos, porém, em animais e em humanos normocolesterolêmicos, estes possuem poucos receptores para LDL e, ocasionalmente, aderem-se ao endotélio arterial e penetram na íntima, se diferenciam, transformando-se em macrófagos residentes (Yia-Hertuala et al.,1989; Witzum,1993).

## 1.1- Metabolismo das Lipoproteínas Plasmáticas

Os principais lipídeos do organismo são: esteróis, triacilgliceróis, fosfolipídeos e ácidos graxos moléculas insolúveis ou parcialmente solúveis no meio aquoso plasmático, que devem ser transportadas na forma de complexas estruturas de tamanho e densidade variáveis, as chamadas lipoproteínas. As lipoproteínas contêm um núcleo hidrofóbico onde concentram-se ésteres de colesterol e triacilgliceróis, envolvidas por uma camada de fosfolipídeos, colesterol livre e proteínas denominadas apolipoproteínas (apo), as quais mantêm a sua estabilidade e solubilidade. As apolipoproteínas são classificadas em quatro grupos principais designadas pelas letras A, B, C e E. Elas são importantes para a solubilização dos lipídeos bem como para a regulação do seu metabolismo, atuando como co-fatores de enzimas e mediando a interação das lipoproteínas com receptores celulares, responsáveis pela remoção das partículas lipídicas do plasma (Brown et al.; 1981). Diferem entre si sob vários aspectos: peso molecular, solubilidade em meio aquoso, atividade biológica e reconhecimento por receptor.

As lipoproteínas apresentam no plasma amplo espectro de tamanho, densidade e carga elétrica. Assim, podemos identificá-las em cinco principais classes, além de várias subfrações, de acordo com as suas densidades: quilomícrons (QM), com densidade menor que 0,95 g/ml; lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), com densidade menor do que 1,006 g/ml; lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), com densidade entre 1,006 e 1,019 g/ml, LDL com densidade entre 1,019-1,063 e as lipoproteínas de alta densidade (HDL), com densidade entre 1,063 e 1,210 g/ml (Gotto et al.; 1986).

Os quilomícrons e as VLDLs constituem-se principalmente de triacilgliceróis (84% e 55%) e pequenas porcentagens de colesterol (7% e 20%), fosfolipídeos (7% e 18%) e apolipoproteínas (2% e 8%). As IDLs, remanescentes das VLDLs, possuem aproximadamente 33% de triacilgliceróis e 33% de colesterol. As LDLs são constituídas principalmente de colesterol (48%) sendo 38% em ésteres de colesterol. As HDLs contêm em torno de 50% de proteínas, 25% de fosfolipídeos, 20% de colesterol e apenas traços de triacilgliceróis (Mills e Lane.; 1984).

Cada lipoproteína apresenta determinada apolipoproteína. A apolipoproteína A-I é o principal componente das HDLs, estando presente também nos QM, VLDL e seus remanescentes, mas não é encontrada nas LDLs. É sintetizada no fígado e intestino e sofre alterações intracelulares antes de atingir o plasma (GORDON et al.; 1982). A apo A-I ativa a enzima lecitina-colesterol-aciltransferase (LCAT) que é responsável pela esterificação do colesterol no plasma (Kostner et al.; 1987). A apo A-II e a apo A-IV são encontradas na HDL, mas em menores concentrações que a apo A-I; suas funções são pouco conhecida (Brewer et al.; 1988).

A apo B está presente nos QM, VLDL, IDL e LDL. Existem dois tipos principais de apo B que se originam de um mesmo gene; a apo B-100, de 512 KDa de peso molecular, é sintetizada no fígado e está presente nas LDL, VLDL e IDL, enquanto que a apo B-48 (241 Kda de peso molecular) é sintetizada somente no intestino e está presente nos QM e seus remanescentes (Kane, 1983). A Apo B-48 compreende a porção aminoterminal da apo B -100. Sua biossíntese no intestino é regulada pela troca de um único nucleotídeo do códon 2353 do mRNA que codifica a apo B.

A apo C apresenta várias subclasses (C-I, C-II, C-III) que estão presentes na superfície de QM, VLDL e HDL e deslocam-se facilmente entre as lipoproteínas. A apo C-I ativa a LCAT, enquanto que a apo C-II é ativadora da lipoproteína lipase. A apo C-III tem papel antagonista ao da apo C-II, sendo sua principal ação, inibir a lipoproteína lipase (Schaeffer et al.; 1985).

A apo E tem várias isoformas, resultantes da expressão de três genes alelos possibilitando identificar três fenótipos homozigóticos: E 4/4, E 3/3, E 2/2 e três heterozigóticos: E 4/3, 4/2, E 3/2. Nos hepatócitos há dois tipos de receptores que reconhecem a apo E; o receptor B/E (denominado receptor da LDL) que capta as lipoproteínas contendo apo B-100 e apo E e o receptor E (denominado LRP-LDL Receptor Related Protein) que reconhece somente a apo E das lipoproteínas. Dessa forma, toda lipoproteína contendo apo E tem duas vias de entrada no hepatócito (Driscoli e Gets, 1984).

## 1.2- Metabolismo de Quilomícrons

O transporte de gordura de origem alimentar (aproximadamente 120 g de triacilgliceróis e 500 mg de colesterol por dia) é feito pelos quilomícrons. Estas partículas, compostas principalmente por triacilgliceróis, são sintetizadas no retículo endoplasmático das células da mucosa intestinal e migram para o complexo de Golgi para serem posteriormente liberadas por exocitose na linfa mesentérica (Havel e Hamilton, 1988). Os quilomícrons são transportados via ducto torácico até a circulação sistêmica, onde ocorrem trocas de apolipoproteínas e lipídeos HDL. A Apo A é transferida dos quilomícrons para HDL, enquanto que apo E e apo C da HDL para os quilomícrons.

O metabolismo dessas partículas ocorre em duas etapas. Na primeira, os triacilgliceróis dos quilomícrons são removidos da circulação, à medida que passam pelos capilares dos tecidos periféricos, através da ação lipolítica da enzima lipoproteína lipase, cujo co-fator é a apo C-II. A enzima lipoproteína lipase, aderida à superfície endotelial dos vasos sanguíneos, é a responsável pela hidrólise dos triacilgliceróis, liberando ácidos graxos livres, os quais se ligam à albumina plasmática para serem distribuídos aos tecidos adiposo, hepático e muscular (Scow et al.; 1980). A utilização dos ácidos graxos depende da atividade física, como também da competição com a glicose do plasma.

A perda do volume dos quilomícrons, decorrente da hidrólise dos triacilgliceróis (mais de 95%), promove um rearranjo dos componentes da lipoproteína, favorecendo a incorporação de apo E e, ao mesmo tempo, a saída de fosfolipídeos, colesterol livre e apolipoproteínas C e A, que podem retornar à HDL (Eisenberg, 1984).

A segunda etapa do metabolismo compreende captação e degradação hepática dos quilomícrons remanescentes (com teor de colesterol relativamente enriquecidos). A ligação entre a partícula remanescente e seu local de remoção no hepatócito é dependente da interação entre apo E e o receptor celular específico, denominado receptor de partículas remanescentes ou receptor E, como também da presença da lipoproteína lipase na partícula. A apo B-48 tem apenas função estrutural na partícula remanescente, não sendo reconhecida pelos receptores (Havel, 1986).

### 1.3- Metabolismo das VLDL

A produção de gordura endógena de triacilgliceróis é feita pelo fígado e liberada na corrente sanguínea através da VLDL. Os triacilgliceróis são formados a partir da esterificação do glicerol por ácidos graxos captados, principalmente da corrente sanguínea, ou sintetizados no próprio órgão ou, ainda, do colesterol proveniente da captação de lipoproteínas. Os mesmos se associam à apo B-100, produzida no hepatócito, formando-se assim a VLDL, no retículo endoplasmático. A disponibilidade de triacilgliceróis sintetizados determina o tamanho da VLDL, fato que pode ter papel importante no processo de aterogênese. O catabolismo inicial da VLDL depende da lipoproteína lipase hepática para ser convertida em IDL (proteína de densidade intermediária) ou VLDL remanescente, as quais, na circulação serão convertidas em LDL, persistindo no plasma de 2 a 3 dias (Myant, 1990).

No jejum, os triacilgliceróis transportados no plasma provém, quase exclusivamente, da síntese hepática de VLDL, a partir do aporte de ácidos graxos livres do plasma.

A principal fonte fisiológica de ácidos graxos livres é a hidrólise de triacilgliceróis no tecido adiposo, uma vez que não existem quilomícrons no plasma nesta fase.

No plasma, as apo A, apo C e apo E, provenientes da HDL, são transferidas para a VLDL, regulando as etapas de metabolização pelo fígado, que se assemelham aquelas descritas para os quilomícrons (Gotto et al.; 1986).

A conversão das VLDL em partículas mais densas é consequência da hidrólise dos triacilgliceróis mediada pela enzima lipoproteína lipase. Em condições normais, uma parte dos remanescentes, denominadas IDL, é removida rapidamente pelo fígado, através do receptor B-E, ou receptor de LDL. No entanto, a maior parte de IDL continua em circulação, perdendo triacilgliceróis e fosfolipídeos, até a completa transformação em LDL, que é constituída por fosfolipídeos, colesterol livre, colesterol esterificado e apo B-100. Essas partículas são também removidas do plasma pelo receptor B/E (Myant, 1990).

#### 1.4- Metabolismo das LDL

A LDL transporta 70% do colesterol circulante no plasma. A LDL é catabolizada por dois mecanismos, sendo o mais entendido aquele que depende da interação com receptores específicos para LDL, o que é regulado pela necessidade celular (Brown e Goldstein, 1986). A LDL é reconhecida por receptores B/E, que identificam a apo B, mas que tem alta afinidade pelas apo E, também presentes na LDL. O outro mecanismo é através dos receptores sequestrantes (scavenger receptors) dos macrófagos que permitem a acumulação de colesterol com ésteres de colesterol (Cobbe e Shepherd, 1993).

O receptor B/E, descrito por Brown e Goldstein (1986), contém aproximadamente 820 aminoácidos e vários domínios e cada um possui uma única função. O primeiro domínio, que possui 292 aminoácidos, é o local de ligação de LDL e está localizado na parte externa da membrana celular. Este domínio tem várias séries de 40 aminoácidos repetidas, o que permite a ligação de mais de uma apolipoproteína ao mesmo tempo. O segundo domínio, que contém cerca de 400 aminoácidos, é homólogo ao fator de crescimento epidérmico e a sua função não é conhecida. O terceiro domínio consiste de 58 aminoácidos e está ligado a resíduos de carboidratos. O segmento seguinte tem 22 aminoácidos e se localiza na membrana celular. O último domínio, com 50 aminoácidos, localiza-se no citoplasma e tem papel importante na fixação do receptor em região específica da membrana.

A LDL ligada ao receptor é envolvida pela membrana celular, formando uma vesícula endocítica. A alteração no pH dentro da vesícula provoca o desligamento da LDL do receptor e este retorna para a superfície celular. Em seguida, os lisossomos degradam os componentes da lipoproteína (Gotto, 1987).

A quantidade de receptores B/E sintetizados é regulada pelo conteúdo de colesterol celular. O colesterol age no núcleo da célula ligando-se a proteína que suprime a atividade do gene responsável pela síntese do receptor de LDL (Brown e Goldstein, 1986). Quando o colesterol celular aumenta, o número de receptores produzidos diminui, enquanto que a redução do colesterol provoca aumento na síntese desses receptores. Esta regulação

determina o controle rígido do conteúdo celular de colesterol e protege a célula do efeito lesivo do excesso deste.

O aumento de colesterol celular provoca, também, estímulo na atividade da enzima acil-colesteril-acil-transferase (ACAT), que esterifica o colesterol livre utilizando ácido graxo. O colesterol esterificado é armazenado na célula como gotículas ou é incorporado à VLDL no fígado e secretado para o plasma. Além disso, há diminuição na atividade da enzima hidroximetil-glutaril coenzima A redutase (HMGCoA redutase) que é a enzima chave da síntese do colesterol (Brown e Goldstein, 1986).

### **1.5- Metabolismo das HDL**

O transporte reverso de colesterol é o processo pelo qual o colesterol retorna dos tecidos periféricos para o fígado, no sentido de ser excretado pela via biliar ou mesmo ser re-utilizado. Neste processo, ao contrário da LDL, a qual está associada à aterosclerose, a HDL desempenha um papel protetor removendo o colesterol da superfície dos tecidos e transferindo-o para QM, VLDL e IDL, através da ação da enzima LCAT e a CETP (proteína de transferência de colesterol esterificado). A enzima LCAT, cujo co-fator é a apo A-I, esterifica o colesterol livre presente na superfície da HDL com os ácidos graxos dos fosfolípidos. A ação da LCAT permite que a HDL possa progressivamente receber mais colesterol livre e fosfolípidos de outras lipoproteínas ou mesmo de membranas celulares. Assim, a HDL vai aumentando de volume e diminuindo de densidade, o que caracteriza a transformação de HDL<sub>2</sub>.

A HDL<sub>2</sub> reconverte-se em HDL<sub>3</sub> pela remoção do colesterol esterificado no fígado ou pela transferência do mesmo para as lipoproteínas ricas em triacilgliceróis, através da CETP.

Dessa forma considera-se retorno direto, a remoção pelo fígado do colesterol esterificado ligado à HDL e indireto aquele transferido à VLDL, LDL e QM (Eisenberg, 1984; Quintão, 1992; Cobbe e Shepherd, 1993; Gotto, 1987).

## 1.6- Endotélio e Função Endotelial

As células endoteliais proliferam, na fase embrionária, por meio da divisão celular e da formação de brotos. Os brotos, à medida que se formam, são preenchidos pelos componentes do sangue, dando origem ao vaso. O tecido conjuntivo e as células do músculo liso são incorporados posteriormente, sob influência da célula endotelial, completando a formação do vaso. O que irá determinar se o vaso formado será uma artéria ou uma veia, é a pressão relativa que o sangue exerce sobre a parede do vaso e o volume de sangue dentro do mesmo. A maior pressão e menor volume do sangue determinarão que aquele vaso será uma artéria, e o maior volume e a menor pressão do sangue na parede do vaso, a veia. O aspecto fino e frágil da célula endotelial ao microscópio se contrapõe com a forte aderência da célula ao tecido conjuntivo e à célula endotelial vizinha. O sistema circulatório estará totalmente recoberto pelo endotélio muito antes do coração bater. A origem comum embrionária da célula endotelial e das células do sangue explica a capacidade do endotélio de se adaptar a peculiaridade funcional de cada órgão do organismo. Dependendo da localização ou do órgão que o endotélio supre, a resposta ao mesmo estímulo poderá ser diferente. Por exemplo, a hipóxia provoca vasoconstrição na artéria pulmonar e vasodilatação na artéria renal. Esta resposta observada nos diferentes leitos vasculares é evidentemente, modulada pelo endotélio.

A vasoconstrição observada no leito arterial pulmonar ocorre, provavelmente, devido à diminuição na produção de fatores vasodilatadores, que se opõe a vasoconstrição, e/ou decorrente da inativação daqueles fatores.

Histologicamente a célula endotelial possui forma alongada com núcleo proeminente e é repleta de organelas intracelulares, estrutura orgânica de célula que possui atividade metabólica intensa. A característica estrutural típica de uma célula endotelial adulta é a presença de invaginações submicroscópicas na membrana citoplasmática denominadas cavéolas. No máximo, duas células endoteliais recobrem toda a circunferência interna do vaso.

Independentemente do tipo de vaso que o endotélio recobre, ele modula ativamente a coagulação, o transporte de substâncias, solutos e moléculas através das junções intercelulares. O tônus vascular, a coagulação, a trombose, a inflamação e o estado

oxidativo fisiológico são mantidos por meio do balanço entre as forças que atuam contra e pró no organismo. Os mediadores e/ou fatores produzidos pelo endotélio podem ser inutilizados dentro da própria célula, difundir-se para o sangue ou atravessar a membrana do músculo liso vascular (Michel CC, 1998.). No músculo liso vascular, os fatores podem ligar e ativar receptores que provocam relaxamento ou constrição do músculo, estimular a proliferação celular e geração de espécies reativas de oxigênio e a expressão de genes. O fator de relaxamento produzido pelo endotélio, o óxido nítrico, ativa a monofosfato-guanilato ciclase (GMPc), que diminui o cálcio intracelular e provoca o relaxamento da musculatura lisa vascular enquanto a vasoconstrição é provocada pelo aumento do cálcio intracelular. A relação íntima do endotélio e os componentes do sangue surgem na fase embrionária de formação dos vasos sanguíneos.

As células sanguíneas e as células endoteliais se originam do mesmo tecido embrionário, o hemangioblasto.

O endotélio recobre todos os vasos do organismo desde as grandes artérias até os menores capilares arteriais, toda a árvore venosa desde as grandes veias até suas menores ramificações e os vasos linfáticos. As artérias em geral, têm a função de conduzir o sangue e de regular a força necessária de bombeamento do coração de forma a permitir uma perfusão adequada e suficiente para a nutrição celular, através de sua constituição muscular e elástica.

Os capilares desempenham um papel fundamental na nutrição celular e no transporte de substâncias, moléculas e solutos do sangue para os tecidos e vice-versa, na remoção de produtos oriundos do metabolismo celular para a futura excreção pelo organismo. Os capilares têm pouca importância na regulação do tônus vascular devido à falta de musculatura lisa em sua parede.

Nas últimas duas décadas, quando Furchott e Zawadzki (1980), demonstraram que as células endoteliais modulavam o tônus vascular, o endotélio deixou de ser somente uma fina camada celular que recobria a face interna dos vasos.

A célula endotelial controla ativamente a coagulação, trombólise, remodelação vascular e resposta inflamatória e imune, recobrando todo o leito vascular. Isto significa, em um primeiro momento, que o endotélio forma uma extensa rede de proteção entre os

componentes do sangue e os tecidos permitindo uma melhor fluidez e conseqüentemente evitando a trombose intravascular. Contudo, a forma pela qual é montada a estrutura e a organização da rede requer um contato íntimo entre as células endoteliais. Em qualquer situação de quebra de continuidade da rede ou perda do contato, as células se organizam e procuram, refazer a conexão intercelular.

As células endoteliais são capazes de detectar a mínima alteração na pressão arterial, fluxo sanguíneo, balanço oxidativo, coagulação, sinal de inflamação e ativação do sistema imune no organismo. Esta informação pode ser detectada em qualquer local do organismo e ser transmitida por meio das comunicações intercelulares para todas as outras células endoteliais. A necessidade dessa conexão integrada se deve a um dos produtos liberados pelo endotélio, o óxido nítrico, que possui meia-vida de cinquenta segundos. A posição estratégica do endotélio na parede do vaso e sua localização nunca é maior que quinze micra de distância de qualquer outra célula do organismo, pode-se considerar que a célula endotelial seja o mais perfeito sensor biológico existente, capaz de detectar mínimas variações de pressão, fluxo, mediadores químicos e alterações metabólicas que possam ocorrer em qualquer local do organismo. Também pode quantificar com precisão, por exemplo, o aumento da pressão exercida pelo sangue contra a parede do vaso na hipertensão arterial, processar e transmitir a informação, respondendo eficazmente e liberando produtos que irão normalizar os níveis pressóricos. Em doenças como diabetes, tabagismo e dislipidemia, aliadas à hipertensão arterial, a repercussão vascular pode ser observada em toda a microcirculação (Fenstermacher et al., 1988.).

A integridade do endotélio geralmente é afetada por tabagismo, dislipidemia, senilidade e doenças como hipertensão arterial, arteriosclerose, força de cisalhamento, inflamação, hipóxia e diabetes melito.

A perda da integridade celular leva a disfunção endotelial e expõe as demais camadas da parede arterial (íntima, média e adventícia) à ação direta das substâncias vasoconstritoras produzidas pelo próprio endotélio ou transportadas pelo sangue, como a angiotensina II e catecolaminas, que ao entrarem em contato direto com as células musculares lisas, provocam vasoconstrição não modulada pelo endotélio e estimulam a proliferação destas.

A permeabilidade vascular pode, também, ser afetada em situações de ativação plaquetária e inflamação em que a liberação de mediadores químicos pode levar a disfunção endotelial e, posteriormente, deixar o vaso ou músculo liso sem o efeito modulador do endotélio.

O endotélio pode ser considerado um órgão endócrino ativo que, em resposta a estímulos humorais, neuronais e mecânicos, sintetiza e libera substâncias vasoativas que modulam tônus, calibre vascular e fluxo sanguíneo, desempenhando papel fundamental na regulação da circulação. Essas substâncias vasoativas foram denominadas como fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e fatores constritores derivados do endotélio (EDCFs). Dentre os EDRFs, podemos citar óxido nítrico (NO), (Jover B et al,1993. Palmer RMJ et al, 1987. Palmer et al. 1988.), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), monóxido de carbono (CO) e vários fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHFs), como o ácido epoxieicosatrienóico (EET), metabólito do ácido araquidônico via citocromo P450 (Campbell WB, et al. 1996.), e endocanabinóides (He P, et al. 1993.). São EDCFs: endotelina (ET1) (Zakhary R et al., 1996), produtos da oxigenase, como endoperóxidos (PGH<sub>2</sub>) e tromboxano (TXA<sub>2</sub>) (Diedrich DA, et al., 1990.), e espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido (O<sup>-2</sup>). São liberados também pelo endotélio: interleucinas, fatores de crescimento, inibidores de plasminogênio e fator de Von Willebrand (Schieffer B et al.; 1997).

A disfunção endotelial é caracterizada pela diminuição na produção ou na biodisponibilidade de NO para as células endoteliais, impossibilitando que estas efetuem suas funções fisiológicas.

A disfunção endotelial observada no curso das doenças vasculares crônicas, está, geralmente, associada a fatores ambientais que aceleram a lesão vascular e levam a perda da função ou perda do órgão (Plante GE 2002, Hamet P et al., 2002.).

Na maioria das doenças cardiovasculares ocorre um desequilíbrio oxidativo e também possui um componente genético já identificado, porém a evolução e severidade da doença podem ser modificadas por fatores ambientais como fumo, ingestão de sal, sedentarismo, dieta hipercalórica e/ou hiperlipídica. A interferência do meio sobre o

determinante genético produz o fenótipo (efeito do ambiente sobre o gene da doença), (Plante GE , 2002, Hamet P et al. 2002).

### **1.7- Aterosclerose e LDL Oxidada**

A lesão aterosclerótica inicial é caracterizada por um acúmulo de células sobrecarregadas com colesterol esterificado, denominadas células espumosas; subjacentes ao endotélio arterial. O colesterol que se acumula origina-se primariamente das lipoproteínas plasmáticas, principalmente da LDL (Newman et al.; 1962). As células espumosas são derivadas de monócitos circulantes que se transformam em macrófagos residentes na íntima do vaso. Estas células dão à superfície da íntima arterial o aspecto de linhas ou manchas lineares amareladas, vistas à simples inspeção macroscópica.

Duas linhas de evidências sugerem, fortemente, que a geração das células espumosas, que ocorre *in vivo* decorrente do excesso de LDL na circulação, seja um processo independente dos receptores normais de LDL, encontrados em todos os tecidos: - Pacientes e animais com deficiência genética de receptores de LDL, desenvolvem a lesão aterosclerótica rica em células espumosas. Portanto, a captação arterial de LDL se dá por vias alternativas. Diante dessas evidências, postulou-se que as LDL circulantes sofreriam algum tipo de transformação e que essa forma modificada de LDL seria removida pela célula endotelial para gerar células espumosas (Brown e Goldstein 1983).

Um dos eventos mais precoces na aterosclerose é a oxidação da LDL causada pelos radicais livres produzidos nas células endoteliais, monócitos e macrófagos na íntima arterial.

A oxidação da LDL é um processo extremamente complexo que afeta essencialmente todos os componentes da partícula, a peroxidação dos ácidos graxos, poliinsaturados, a formação de dienos conjugados, a fragmentação dos ácidos graxos oxidados formando produtos com grande variação de peso molecular (aldeídos, álcoois, cetonas e alcanos), a fragmentação da cadeia polipeptídica de apo B, a oxidação do colesterol (oxiesteróis), a conjugação dos produtos de degradação lipídica com os epsilon

amino grupos dos resíduos de lisina, perda dos sítios reconhecidos pelo receptor de LDL e geração de nova configuração reconhecida pelo receptor (Steinbrecher et al.; 1984; Davidson, 1993; Schwartz et al.; 1993; Parthasarathy et al.; 1985). Este processo é inibido pelos agentes antioxidantes (Halliwell e Chirico, 1993; Masana et al.; 1991) e recentes evidências sugerem que a HDL pode evitar as alterações oxidativas da LDL (Parthasarathy et al.; 1990). O processo de oxidação da LDL *in vivo* deve ocorrer em compartimento extravascular e em microambientes protegidos dos antioxidantes naturais. A LDL também pode ser oxidada *in vitro*, pela incubação em cultura de células ou com íons de metais de transição, tais como cobre e ferro (Parthasarathy et al.; 1990).

As lipoproteínas movimentam-se continuamente na parede das artérias, sendo que algumas partículas permanecem no interstício por mais tempo e ficam submetidas a maior grau de oxidação, devido a condições geradas pelas células, favorecendo a oxidação ou diminuindo a defesa antioxidante. É possível, também, que alguns metais ligados a complexos moleculares ou mesmo livres catalisem essa oxidação (Halliwell, 1995). Portanto, o aumento dos níveis de LDL plasmática, levam ao aumento de LDL na íntima arterial, favorecendo a ação de radicais livres e, conseqüentemente, ao aumento da LDL oxidada (Raines e Ross, 1993; Aviram, 1993).

Em animais normocolesterolêmicos, os monócitos ocasionalmente atravessam o endotélio vascular, mas, na hipercolesterolemia, principalmente na fase inicial do desenvolvimento da lesão aterosclerótica, há um maior recrutamento de monócitos. Após a entrada dos monócitos na íntima arterial, estes sofrem ativação e diferenciação celular, transformando-se em macrófagos residentes, processo que está associado com as mudanças de funções. Os macrófagos geram uma variedade de substâncias, como as espécies reativas de oxigênio, radicais livres e enzimas, incluindo proteases e lipases (Yia-Herttuala et al.; 1989; Witzum, 1993).

O recrutamento de monócitos é um processo que envolve vários mecanismos: o contato com o endotélio, que está relacionado com moléculas adesivas produzidas por este, como as ELAMs (moléculas endoteliais adesivas para leucócitos); citocinas como a interleucina 1-beta (fator estimulante da colonização de monócitos) e fatores hemodinâmicos locais como fluxo sanguíneo, ramificações arteriais, e áreas de curvatura

(Hansson, 1993). Outro mecanismo envolvido com a migração de monócitos transendotelial é dirigido pelas substâncias quimiotáticas como a MCP-1 (proteína-1 quimiotática para monócitos), além de peptídios sintetizados pelas células endoteliais e musculares lisas quando são estimuladas pelas LDL oxidadas (Schwartz et al.; 1993).

Os produtos da oxidação de LDL são quimiotáticos para os monócitos, inibidores da migração dos macrófagos, alteram a expressão genética das células arteriais, estimulam o crescimento e proliferação de células musculares, levando ao espessamento do ateroma. A LDL oxidada estimula a síntese de MCP-1 e da interleucina 1-beta, além de ter efeito citotóxico, que pode ser extremamente importante na progressão da lesão aterosclerótica, como a necrose das células espumosas (Esterbauer et al.; 1991; Esterbauer 1993; Faruqi e Dicorleto, 1993). A LDL oxidada inibe a liberação de EDRF que prejudica o vasorelaxamento e provoca agregação de plaquetas. A LDL oxidada é uma partícula imunogênica e já foram encontrados, em pacientes com aterosclerose avançada de carótida, anticorpos que reconhecem LDL oxidada, mas não LDL nativa, (Liu et al.; 1994; Hansson, 1993; Salonen et al.; 1992).

O reconhecimento da LDL oxidada pelos receptores de macrófagos poderia ser resultado da derivação dos resíduos de lisina da apolipoproteína B, pelos produtos da peroxidação, que ocasionam mudanças na conformação e fragmentação da apo B (Steinbrecher et al.; 1987; Greenspan et al.; 1995).

Vários fatores determinam a susceptibilidade da LDL às modificações oxidativas. Os compostos exógenos que promovem a formação de radicais livres como por exemplo, fumo, hiperoxia, toxinas e drogas; a quantidade de LDL infiltrada no espaço subendotelial (que depende da concentração plasmática de LDL); a quantidade de ácidos graxos poliinsaturados na LDL; o estímulo que aumenta o recrutamento de monócitos na íntima e sua conversão a macrófago e o balanço entre compostos pró e antioxidantes no espaço subendotelial (Witzum, 1993, Shireman, 1996). O ácido linoléico é o mais abundante tanto nos fosfolípídeos da superfície quanto no colesterol-éster e triacilgliceróis do núcleo das lipoproteínas, dietas ricas em gorduras poliinsaturadas são consideradas hipocolesterolêmicas (Grundy e Denke, 1990), porém provocam a formação de lipoproteínas mais ricas em ácidos graxos poliinsaturados, que seriam mais susceptíveis à

peroxidação e, em princípio, mais aterogênicas. Substâncias antioxidantes, entre elas a vitamina E, podem evitar a oxidação dessas lipoproteínas (Esterbauer et al.; 1987; Parthasarathy et al.; 1990; Frei & Gaziano, 1993; Frei, 1995).

Embora seja o plasma rico em substâncias antioxidantes, acredita-se que existam formas oxidadas de lipoproteínas neste compartimento. Isto deve-se ao isolamento de uma pequena subfração de LDL no plasma de seres humanos e primatas chamada LDL com características comuns à LDL oxidada *in vitro* (Avogaro et al.; 1998; Hodis et al.; 1994). Nos primatas essas características são aumento de carga negativa, da quantidade de óxidos de colesterol e da toxicidade em cultura de células em relação à LDL nativa. Nos primatas hipercolesterolêmicos e normolipidêmicos a subfração LDL representa aproximadamente 5% da LDL total. No entanto, 50% do colesterol da LDL está oxidado, o que não ocorre com o colesterol da LDL nativa. Também foi encontrado aumento de produtos de oxidação de lipídeos no plasma de pacientes com alto risco de infarto do miocárdio (Stringer et al.; 1989; Liu et al.; 1994).

DE Graaf (1991) e Tribble et al.; (1995), estudando diversas subclasses de LDL, identificadas pela ultracentrifugação e pela eletroforese, relacionaram a maior quantidade de LDL pequena e mais densa com o maior risco de doença coronária aterosclerótica, independente da idade, sexo e peso. A concentração de HDL e de triacilgliceróis também foi relacionada à presença de LDL pequena e mais densa. Todavia, não está esclarecido se estas partículas mais densas são propriamente mais aterogênicas ou são simplesmente marcadores de um perfil aterogênico (Tribble, 1995).

## **1.8- Antioxidantes**

O sistema antioxidante do organismo protege as células dos efeitos danosos dos radicais livres, evitando a peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados (Halliwell, 1991). Este sistema consiste de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase, a catalase; e de micronutrientes que incluem os minerais como selênio, cobre, zinco, manganês e as vitaminas E, C, A e o beta-caroteno (Diplock, 1991; Hennekens e

Gaziano, 1993). A primeira linha de defesa natural são as metaloproteínas superóxidos dismutases (SOD), citoplasmática (contendo cobre e zinco) e mitocondrial (contendo manganês), que atuam acelerando a velocidade de dismutação do radical superóxido (BAST et al.; 1991). A catalase localiza-se nos peroxissomas e é uma enzima que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio. Outra enzima citoplasmática que também é capaz de destruir o peróxido de hidrogênio por um mecanismo diferente é a glutathione peroxidase (GPO), cujo cofator é selênio (Jialal e Fuller, 1993).

### **1.9- Fármacos Hipocolesterolêmicos**

Estudos epidemiológicos tem demonstrado que a diminuição do colesterol plasmático, através do uso de medicamentos hipocolesterolêmicos, reduz também a incidência de aterosclerose coronária (Cobbe e Shepherd,1993; Hunnighake et al.,1990). Os medicamentos hipocolesterolêmicos mais efetivos atualmente são aqueles denominados estatinas.

As estatinas são medicamentos derivados de microrganismos, os quais interferem eficazmente na síntese celular de colesterol por inibição competitiva com a enzima HMG-CoA redutase. As estatinas reduzem a hipercolesterolemia por induzirem a formação de receptores hepáticos que captam as LDL do plasma e por diminuírem a síntese de VLDL, esta última explica o efeito parcial na queda da trigliceridemia (Quintão, 1994). As estatinas de uso mais freqüente no mercado são: a pravastatina, lovastatina e a sinvastatina. A partir de 1994 no Laboratório de Lípidos, Endotélio e Aterosclerose do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental-FCM, da Universidade Estadual de Campinas (Ribeiro Jorge et al,1994) verificaram um diferencial de ação entre dois tipos de estatinas: pravastatina e sinvastatina administrando-as em coelhos hipercolesterolêmicos, em doses suficientes para reduzir o nível de colesterol plasmático a valores semelhantes, nos dois grupos de animais. Chegaram a conclusão que a pravastatina produz um relaxamento dependente do endotélio de maior magnitude. Foi concluído, também, sobre a possibilidade da existência de alguns efeitos adicionais do medicamento, que posteriormente foi denominado de efeitos pleiotrópicos das estatinas (Farner, 2000).

Em 2004 Almeida et al, concluíram que a fluvastatina provoca melhorias significativas na disfunção endotelial em coelhos hipercolesterolêmicos após 30 dias de tratamento com o medicamento, sendo que esta melhora possui uma íntima relação entre os valores de colesterol sérico e tecidual.

### **1.10- Efeitos Pleiotrópicos das Estatinas**

Os efeitos pleiotrópicos das estatinas referem-se a: proteção sobre a função endotelial, ação sobre a inflamação na placa, estabilização da placa e efeito antitrombótico. A proteção sobre a função endotelial pode ser somente decorrente da redução das LDL circulantes ou devido a outros fatores.

Laufs et al, (1998), verificaram aumento da enzima constitutiva endotelial NO sintase e dos níveis de seu mRNA em veia safena exposta à LDL oxidada e tratada com lovastatina e sinvastatina. John et al, (1999), verificaram aumento do fluxo dependente do endotélio em indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com fluvastatina, relacionando este evento com aumento da produção de NO. O estudo RECIFE, (1997), mostrou que a redução intensa do colesterol, logo após o infarto do miocárdio, é seguida de aumento do fluxo braquial endotélio dependente.

Em 1997, Ribeiro Jorge et al, demonstraram em coelhos hipercolesterolêmicos tratados com pravastatina e sinvastatina, que ocorreu aumento do relaxamento dependente do endotélio nos animais tratados com pravastatina a partir do 4º dia de administração, com redução da peroxidação lipídica, embora sem alteração nos níveis do colesterol plasmático, invocando uma ação antioxidante para os achados. Os resultados observados sugerem uma ação rápida da reversão da disfunção endotelial com eventual aplicação clínica nas síndromes coronarianas agudas.

Lefer et al, (1999) em modelos experimentais de isquemia reperfusão em ratos, tratados com sinvastatina, observaram aumento do fluxo coronariano e inibição da interação entre leucócitos e células endoteliais. Ocorreu, também, diminuição da expressão

da P selectina e diminuição das moléculas de adesão, atribuídos ao aumento do NO endotelial.

Hernandes et al, 1998 demonstraram que a atorvastatina e a sinvastatina reduzem a expressão do mRNA da ET-1. Vita et al, (2000) demonstraram efeitos benéficos sobre a microcirculação.

Strandberg, (1999), observou em estudo clínico utilizando a sinvastatina e a atorvastatina, diminuição significativa dos níveis da proteína C reativa (PCR), um dos marcadores da inflamação da placa aterosclerótica. O estudo CARE, (1988), em que se utilizou a pravastatina, também revelou diminuição da PCR, independente dos níveis do colesterol.

Bellosta, et al, (1998) demonstraram em estudos experimentais que a fluvastatina, a sinvastatina, lovastatina e cerivastatina são capazes de diminuir a proliferação de células musculares lisas, independente da redução de lipídeos. Esta ação é considerada inadequada para a estabilização da placa.

### **1.11- Efeitos Antioxidantes**

A primeira sugestão de que as estatinas pudessem ter uma ação antioxidante foi proposta por Ribeiro Jorge et al, (1994), que verificaram em coelhos hipercolesterolêmicos melhora da reversão da disfunção endotelial, desproporcional à redução lipídica, quando tratados com a pravastatina. Esta observação foi reiterada em 1997 pelos mesmos autores quando se estudou a reversão rápida da hipercolesterolemia, com estatinas.

A atividade antioxidante das estatinas foi observada por outros autores com sinvastatina, a fluvastatina (Dupuis et al. ;1999) e a atorvastatina (Scalia et al.; 1998). Resta melhor definição sobre a real interferência das substâncias antioxidantes sobre a evolução clínica da aterosclerose.

Um outro efeito atribuído às estatinas é a alteração dos fatores de coagulação sanguínea, pois as gorduras elevam os níveis de PAI-1 e P selectina e diminuem a função endotelial, com repercussão sobre fenômenos trombóticos e anti-trombóticos. Assim, os

efeitos das estatinas sobre a coagulação podem estar relacionados somente à redução da lipidemia. Dangas et al, (1999), observaram redução do fator ativador do plasminogênio em pacientes usando pravastatina. Lopez et al, (1998), observaram diminuição dos níveis de PAI-1 em cultura de células humanas tratadas com atorvastatina e fluvastatina.

Segundo Edwards et al, (2000), em seu trabalho realizado em mulheres, este observou uma diminuição na incidência de osteoporose com tratamento com estatinas.

### **1.12- Rosuvastatina**

Recentemente, a indústria farmacêutica apresentou uma nova estatina denominada rosuvastatina que, como as demais reverte competitivamente a formação de colesterol endógeno, inibindo a conversão de mevalonato em colesterol pela HMG-CoA redutase, provocando uma diminuição do colesterol plasmático associado a lipoproteínas de baixa densidade LDL e triglicérides. Também, aumenta os níveis de colesterol associados às proteínas de alta densidade HDL.

Estudos recentes demonstraram a eficácia da rosuvastatina tanto em humanos quanto em animais. Hunninghake et al, (2004) demonstraram em seu trabalho que a rosuvastatina provocou uma queda significativa nos níveis de triglicérides em pacientes hipercolesterolêmicos. Olsson et al, (2003), relataram que a rosuvastatina pode chegar a reduzir até 65% de colesterol plasmático em pacientes hipercolesterolêmicos. Stein et al, (2003), relataram uma queda nos níveis de HDL, apo B e apo AI.

Assim, a rosuvastatina será usada em um modelo experimental de hipercolesterolemia, para verificação de seus efeitos sobre os lípides plasmáticos e suas repercussões na parede arterial e compará-los com outra estatina amplamente utilizada na prática clínica.

## **2- OBJETIVOS**

1. Estudar o efeito da rosuvastatina sobre os lípides plasmáticos.

### **2.1- Objetivos Específicos**

1. Estudar o efeito da rosuvastatina na peroxidação lipídica, no colesterol tecidual e disfunção endotelial;
2. Comparar seus efeitos em relação aos dados anteriores com a atorvastatina.

### **3- MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1- Material**

O colesterol ultrapuro foi obtido da Vetec Química Fina Ltda, R. J, Brasil, (cód 967) e a gordura de côco foi obtida da Gordura de Côco Brasil.

Os Kits enzimáticos para a determinação de colesterol CAT N° (01400) foi obtido da Laborlab, (S.P, Brasil) e o Kit de Triglicérides MONO CAT (10726) foi obtido da IN VITRO Diagnóstica (MG, Brasil) reativo precipitante para separar HDL CAT N° (02300) obtido da Laborlab (S.P, Brasil).

O brometo de potássio p.a. (C-07491) e o sulfato cúprico (C-1843) foram obtidos da Cinética Química, (S.P., Brasil) e o ácido tricloroacético (C-446) da Vetec Química (S.P., Brasil). Os sais e reagentes foram obtidos da Merck (S.P., Brasil).

### **3.2- Métodos**

O experimento foi realizado de acordo com as normas do US National Institute of Health para uso de animais de laboratórios (Publication n° 85+23,1985).

Para a execução deste experimento foram utilizados quarenta coelhos, machos da raça Nova Zelândia, com dezesseis semanas de idade e com peso inicial de  $2.0 \pm 0,1$ kg. Os animais foram randomizados, colocados em gaiolas metabólicas, separados individualmente e submetidos a dois tipos de tratamento.

Os coelhos foram mantidos no Biotério do NMCE-FCM-UNICAMP, com temperatura entre 20 e 22°C com período de luz de doze horas.

A dieta foi fornecida em quantidade limitada a 60 g/dia durante quarenta e cinco dias para obter a mesma velocidade de crescimento, a água foi fornecida à vontade.

Foi usada uma dieta base não purificada de forma aberta, onde cada 100g de ração foi composta de: Proteínas 20%, Carbohidratos 45%, Fibras 16%, Gordura 5%, Cinza 14%, da marca Purina.

A dieta base foi fornecida ao grupo normocolesterolêmico, enquanto que os outros três grupos de animais foram submetidos à base mais suplementação contendo 0,5% de colesterol e 10% de gordura de côco. Esta última proporcionou 70% de ácidos graxos saturados, 17% monoinsaturados e 13% de poliinsaturados, respectivamente, por 45 dias. A suplementação foi feita dissolvendo 5g de colesterol em 100g de gordura de côco aquecida e misturada com 1kg de dieta base até que esta absorvesse completamente os lipídeos. Esta dieta foi preparada semanalmente.

Os animais foram divididos em quatro grupos e submetidos ao seguinte tratamento:

1- Grupo Não Hipercolesterolêmico (GN) (N=10).

2- Grupo Hipercolesterolêmico (GH) (N=10).

3- Grupo Atorvastatina (GA) (N=10).

4- Grupo Rosuvastatina (GR) (N=10).

### 3.2.1- Medicamentos e Doses

Os medicamentos utilizados para a execução desse trabalho foram a rosuvastatina e a atorvastatina, em doses de 10mg/dia/animal para a atorvastatina e 2,5mg/dia/animal para rosuvastatina.

Os medicamentos foram administrados em forma de gavagem, uma vez ao dia, diluídos em 5ml de água, aspirados por uma seringa de 10ml, conectadas a uma sonda nasogástrica N° 10. O animal era sondado e administrado o medicamento. Esse procedimento foi realizado com a finalidade de se certificar a ingestão dos medicamentos pelo animal.

### 3.2.2- Coleta de Sangue

Os coelhos, deixados em jejum por 16 horas, eram imobilizados para extrair o sangue por punção cardíaca, usando-se uma seringa de 20 ml com agulha 40X12mm (18G 1½). O sangue era coletado em tubo contendo EDTA-dissódico, para obter uma concentração final de 1.5 mg/ml (p/v), sendo o EDTA usado como anticoagulante e antioxidante. O plasma foi separado por centrifugação em 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 processado. Todas as análises foram feitas em duplicata e calculada a média entre as mesmas.

### 3.2.3- Determinação do Colesterol e Triacilgliceróis Plasmáticos

A medida do colesterol plasmático foi determinada pelo método enzimático, onde a hidrólise do colesterol e ésteres de colesterol estão acopladas a uma reação de cor, monitorada a 500 nm, Para 10 µl de plasma, foi adicionado (01) um ml de reativo, incubando-se a 37°C por 5 minutos. Uma concentração de colesterol de 200 mg/dl foi usada como padrão.

A quantificação dos triacilgliceróis foi realizada usando o kit enzimático, onde a hidrólise libera o glicerol que é determinado por uma reação de cor, com leitura a 500 nm. Uma solução de glicerol, correspondente a 200mg/dl de triacilgliceróis foi usada como padrão. Para 10 µl de amostra adicionou-se um (01) ml de reativo, incubando-se a 37°C por 5 minutos.

### 3.2.4- Isolamento da LDL Plasmática

A LDL foi separada do plasma pelo método de ultracentrifugação preparativa sequencial (Havel et al.; 1955). Uma alíquota de 4,5 ml de plasma em duplicata, foi colocada em tubos “Ultra Clear <sup>TM</sup>” apropriado para o rotor 50.3 T1 e centrifugada a velocidade de 40.000 rpm (158.000 x g) por 18 horas a 4°C, na ultracentrífuga Beckman,

modelo L 8 (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EUA). Após, os tubos eram retirados e mantidos em gelo, removendo a camada sobrenadante por aspiração com uma pipeta Pasteur de ponta fina, obtendo-se a VLDL ( $d < 1,006$  g/ml). O infranadante era ajustado a densidade de  $1,063$  g/ml com a solução padrão de brometo de potássio ( $d=1,342$  g/ml) contendo  $153$  g de NaCl,  $354$ g de KBr e  $100$  mg de EDTA- $\text{Na}_2$ /litro. Os tubos eram submetidos a uma segunda centrifugação a  $40.000$  rpm por  $20$  horas a  $4^\circ\text{C}$ . A camada superior contendo LDL ( $d=1,0006-1,063$  g/ml) era removida e imediatamente dialisada. As frações aspiradas (aproximadamente  $1,5$  ml) de VLDL e LDL foram usadas para determinar o conteúdo de colesterol total e expresso em mg/dl de plasma.

### 3.2.5- Diálise de LDL

Para remover os sais e o EDTA, a LDL era extensivamente dialisada contra o tampão fosfato salino  $0,02$  M, pH  $7,4$  (contendo NaCl  $0,9\%$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $0,3\%$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   $0,2\%$  e NaOH  $0,038\%$ ), a  $4^\circ\text{C}$  por  $24$  horas, com agitação suave, utilizando  $2$  litros de tampão para cada  $6$  “sacolinhas” de membrana de diálise de  $10.000$  daltons, contendo um volume de  $1,5$  a  $2,0$  ml de LDL.

### 3.2.6- Determinação da Composição Química da LDL

A LDL isolada e dialisada foi caracterizada pelo conteúdo de colesterol e triacilgliceróis, como foi descrito, anteriormente, para a quantificação no plasma. Também foram determinados fosfolipídeos e proteínas. Os fosfolipídeos foram determinados pelo método enzimático usando o kit enzimático (Doles), onde a hidrólise foi associada a má reação de cor, com leitura a  $510$  nm.

A concentração de proteína na LDL foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), usando-se albumina sérica de bovino como padrão.

### 3.2.7- Peroxidação Lipídica

A peroxidação de LDL foi realizada em tampão fosfato, pH 7,4 em presença de sulfato de cobre (5 mM) 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. Consistiu em colocar em um tubo de ensaio, 150 µ de proteína de LDL, completando para um volume de 500 µ, na presença de 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% e 0,3 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 50%. Após aquecimento a 100°C por 30 min, o teor das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico foi determinado pelo método de Bueg et al. (1978), com leitura a 532 nm de absorbância realizada mediante incubação de 100 µ de proteína de LDL/mL em tampão fosfato pH 7,4.

### 3.2.8- MEdida do Colesterol Plasmático e Tecidual

O colesterol total plasmático foi medido através de kits enzimáticos e resultados lidos em espectrofotômetro em 500 nm.

O colesterol plasmático foi medido através de kits enzimáticos já citados anteriormente.

O teor de colesterol tecidual foi medido pelo método de Naito e David, (1981). Os fragmentos de aorta foram secos e homogeneizados a 4°C em 5 ml de 0.13M TRIS HCl (pH 7.4); 0.01 NaNO<sub>3</sub>. Os lípides totais foram extraídos do homogeneizado em 10 vol. de clorofórmio metanol (2:1 vol/vol) contendo 0.001% de hidroxitolueno butilado, como antioxidante. Uma segunda extração foi feita de acordo com o procedimento de Folch e Stanley; (1956).

### 3.2.9- Função Endotelial

Segmentos de aorta torácica com 5mm de comprimento, foram suspensas em solução de Krebs Henseleit com a seguinte composição (mmol/l): NaCl, 113; KCl, 4,74; CaCl<sub>2</sub>, 1,9; NaHCO<sub>3</sub>, 25,0; MgSO<sub>4</sub>, 0,44; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,18; EDTA, 0,03; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, 11,0, e

aerado continuamente com 95% de O<sub>2</sub> a pH 7,4 Ribeiro Jorge et al, (1994), através de dois clips de aço, sendo um fixo na base da cuba e outro conectado a um transdutor de força e registrador de eventos fisiológicos (Registrador Narcotrace 40). Em alguns fragmentos o endotélio foi retirado mecanicamente, atritando o lúmen do vaso com pequeno fórceps. Esse procedimento foi utilizado para efetuar a comparação do relaxamento entre os segmentos com e sem endotélio.

A tensão basal ótima foi estabelecida, submetendo-se os fragmentos a diferentes tensões mecânicas e contraídos a mesma dose de noradrenalina (10<sup>-7</sup>M). A tensão basal ótima foi aquela que apresentou melhor resultado comprimento/tensão, assim como, melhor relaxamento a acetilcolina.

Os espécimes foram deixados em equilíbrio na solução de Krebs pelo período de 60 minutos, trocando-se a solução a cada 20 minutos. Todos os anéis com ou sem endotélio foram contraídos pela noradrenalina (10<sup>-7</sup>M). Depois que a contração alcançou um plateau, a acetilcolina foi acrescentada de forma cumulativa (10<sup>-8,0</sup> a 10<sup>-5,0</sup> M) para obter-se a curva de concentração-efeito, após, o fragmento ter sido lavado diversas vezes por solução mova fresca de Krebs. Depois de um período de 30 minutos os anéis de aorta foram contraídos com noradrenalina NE (10<sup>-7,0</sup>M) e outras curvas de concentração-efeito obtidas com nitroprussiato para verificar a integridade da musculatura lisa da camada média arterial.

### 3.2.10- Estatística

As curvas de relaxamento foram comparadas por análise de co-variância.

Os valores do colesterol plasmático e tecidual foram expressos em média e desvio padrão e submetidos ao teste t de Student para valores não pareados.

As médias dos valores controles e do grupo experimentação foram comparadas pelo Teste de Student-Neuman-Keuls.

Os valores do colesterol plasmático e tecidual e a magnitude da reversão da disfunção endotelial foram correlacionadas por análise variância e o Teste de Tukey. Valores significativos foram aqueles com  $p < 0.05$ .

Os dados foram analisados no setor de estatística da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, sendo utilizados Software específico: The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 8.02.) SAS Institute Inc, 1999-2001, Cary, NC, USA. E Microcal Origin, versão 5.0. Microcal Software Inc, 1991-1997, Northampton, MA, USA.

## **4- RESULTADOS**

Do início ao final do experimento os animais dos quatro grupos apresentaram pesos corporais similares, não havendo diferenças significativas entre os mesmos. Os animais do grupo não hipercolesterolêmico não demonstraram nenhum efeito adverso aparente, sendo que o aspecto saudável de todos os animais indicou que, tanto o estado sanitário, como o manejo foram adequados e eficientes e que o excesso de lipídeos em sua alimentação não alterou, aparentemente, a saúde dos animais.

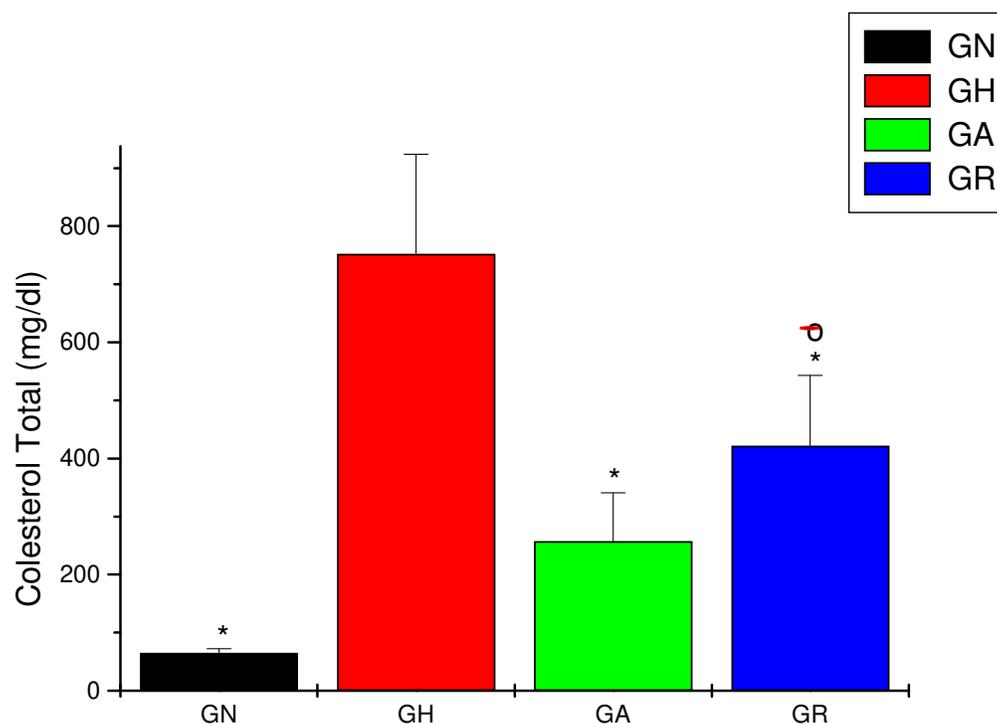
#### **4.1- Colesterol Plasmático**

No gráfico 1 estão demonstrados as médias e os desvios padrões da concentração do colesterol plasmático total nos respectivos grupos. Da observação do mesmo podemos analisar as diferenças entre os GN, GH e tratados GA e GR.

O colesterol plasmático do GH, foi de  $752,44 \pm 7,06$ , aumentando 11,58 vezes em relação ao valor do grupo GN  $64,93 \pm 7,06$ .

Nos grupos tratados (GA e GR), houve significativo decréscimo nos valores do colesterol plasmático  $256,05 \pm 83,85$  (GA) e  $421,73 \pm 121,18$  GR), em relação ao (GH)  $752,44 \pm 7,06$ , sendo que os GA e GR, possuíram níveis 2,92 e 1,78 vezes menor que o GH, em porcentagem um decréscimo de 63,88% para o GA e 44% para o GR.

Entre os grupos GA e GR, houve significância estatística nos níveis de colesterol total ( $256,05 \pm 83,85$ mg/dl e  $421,73 \pm 121,18$  mg/dl), em porcentagem a diferença foi de 19,88%.



**Gráfico 1-** Colesterol total Plasmático. Valores expressos em média e desvio padrão dos (GN), (GH) e tratados (GA e GR). \* $p < 0,05$  para GH e °  $p < 0,05$ .

#### 4.2- Triglicérides

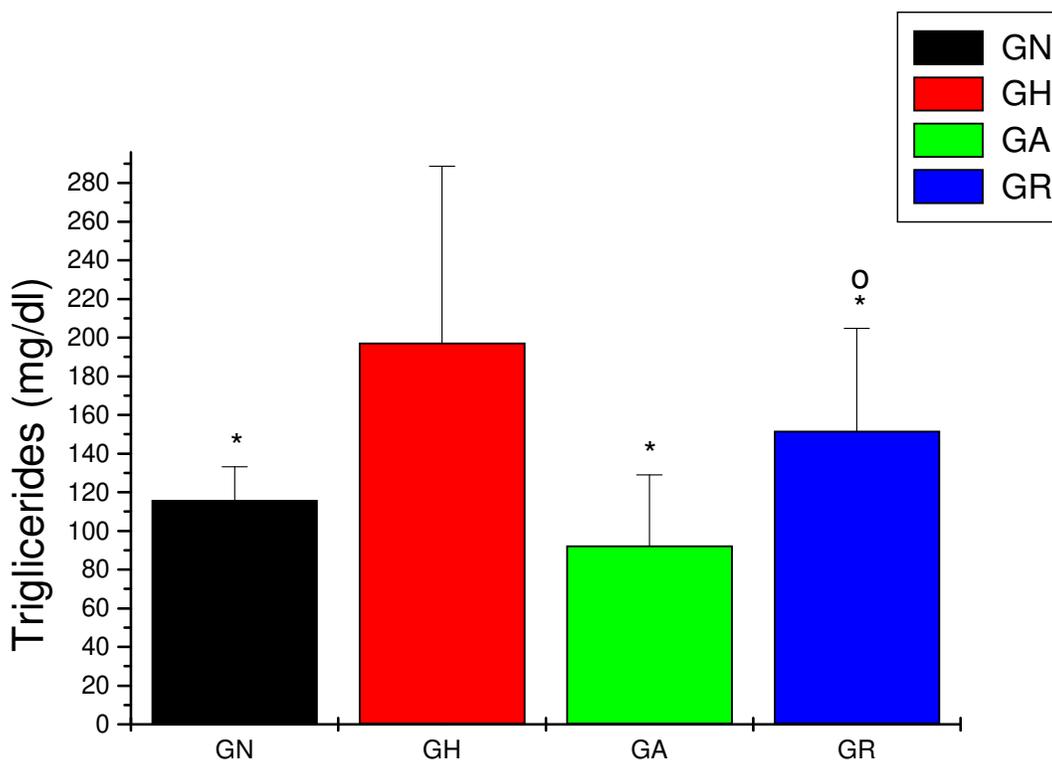
O Gráfico 2 representa as concentrações plasmáticas de triglicérides em mg/dl nos diversos grupos experimentais. Da observação do mesmo podemos avaliar a diferença entre os grupos, através da análise estatística.

O aumento de triglicérides no grupo GH ( $197,39 \pm 91,25$ ) % em relação ao grupo GN ( $116,03 \pm 36,57$ ), foi de 1,18 vezes maior.

Ao examinarmos o grupo (GH) em relação aos grupos tratados observamos que os grupos tratados apresentaram uma redução significativa, sendo os grupos tratados GA ( $92,43 \pm 36,57$ ) e o GR ( $151,73 \pm 53,0$ ) apresentavam redução significativa em relação ao

grupo GH, correspondido em porcentagem uma redução de 53,17% para o GA e 23,13% para o GR.

Ao analisarmos os grupos tratados podemos concluir que o GA  $92,43 \pm 36,57$  teve uma diminuição com maior significância entre todos os grupos e que apresentou uma redução de 1,64 vezes em relação ao GR ( $151,73 \pm 53,0$ ).



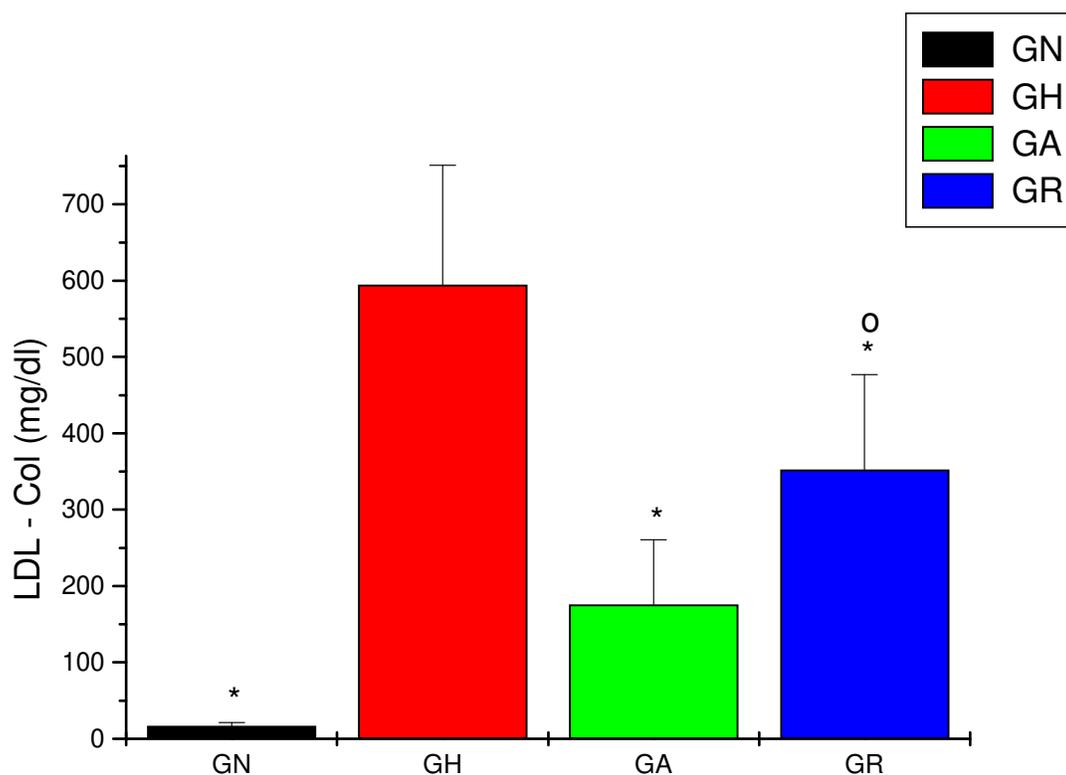
**Gráfico 2-** Triglicéride Plasmático (mg/dl). Valores expressos em média e Desvio Padrão.

Dos Grupos: Não hipercolesterolêmico (GN), Hipercolesterolêmico (GH) e Tratados (GA e GR). \* $p < 0,05$  para GH e <sup>o</sup>  $p < 0,05$ .

### 4.3- Lipoproteínas Plasmáticas

#### 4.3.1- LDL-Colesterol

Os grupos tratados apresentaram significativa diminuição dos níveis séricos de LDL-c em relação ao GH: 594,36 ±156,45, sendo esta diferença de 3,37 e 1,68 vezes menores, para o GA e GR (175,97 ±84,84 e 352,53 ±124,32) respectivamente.

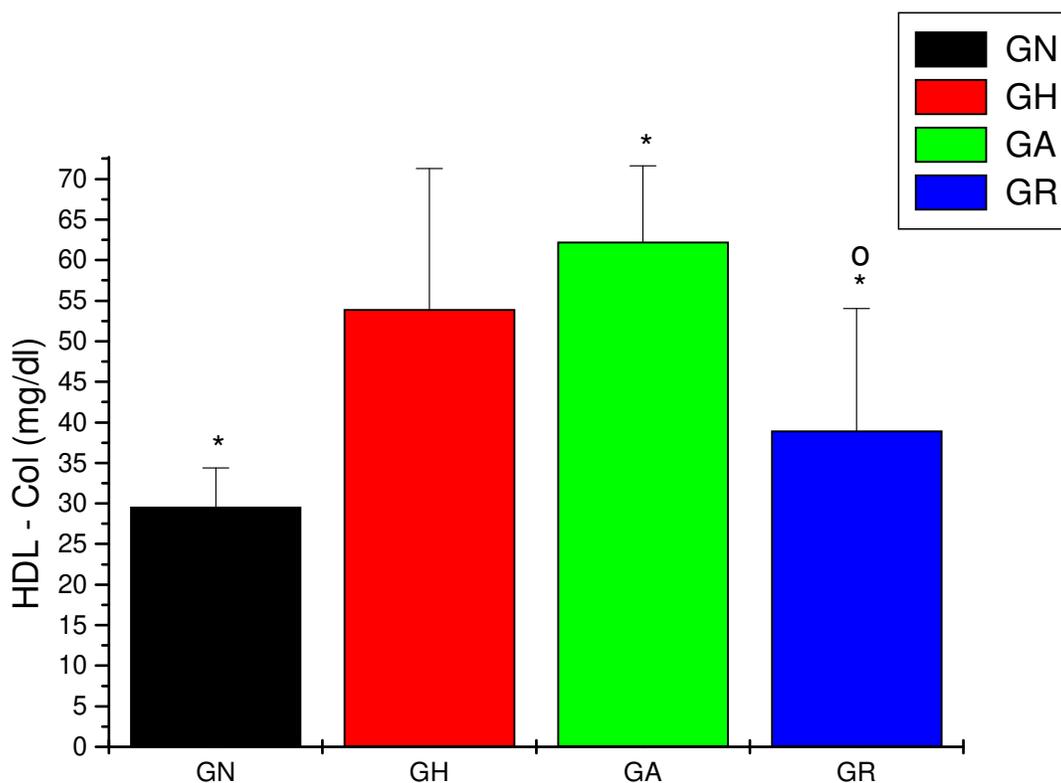


**Gráfico 3-** LDL Colesterol Plasmático (mg/dl). Valores expressos em média e desvio padrão. Dos Grupos: GN, GH e Tratados (GA e GR). \*p< 0,05 para GH e ° p< 0,05.

#### 4.3.2- HDL-Colesterol

Ao efetuarmos a análise dos níveis de HDL plasmático, podemos observar que ocorreu aumento significativo entre o grupo GH ( $53,97 \pm 17,38$ ), comparados com o grupo GN ( $29,56 \pm 4,84$ ). Ao se comparar o grupo GH ( $53,97 \pm 17,38$ ) em relação ao Grupo GA ( $62,27 \pm 9,36$ ) podemos concluir que houve diferença estatisticamente significativa entre os mesmos.

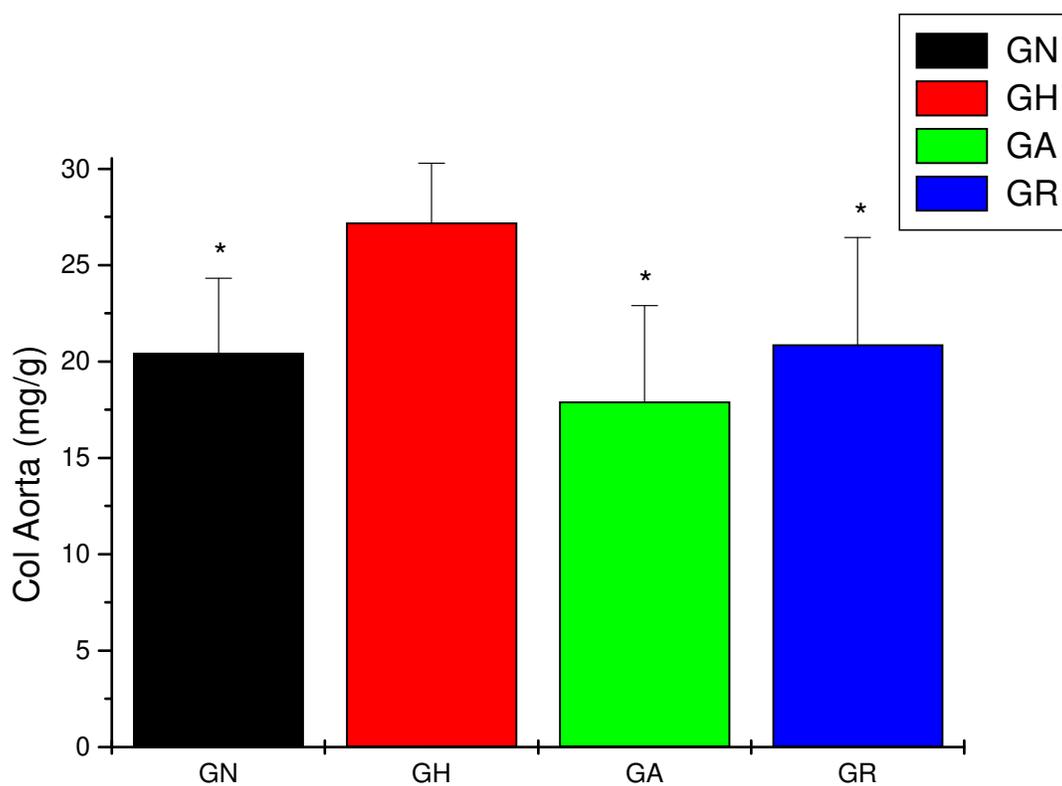
Em relação aos grupos GA e GR observamos que houve diferença significativa entre o GH ( $53,97 \pm 17,38$ ) e os grupos tratados GA ( $62,27 \pm 9,36$ ) e GR ( $39,01 \pm 15,02$ ).



**Gráfico 4-** HDL Colesterol Plasmático (mg/dl). Valores expressos em média e desvio padrão dos grupos: (GN), (GH) e tratados (GA e GR). \* $p < 0,05$  para GH e °  $p < 0,05$ .

### 4.3.3- Colesterol Tecidual

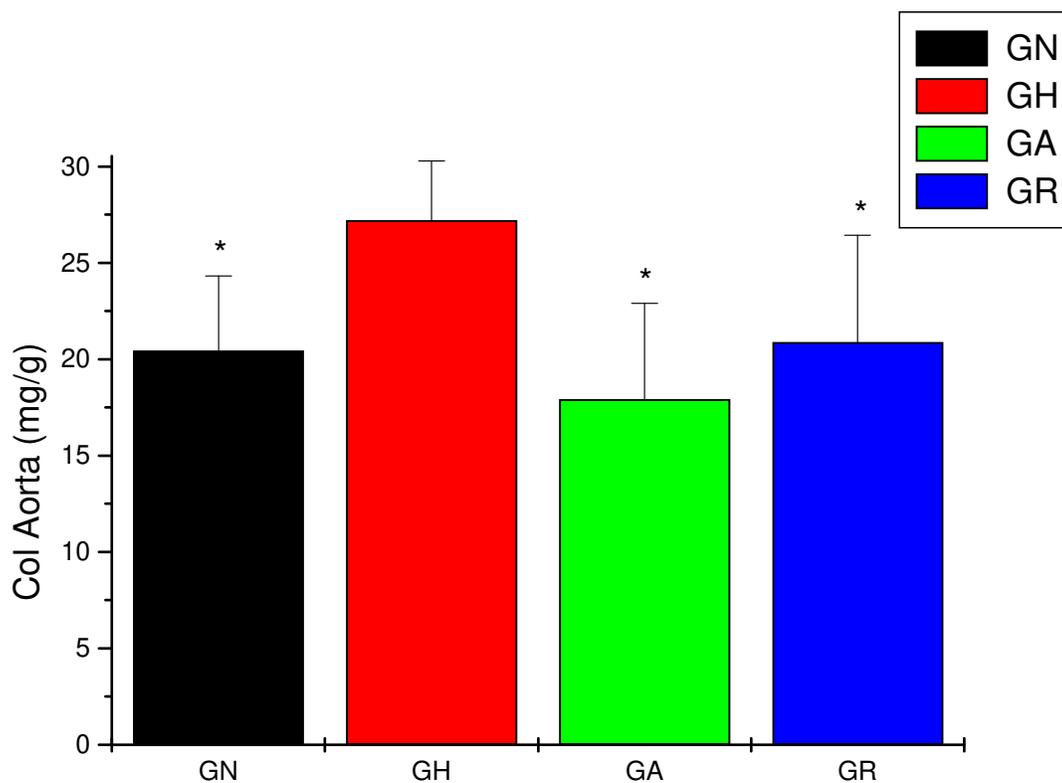
O grupo GH ( $27,2 \pm 4,97$ ) apresentou concentração significativamente maior, quando comparado com o grupo GN ( $20,46 \pm 3,87$ ) e em relação aos grupos tratados GA e GR ( $17,93 \pm 4,97$  e  $20,88 \pm 5,55$ ). Os grupos tratados reduziram o colesterol tecidual estatisticamente significativos em relação ao GH.



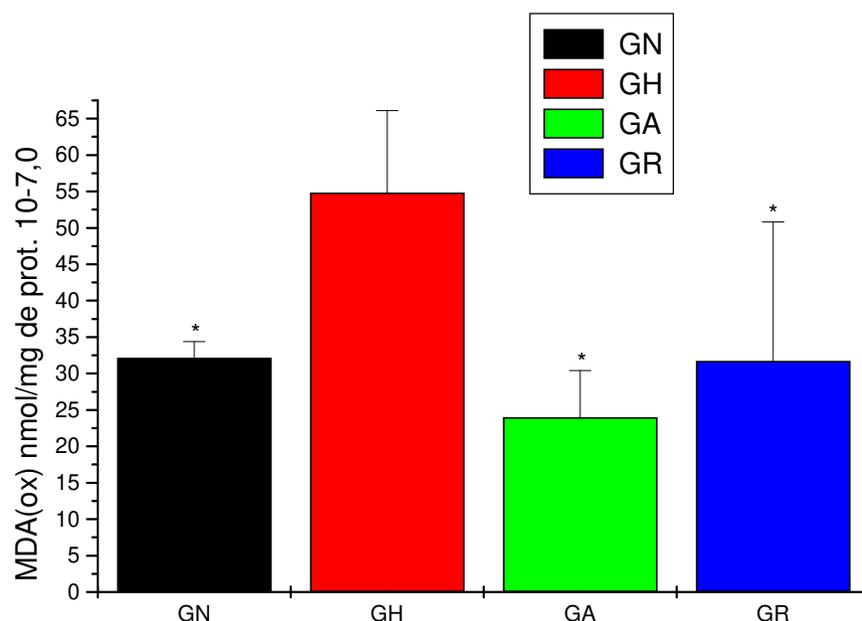
**Gráfico 5-** Colesterol da Aorta (mg/g). Valores expressos em média e desvio padrão dos grupos GN, GH e tratados GA e GR. \* $p < 0,05$  para GH.

#### 4.3.4- Peroxidação Lipídica

O teor de MDA nas partículas de LDL oxidadas e na parede da aorta encontram-se nos gráficos 6 e 7. Este teor de MDA foi significativamente reduzido nos grupos tratados GA e GR ( $23,99 \pm 6,4$  e  $31,72 \pm 19,1$ ), respectivamente, quando comparado com o grupo GH ( $54,84 \pm 11,25$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos tratados GA e GR ( $23,99 \pm 6,4$  e  $31,72 \pm 19$ ).



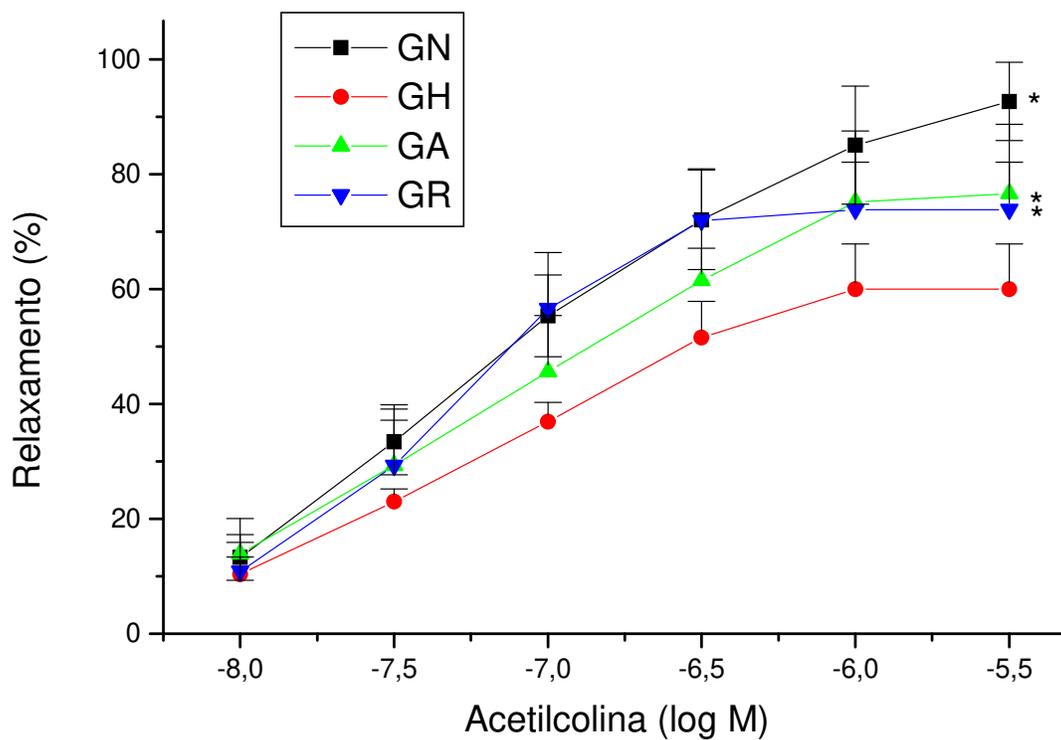
**Gráfico 6-** Peroxidação Lipídica na parede da aorta (mg/g de tecido  $\times 10^{-7,0}$ ). Valores expressos em média e desvio padrão dos grupos: GN, GH e tratados GA e GR. \* $p < 0,05$  para GH.



**Gráfico 7-** Peroxidação Lipídica nas partículas de LDL-oxidado (nMol/mg de proteína x 10<sup>-7,0</sup>). Valores expressos em média e desvio padrão dos grupos: GN, GH e tratados GA e GR. \*p< 0,05 para GH.

#### 4.3.5- Função Endotelial

O gráfico 8 expressa a porcentagem de relaxamento dependente do endotélio em anéis da aorta dos quatro grupos. Quando observamos os coelhos GH notamos que o relaxamento foi significativamente menor que nos animais do grupo GN. Ambas as estatinas grupos GA e GR melhoraram o relaxamento em relação ao GH, significativamente. Entre os grupos GA e GR não houve significância estatística, ambas reduzindo a disfunção endotelial de modo similar.



**Gráfico 8-** Relaxamento Dependente do Endotélio de anéis aórticos pré contraídos com Noradrenalina (NE) em resposta à Acetilcolina (ACH). Relaxamento expresso em porcentagem na contração induzida pela NE ( $10^{-7,0}$ ). Os pontos representam a média e o desvio padrão dos grupos: GN, GH e tratados GA e GR. \* $p < 0,05$  para GH.

**Tabela 1-** Valores médios e desvio padrão do colesterol total e frações, colesterol da aorta, malonodialdeído da aorta e LDL-oxidada.

	<b>GN</b>	<b>GH</b>	<b>GA</b>	<b>GR</b>
<b>CT</b>	64,93 ±7,06	752,44 ±171,76	256,95 ±83,85*	421,73 ±121,18*
<b>TG</b>	116,03 ±17,28	197,39 ±91,25	92,43 ±36,57*	151,73 ±53,0*
<b>LDL</b>	16,81 ±4,45	594,36 ±156,45	175,97 ±84,94	352,53 ±124,32*
<b>HDL</b>	29,56 ±4,84	53,94 ±17,38	62,27 ±9,36*	39,01 ±15,02
<b>COL. AORTA</b>	20,46 ±3,87	27,20 ±3,10	17,93 ±4,97	20,88 ±5,55
<b>MDA</b>	5,28 ±0,54	8,94 ±1,31	5,04 ±2,33*	6,76 ±1,97*
<b>MDA-OX</b>	32,14 ±2,23	54,84 ±11,25	23,99 ±6,40*	31,72 ±19,10*
<b>RMAX</b>	92,69±6,8	60,01±7,85	76,64±12,03*	73,86 ±8,26*

## **5- DISCUSSÃO**

Evidência epidemiológicas iniciais a partir do trabalho multicêntrico: Ensino de Intervenções dos Múltiplos Fatores de Risco (MRFIT), com mais de 360.000 homens, sugerem que o colesterol total (CT) estaria relacionado com maior índice de mortalidade por doença aterosclerótica LA Rosa J.C et al; (1990); Martin M.J. et al; (1986). Ultimamente, dados epidemiológicos adicionais confirmam que concentrações CT estão diretamente relacionados com a mortalidade por doença arterial coronariana (DAC), Verschuren W.M.M. et al; (1995). Resultados de ensaios clínicos de curta e longa duração, sobre níveis de colesterol, têm confirmado essa correlação Levine GN et al, (1995). Esses trabalhos demonstram que eventos isquêmicos coronarianos poderiam ser evitados e a mortalidade diminuiria com reduções eficazes de colesterol aterogênico, LDL-c.

Os medicamentos redutores dos níveis de colesterol apresentam diferentes mecanismos de ação sobre o metabolismo das lipoproteínas plasmáticas. Assim, os inibidores da HMG-CoA redutase diminuem as concentrações intracelulares do colesterol hepático com o conseqüente aumento dos receptores específicos para a captura da LDL, aumentando a remoção plasmática de colesterol e LDL colesterol.

No presente estudo foi utilizado dois medicamentos inibidores da HMG-CoA redutase a rosuvastatina, que foi introduzida no Brasil em final de 2004, e a atorvastatina uma outra estatina já estudada anteriormente. As doses destes medicamentos provém ampla segurança, se considerarmos a dose mínima necessária para produzir toxicidade em uma variedade de tecidos (Evan et al. 2003, Dinko Susic et al, 2003) – As doses de 10mg/dia para a atorvastatina e de 10mg/dia para a rosuvastatina, pois estas são eficazes e preconizadas para o uso em humanos.

Com base nestes dados a dose de rosuvastatina utilizada foi, inicialmente, de 10mg/dia/animal, mas houveram alguns imprevistos que nos forçaram a baixar esta dose, chegando a 2,5mg/dia para cada animal.

Observou-se que quando os animais estavam recebendo a dose mínima eficaz na redução de colesterol plasmático padronizada pela literatura de 10mg/dia para o homem, os mesmos começaram a rejeitar, tanto a ingestão de ração quanto a de água, tendo como conseqüência o óbito de alguns animais. Para alguns destes não foi possível definir o real

fator causa mortis. No entanto, em outros constatou-se aumento muito grande no tempo de coagulação comprovado por exames laboratoriais. Em alguns animais também foram dosadas as enzimas hepáticas AST e ALT, assim como uréia e creatinina, onde se observaram pequenas alterações. Não foi realizado a dosagem toxicológica para saber se os animais estavam intoxicados pelo medicamento. Tendo em vista esse imprevisto a dose foi diminuída até que os animais sobrevivessem, chegando-se na dosagem de 2,5 mg/dia. Revisando a literatura, não encontramos relatos da utilização de rosuvastatina em modelos de hipercolesterolemia tendo o coelho como animal de experimentação, o que dificultou, de início, estabelecer a dose ideal.

A dose de atorvastatina foi aquela já utilizada em estudo anterior realizado no laboratório de Estudos em Endotélio, Lípidos e Aterosclerose/FCM/UNICAMP Almeida e Ozaki (2001), visto que os animais suportaram bem a dosagem de 10mg/dia. Embora esta dose de atorvastatina seja aquela utilizada em humanos e se tem mostrado eficaz em reduzir o colesterol plasmático, ela deve ser muito alta para o coelho, em vista das diferenças entre espécies, principalmente o peso. No entanto, a experiência com outras estatinas, além da atorvastatina, tem demonstrado que o coelho necessita de doses nesses níveis para se conseguir a mesma redução do colesterol plasmático que em humanos (Ribeiro Jorge et al, 2005). Diferenças devem existir na metabolização de fármacos que justificam estas altas doses não determinarem toxicidade ou até mesmo serem letais para os animais.

No presente estudo, pode-se observar que a hipercolesterolemia induzida em coelhos pela dieta enriquecida com 0,5% de colesterol provocou um aumento do colesterol plasmático obtido para o GH. Achados similares podem ser observados em outros estudos Tomikawa et al. (1982); Roth et al.(1983); Mantha et al. (1993); Nensester et al. (1994), o que demonstra ser o modelo adequado para este tipo de estudo.

Ao observar o GH e os Grupos Tratados GA e GR, se nota significativo decréscimo nos valores do colesterol plasmático dos Grupos Tratados em relação ao GH. Houve redução nos níveis de colesterol de 2,92 e 1,78 vezes menor que o GH, sendo estes valores estatisticamente significantes.

Ao se transformar estes valores em porcentagem, obtém-se uma redução de 65,88% para o GA, o que já foi demonstrado por Nawrocki J.W et al. (1995) ao encontrar redução de colesterol total com atorvastatina de até 61% em humanos, dependendo da dose utilizada. Para dose de 10mg/dia de atorvastatina, como foi utilizada neste experimento, a literatura relata queda de 26% de CT Heinonen T.M., (1996) o que demonstra ser esta dose alta para coelho. Em porcentagem o GR obteve uma redução de 44% em relação ao grupo hipercolesterolêmico, Segundo Olsson et al (2003), Blasseto J. (2003), relataram em seus trabalhos em humanos que a rosuvastatina pode chegar a reduzir o colesterol em 52% na dose de 10mg/dia, com redução de até 63% na dose de 40mg/dia.

Em relação a potência dos medicamentos, a rosuvastatina possui maior eficácia em reduzir CT, LDL-c e em aumentar a HDL em comparação com a atorvastatina. Jamas, P H, et al, (2003) Mickenney et al, (2003) em estudos realizados em humanos, onde se comparou a rosuvastatina com a atorvastatina nas doses de 10, 20, 40mg/dia para a rosuvastatina, e 10, 20, 40 e 80mg/dia de atorvastatina, que os medicamentos possuem realmente diferença de potência, pois a redução de CT 36.8, 32.8, 37.6% para a rosuvastatina e 21.1, 31.8, 35.8, 38.9% para atorvastatina, LDL-c foi de 45.8, 51.4, 55% para o grupo que tomou a rosuvastatina e 40.2%, 42.6, 47.8, 51.1% para atorvastatina, nas doses referidas, HDL 7.7, 9.5, 9.6% para a rosuvastatina e 5.1, 4.8, 4.4, 2,1% para a atorvastatina, respectivamente, sendo assim, neste trabalho os autores demonstraram que a rosuvastatina é 2 vezes mais potente que a atorvastatina.

Tomando como base estes relatos, o presente estudo confirma a maior potência da rosuvastatina, uma vez que embora tenha determinado menor redução nos níveis de CT, LDLc e aumento de HDL que a atorvastatina, isto ocorreu em dose quatro vezes menor (gráfico 1). Mesmo assim, os valores em porcentagem se equivaleram aqueles vistos nos estudos realizados no homem.

Ao se efetuar a análise comparativa entre os grupos, a partir das concentrações plasmáticas de triglicérides expressas no gráfico 2, concluímos que o GH apresenta aumento de 58,78% maior, em relação ao GN. Já em relação aos grupos tratados observa-se que estes apresentaram redução significativa, sendo que o GA apresentou uma maior diminuição, 51,65 em relação ao GH.

Os relatos existentes na literatura referem que os inibidores da HMG-CoA redutase não são bons redutores de triglicérides, como reportado por Jones et al (1991) e por Dart et al (1997). Em nosso trabalho, quando comparamos as duas estatinas, observamos uma diferença entre elas, pois o GA apresentou diminuição com maior significância entre todos os grupos, o que significa em porcentagem, uma diminuição de 53,17% para o GA e 23,13% para o GR, comparados com o GH. Hunninghake et al. (2004), relata em seu trabalho, elaborado em humanos em estudo multicêntrico para avaliação da eficácia da rosuvastatina em reduzir os triglicérides, uma redução de 18 a 40%, dependendo da dose utilizada (5, 10, 15, 20, 40 e 80mg/dia). Como já referido anteriormente, mesmo as estatinas não sendo bons redutores de triglicérides, em doses maiores consegue-se maiores reduções. No presente trabalho os índices de reduções maiores do que os encontrados na literatura para humanos, confirmam esta idéia, uma vez que as doses utilizadas para ambas as estatinas devem ter sido altas.

A hipercolesterolemia induzida pela dieta provocou um aumento de 35,35 e 1,82 vezes de LDL-c e HDL-c respectivamente no GH, quando comparados com o GN, acompanhando o aumento de CT. Achados similares foram observados nos trabalhos de Kushwaha et al. (1978) e Tomikawa et al. (1982).

Os grupos tratados apresentaram significativa diminuição dos níveis séricos de LDL-c em relação ao GH conforme pode ser observado no gráfico 3. Esta diferença foi de 3,37 e 1,68 vezes para o GA 70,4% e 40,68% para o GR. Na literatura o relato de queda no LDL-c fica em torno de 54% para a atorvastatina e 57,9% para a rosuvastatina Peter Jonnes., (1998).

Ao se analisar o gráfico 3 em relação aos grupos tratados observa-se que o GA apresenta uma redução de LDL significativa em relação ao GR, sendo de 29,71% a diferença entre elas. Este resultado, também, deve estar relacionado com a diferença das doses dos respectivos medicamentos, pois a dose de rosuvastatina foi quatro vezes menor que a da atorvastatina.

As altas concentrações de LDL e o maior tempo de permanência na circulação, permite a maior passagem das LDL para as células endoteliais, onde podem sofrer maior oxidação pelos radicais livres que se formam normalmente nestes locais, como

consequência de reações metabólicas, como por exemplo, a degradação do óxido nítrico (Chin et al. (1992). Um grande número de radicais livres (hidróxido, peróxido, superóxido) estão envolvidos no processo da modificação da LDL, sendo sua oxidação dependente, também, de suas características físicas e composições químicas (Croft et al.; 1995).

A oxidação da LDL ocorre, principalmente, no compartimento extracelular e em microambientes protegidos dos antioxidantes naturais presentes no plasma. Sendo a LDL-oxidada citotóxica, provoca a lesão das células endoteliais e, a partir daí, desencadeia-se agregação plaquetária, liberação de fatores de crescimento e proliferação celular, além de promover o recrutamento e retenção de macrófagos na íntima arterial, acentuando a disfunção endotelial (Witzum et al.; 2001). Portanto, a utilização de um redutor da oxidação das LDL é de fundamental importância para a diminuição da lesão das células endoteliais e conseqüentemente, redução dos eventos patológicos relacionados a esta causa, principalmente a aterosclerose (Holvoet et al.;1998; Tamaga et al.; 2002).

Ao examinar e comparar a relação existente entre as concentrações de colesterol da aorta observados no gráfico 4, podemos notar que o GH teve concentração significadamente maior, quando comparado com o GN e em relação ao Grupos GA e GR. Ao efetuar a comparação entre os grupos tratados GA e GR podemos observar que o teor de MDA nas partículas de LDL-ox na parede aórtica (Gráfico 5 e 6), e das LDL-oxidadas foi significadamente reduzida nos grupos tratados (GA e GR) respectivamente, quando comparado com GH. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados (GA e GR). Foi demonstrado, então, que os medicamentos possuem um efeito redutor semelhante na oxidação das LDL e da concentração de colesterol na parede aórtica, como já referido anteriormente.

Pode-se notar, também, que a concentração de LDL-ox nos grupos tratados (GA e GR) é estatisticamente não significante em relação a concentração do GN. Isto demonstra o grande poder de redução da peroxidação lipídica destes medicamentos Wassmann et al. (2002), relata que este efeito das estatinas está relacionado com a diminuição da quantidade da expressão da NAD(P)H oxidase, que são produtoras de peróxido.

Em relação ao HDL plasmático, pode-se observar no gráfico 4 que ocorreu um aumento significativo entre o GH comparados com o GN. Ao comparar o GH, observando este em relação ao GA houve um aumento de 17,29%, em relação ao GR. Este teve uma redução de 27,68% em comparação ao GH. Estes valores foram significativos estatisticamente.

Em relação aos grupos tratados GA e GR nota-se uma diferença significativa entre os mesmos, sendo o valor de 37,30%, devendo este resultado se relacionar à diferença entre as doses dos medicamentos.

Experimentalmente, o processo de aterogênese pode ser percebido em apenas uma semana de exposição a uma dieta hipercolesterolêmica, com monócitos aderidos à superfície endotelial, subseqüentemente, atingindo a íntima vascular (Ross R. 1986). De forma rápida, a atividade inflamatória se torna nítida, com aumento de expressão de moléculas de adesão e migração celular, favorecendo a seguir a diferenciação de monócitos em macrófagos, capacitando estas células à expressão de receptores para LDL oxidada que levam à formação das células espumosas, uma etapa inicial da aterogênese Cybulsky Mi, Gimbrone Jr MA. (1991), Butcher EC e Picker LJ. (1996). Ao lado destas observações histológicas, logo foi demonstrado que a hipercolesterolemia associava-se à disfunção endotelial, verificada pela resposta dilatadora atenuada à acetilcolina em experimentos *in vivo* e *in vitro* (Girerd XJ et al. 1990; Cooke JP. et al.;1991).

Subseqüentemente, demonstrou-se que a aderência de monócitos ao endotélio era reduzida pelo estímulo à maior produção de NO por meio da L-arginina. Por outro lado, mesmo em animais normocolesterolêmicos, tratados com um inibidor da síntese de NO, a nitroarginina, observou-se o inverso, ou seja, grande aumento na adesão de monócitos ao endotélio (Tsao P. et al.; 1994).

Após o surgimento das estatinas, essas proporcionaram sólidas evidência de benefícios na função endotelial em estudos experimentais e humanos. Durante muitos anos, atribuíram-se os benefícios na função endotelial à sua ação hipocolesterolêmica. Em 1997, Ribeiro Jorge et al, demonstraram em coelhos hipercolesterolêmicos tratados com pravastatina e sinvastatina, que ocorreu melhora na disfunção endotelial nos animais

tratados com pravastatina a partir do 4º dia de administração do medicamento, com redução da peroxidação lipídica, embora sem grandes alterações nos níveis do colesterol plasmático, invocando uma ação rápida da reversão da disfunção endotelial com eventual aplicação clínica nas síndromes coronarianas agudas. Em 2004 Almeida et al, concluíram que a fluvastatina provoca melhoras significativas na disfunção endotelial em coelhos hipercolesterolêmicos após 30 dias de tratamento com o medicamento, sendo que esta melhora possui uma íntima relação entre os valores de colesterol sérico e tecidual. Assim, nos últimos anos, considerável atenção tem sido dada aos chamados efeitos peliotrópicos das estatinas, (Ribeiro Jorge et al.; 1994).

Chegando ao descobrimento do importante papel da via de sinalização celular mediada pelas proteínas isopreniladas, particularmente pelo geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP), com implicações diretas em várias propriedades da célula endotelial, incluindo a própria inibição da eNOS, se observou que, com a inibição da conversão da HMG-CoA em mevalonato, produzido pelas estatinas, produz-se a expressão de GGPP e do sistema Rho-dependente, determinando maior expressão de fator tecidual Masato E. et al. (2002), de fatores de proliferação celular Eberlein M. et al. (2001), aumento da expressão da COX-2 e, como consequência, produzindo maior síntese de prostaciclina (Degraeve F. et al.; 2001). Assim, as estatinas não são apenas potentes inibidores da síntese do colesterol. O seu benefício clínico na prevenção primária e secundária da doença aterosclerótica parece estender-se além do esperado pela simples alteração do perfil lipídico, sugerindo que as evidências experimentais e clínicas destes efeitos pleiotrópicos possam ser importantes na estabilização da placa e redução do estresse oxidativo, inflamação e restauração de várias propriedades das células endoteliais.

Quando se analisa a função endotelial, através do relaxamento dos anéis aórtico gráfico 8, nota-se que o GH apresenta redução significativamente menor que os animais do GN. Esta observação é confirmada por Torak et al. (2002), onde os autores induziram hipercolesteolemia em ratos geneticamente modificados. No estudo em discussão, ambas as estatinas melhoraram o relaxamento até próximo do normal, quase que indistintamente, como observado no gráfico 8. Quando efetua-se essa análise em porcentagem, obtém-se que o GH apresentou uma redução no relaxamento dependente do endotélio de 35,25% em

relação ao grupo não hipercolesterolêmico. Isto demonstra que a hipercolesterolemia provoca uma redução significativa na função endotelial.

Quando se compara os grupos tratados (GA e GR) respectivamente, nota-se significativa melhora na disfunção endotelial em relação ao GN, podendo ser observados no gráfico 8, sendo estes valores em porcentagem de 33,09% para o GA e 22,37% para o GR. Este fato deve estar relacionado com a redução dos níveis de CT e, principalmente, de LDL-c, como referido também, por AIKAWA et al. (2002). Segundo os autores a redução lipídica provoca diminuição no estresse oxidativo revertendo a disfunção endotelial induzida pela dieta hiperlipídica em coelhos hipercolesterolêmicos.

Ao observar os resultados dos grupos tratados (GA e GR) em relação ao grupo não hipercolesterolêmico GN apresentados no gráfico 8, observa-se uma redução entre os mesmos pois para o GA se tem uma redução de 13,82% e de 20,75% para o GR em relação a função endotelial. Este fato indica que mesmo com a utilização dos medicamentos não se consegue atingir uma resposta dependente do endotélio equivalente ao GN. Este fato pode estar relacionado, com o valor de CT, LDL e MDA-ox que ainda se apresentam altos, perante os valores apresentados pelo grupo não hipercolesterolêmico. Já os resultados observados para o colesterol tecidual e peroxidação lipídica aproximam-se muito ou até mesmos, são menores que os do GN. Pode-se deduzir então que a reversão na disfunção endotelial se deve mais às modificações determinadas no colesterol tecidual e na peroxidação das LDL-c do que na própria redução do colesterol sérico.

Entre os dois grupos tratados não há diferença estatisticamente significativa na redução da disfunção endotelial consequente à hipercolesterolemia induzida por dieta em coelhos.

Em relação a melhora da função endotelial, observa-se, pelos resultados encontrados, que a rosuvastatina na dose utilizada neste trabalho, melhorou este parâmetro em um nível semelhante as outras estatinas disponíveis no mercado, segundo trabalhos revisados na literatura e do próprio serviço onde se realizou o estudo Blumenthal RS (2001), Ribeiro Jorge et al. (1994), Almeida EA e Ozaki MR (2001), Ribeiro Jorge, et al. (2004) Ribeiro Jorge et al.(2005).

## **6- CONCLUSÃO**

1. A atorvastatina e a rosuvastatina reduzem a susceptibilidade da LDL de sofrer peroxidação lipídica “in vitro”, diminuíram o colesterol tecidual e melhoraram a disfunção endotelial de forma semelhante;
2. A atorvastatina apresentou melhor efeito na redução dos níveis plasmáticos de colesterol total, triglicérides, LDL e aumento da HDL em relação a rosuvastatina nas doses utilizadas neste experimento.

## **7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Aikawa M, Sugiyama S, Hill CC, et al. Lipid lowering reduces oxidative stress and endothelial cell activation in rabbit atheroma. *Circulation* 2002; 106: 1390-6.

Almeida EA, Ozaki MR – Disfunção endotelial em coelhos hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina. *Anais do 9º Congresso Brasileiro do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia* 2001; pg 63, Natal-RN, Brasil.

Aviram M. Modified forms of low density lipoproteins and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, Shannon 1993; 98(1):1-9.

Avogaro P, Bon GB, Gazzolatto G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis*, Dallas 1988; 8(1):79-87.

Bast A, Haenen G, Dollman C. Oxidants and antioxidants: State of the art. *The American Journal of Medicine*, Denver Sept 1991;91, (suppl 3c):p.3c-2s – 3c-13s.

Blasetto JW, Stein EA, Brow WV, Chitra R, Raza A. Efficacy of rosuvastatin compared with other statins at selected starting doses in hypercholesterolemic patients and in special population groups. *Am J Cardiol* 2003; 91(5A):3C-10C.

Brewer HB, Gregg RE, Hoeg JM, Fojo S. Apolipoproteins and lipoproteins in human plasma. An overview. *Clinical Chemistry*, Washington 1988; 34: 4-8.

Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, Washington 1986; 232: 34-47.

Brown MS, Goldstein JL. Lipoproteins metabolism in the macrophage implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry*, Palo Alto 1983; 52: 223-261.

Brown MS, Kovanem PT, Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science*, Washington 1981; 212: 628-635.

Bueg JA, Aust, SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods of Enzimology* 1978; 52: 302-310.

Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; 272: 60-66.

Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF et al. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res* 1996; 78: 415-423.

Carlson LA, Bottinger LE. Risk factors for ischemic heart disease in men and women. *Acta Medica Scandinavica*, Stockholm 1985; 218: 207-211.

Chin JH, Azhar S, Hoffmman BB. Inactivation of endothelium dependent arterial relaxing factor by oxidized lipoproteins. *Journal of Clinical Investigation*, San Diego 1992; 89: 10.

Cobbe S, Shepherd J. Cholesterol reduction in the prevention of coronary heart disease: Therapeutic rationale and guidelines. *British Heart Journal*, London 1993;.69(1): s63-s69.

Cooke JP, Andon NA, Girerd XJ et al. Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation* 1991; 83: 1057-1062.

Croft KD, Williams P, Dimmitt S, Abu-Amsha R, Beilin LJ. Oxidation of low-density lipoproteins: effect of antioxidant content, fatty acid composition and intrinsic phospholipase activity on susceptibility to metal ion-induced oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1995;1254(3):250-256.

Cybulsky MI, Gimbrone Jr. MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251: 788-791.

Dart A, Jerums G, Nicholson G, d'Emden M, Hamilton-Craig I, Tallis G, et al. A multicenter, double-blind, one-year study comparing safety and efficacy of atorvastatin versus simvastatin in patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 1997; 80: 39-44.

Davidson M. Implications for the present and direction for the future. *The American Journal of Cardiology*, New York 1993;.71(6):32b-36b.

Davies MJ, Woolf N. Atherosclerosis: What is it and why does it occur?.*The British Heart Journal*, London 1993; 69(1)supplement: S-3-S-11.

De Graaf H. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjec. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, Dallas 1991; 11(2):298-306.

Degraeve F.Bolla M, Blaie S et al. Modulation of COX-2 expression by statins in human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 46849-46855.

Diedrich DA, Yang Z, Buhler FR et al. Impaired endothelium-dependent relaxations in hypertensive small arteries involve the cyclooxygenase pathway. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1990; 258: H445-451.

Diplock A. Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda Jan 1991;.53, n.1, (suppl).

Driscoll DM, Getz GS. Extrahepatic synthesis of lipoprotein E. *Journal of Lipid Research*, Bethesda 1984; 25(12):1368-1379.

Dupois J, Tardif JC, Cemacek P, Th  roux P. Cholesterol reduction rapidly improves endothelium function after acute coronary syndromes. The reduction of cholesterol in ischaemia and function of Endothelium Trial (The RECIFE Trial). *Circulation* 1999; 99(25):3227-3233.

Dupuis J, Tardef CT, Cunacek P, Treasure P. Reduction of cholesterol in ischemia and function of endothelium. *Circulation* 1999; 99: 3227-3233.

Eberlein M, Heusinger-Ribeiro J, Goppelt-Struebe M. Rho-dependent inhibition of the induction of connective tissue growth factor (CTGF) by HMG CoA reductase inhibitors (statins). *Br J Pharmacol* 2001; 133: 1172-1180.

Eisenberg S, Gavish D, Oschry Y, Fainaru M, Deckelbaum RJ. Abnormalities in very low, low and high density lipoproteins in hypertriglyceridemia. *Journal of Clinical Investigation*, San Diego 1984; 74(2):470-482.

Esterbauer H, Puhl, Deebler-Rotheneder M, Walg G, Rabl H. Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. *Annals of Medicine*, Helsinki 1991;.23(5):573-581.

Esterbauer H, Jurgens O, Quenhenberger Koller E. Antioxidation of human low density lipoprotein loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *Journal of Lipid Research*, Bethesda 1987;.28(5):495-509.

Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid oxidation products. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda 1993;.57(5):779S-785S.

Faruqui R, Dicorleto P. Mechanisms of monocyte recruitment and accumulation. *British Heart Journal*, London Jan 1993; 69, n.1, (suppl), p.S19-S29.

Fenstermacher J, Gross P, Sposito N et al. Structural and functional variations in capillary systems within the Brain. *Ann of New York Acad of Science* 1988; 529: 21-30.

Folch JM, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue *J Biol. Chem* 1956; 226: 497-509.

Frei B, Gaziano, TM. Content of antioxidants preformed lipid hydroperoxides and cholesterol as predictors of the susceptible; it of human LDL to metal ion-dependent and independent oxidation. *Journal of Lipid Resarch, Brethesda* 1993;.34(12):2135-2145.

Frei B. Cardiovascular disease and nutrient antioxidants: Role of low density lipoprotein oxidation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton* 1995;.35(12):83-98.

Furchott R, Zawadzki JVB. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholie. *Nature* 1980; 288(5789):373-376.

Girerd XJ, Hirsch AT, Cooke JP et al. L-Arginine augments endothelium-dependent vasodilation in cholesterol-fed rabbits. *Cic Res* 1990; 67: 1301-1308.

Goldstein J, Ho Y, Basu K, Brown M. Binding site on macrophages that mediates uptake and degraation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceeding National Academy Science USA, Washington* 1979; 76(1):333-337.

Gordon JJ, Smith DP, Andy R, Alpers DH, Chonfeld G, Strauss AW. The primary translation product of rat intestinal apolipoprotein A-I mRNA is an unusual pre-protein. *The Journal Biological of Chemistry, Baltimore*,1982; 257(2):971-978.

Gotto A, Pownall H, Havel R. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods in Enzymology, New York* 1986; 128: 3-41.

Gotto A. *New Comprehensive biochemistry. Plasma lipoproteins.* Amsterdam, Elsevier Science Publishing Company, 1987, 405 p.; il 20cm, ISBN-0-444-80855-8.

Greenspan P, Ryu BH, Mao F, Gutman R. Association of negatively-charged phospholipids with low-density lipoprotein (LDL) increases its uptake and the deposition of cholesteryl esters by macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam* 1995;.1257(3): 257-264.

Grundy SM, Denke AM. Dietary influences on serum lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, Bethesda 1990;31(7):1149-1172.

Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism measurement and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda May 1993;57, n.5,(suppl), p.715S-724S.

Halliwell B. Oxidation of low-density lipoproteins: questions of initiation, propagation, and the effect of antioxidants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda March 1995;61, n.3(suppl), p.670S-677S.

Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, Denver Sept 1991; v.91, (suppl 3c), p.3c14s-3c22s.

Hansson G. Immune and inflammatory mechanism in the development of atherosclerosis. *British Heart Journal*, London Jan 1993;69, n.1, (suppl), p.S38-S41.

Havel RJ, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*. 1955, 34: 1345-1353.

Havel RJ, Hamilton RL. Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. *Hepatology*, Baltimore 1988; 8(6):1689-1704.

Havel RJ. Functional activities of hepatic lipoprotein receptors. *Annual Review Physiology*, Palo Alto 1986; 48: 119-123.

He P, Curry FE. Differential actions of cAMP on endothelial (Ca<sup>2+</sup>)I and permeability in microvessels exposed to ATP. *Am J Physiol* 1993; 265: 795-798.

Heinonen TM, Schrott H, McKenney JM, et al. Atorvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor as monotherapy combined with colestipol. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 1996; 1: 117-122.

Hennekens C, Gaziano JM. Antioxidants and heart disease: Epidemiology and clinical evidence. *Clinical Cardiology*, Easton 1993;16, (suppl), n.4, p.I-10 - I-15.

Hernandes-Perera, Pery Sara D, Navarro-Antolin J, Lamas S. Effects of the hydroxymethylglutaryl CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1998;101: 2711-2719.

Hodis H, Kransch D, Avogaro P, Bittolo-Bon G, Gazzolato G, Hwang J, Sevani A. Biochemical and cytotoxic characteristics of *in vivo* circulating oxidized low density lipoprotein (LDL). *Journal of Lipid Research*, Bethesda 1994;35(4):669-677.

Hodis H, Kransch D, Avogaro P, Bittolo-Bon G, Gazzolato G, Hwang J, et al. Biochemical and cytotoxic characteristics of an *in vivo* circulating oxidized low density lipoprotein (LDL). *Journal of Lipid Research*, Bethesda 1994; 35(4):669-667.

Hunninghake D, Mellies M, Goldberg A, Kuo P, Kostes J, Schrott H, et al. Efficacy and safety of pravastatin in patients with primary hypercholesterolemia II. Once-daily versus Twice-daily dosing. *Atherosclerosis*, Shannon 1990;85(2/3):219-227.

Hunninghake DB, Even AB, Bays HE. Rosuvastatin Improves the Atherogenic and Atheroprotective lipid Profiles in Patients With Hypertriglyceridemia, *Coronary Artery Disease* 2004;15(2): 115-123.

Hunninghake DB, Stein EA, Bays HE, Rader DJ, Chitra RR, Simonson SG, Schneck DW. Rosuvastatin improves the atherogenic and atheroprotective lipid profiles in patients with hypertriglyceridemia. *Coron Artery Dis* 2004; 15(2):115-123.

Jialal I, Fuller CT. Oxidized LDL and antioxidants. *Clinical Cardiology*, Easton, Apr. 1993;16, 4, (suppl), p.I-6-I-9.

Jones PH, Davidson MH, Stein EA, Bays HE, McKenney JM, Miller E, et al. Study Group. Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin across doses (STELLAR\* Trial). *Am J Cardiol* 2003; 92(2):152-160.

Jones PH, Famer Ja, Cressman MD, McKenney JM, Wright JT, Proctor JD et al. Once-daily pravastatin in patients with primary hypercholesterolemia: a dose response study. *Clin Cardiol* 1991; 14: 146-151.

Jover B, Herizi A, Ventre F et al. Sodium and angiotensin in hypertension induced by longterm nitric oxide blockade. *Hypertension* 1993; 21: 944-948.

Kane JP. Apolipoprotein B: structural and metabolic heterogeneity. *Annual Review of Physiology*, Palo Alto 1983; 45: 637-650.

Kannel EB, Castelli WR, Gordon T. Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease; new perspectives based on the Framingham study. *Annals of Internal Medicine*. Philadelphia 1979; 90(1):85-89.

Kostner GM, Knipping G, Groener JE, Zechner R, Dieplinger H. The role of LCAT and cholesteryl transfer proteins for the HDL and LDL structure and metabolism. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, New York 1987; 210: 79-86.

Kushwaha R, Hazzard W. Catabolism of very low density lipoprotein in the rabbit effect of changing composition and pool size. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam 1978; 528(2):176-189.

LaRosa JC, Hunninghake D, Bush D, et al. The cholesterol facts: a summary of the evidence relating dietary fats, serum cholesterol, and coronary heart disease. *Circulation* 1990; 81: 1721-1733.

Laufs V, Fata V, Vita BA, Plutzky J, Liao K. Upregulation of endothelial nitric oxide after lipid lowering therapy in hypercholesterolemic patients. *Circulation* 1998; 97:1129-1135.

Lefer AM, Campbell BA, Yong-Kyoo S, Scalia R, Hoyward R, Leffer DJ. Simvastatin preserves the ischemic-reperfused myocardium in normocholesterolemic rat hearts. *Circulation* 1999; 100: 178-184.

Levine GN, Keaney JF Jr, Vita JA. Cholesterol reduction in cardiovascular disease: clinical benefits and possible mechanisms. *N Engl J Med* 1995; 332: 512-521.

Liu SY, Choy S, Dembinski TG, Hatch GM, Mymin D, Shen X et al. Alteration of lysophosphatidylcholine content in low lipoprotein after oxidative modification: Relationship to endothelium dependent relaxation. *Cardiovascular Research*, London 1994; 28(10):1476-1481.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall AJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *The Journal Biological of Chemistry*, Baltimore 1951; 193: 265-275.

Mantha S, Prasad M, Kalra J, Prasad K. Antioxidant in hypercholesterolemia and effects of vitamin E in rabbits. *Atherosclerosis*, Shannon 1993; 101(2):136-144.

Martin MJ, Hulley SB, Brower WS, Kuller LH, Wentworth D. Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361,662 men. *Lancet* 1986; 2: 933-939

Martin MJ, Hulley SB, Browner WS, Kuller LH, Wentworth D. Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361,662 men. *Lancet* 1986; 2: 933-939.

Masana L, Bargalló M, Plana N, La-Ville A, Casals I, Solá R. Effectiveness of probucol in reducing plasma low-density lipoprotein cholesterol oxidation in hypercholesterolemia. *The American Journal of Cardiology*, New York 1991; 68(9):863-867.

Masato E, Kozai T, Cosentino F et al. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells. Role of Rho/Rho-Kinase and AKT pathways. *Circulation* 2002; 105: 1756-1759.

Michel CC. Capillares, caveolae, calcium and cyclic nucleotides: a new look at microvascular permeability. *J Mol Cell Cardiol* 1988; 30: 2541-2546.

Mills, GL, Lane PA. *A guidebook to lipoprotein technique*, 1a, ed. Amsterdam, Elseviers 1984; 512:il.20cm, ISBN 0444805745.

Myant NT. *Cholesterol metabolism, LDL and the LDL receptor*. 1a. ed.; San Diego, Academic Press, 1990. 465 p.

Naito HK, David JA – *Laboratory considerations: Determination of cholesterol, triglycerides, phospholipid and others lipids in blood and tissues*. *Lab Res Methods Bio Med* 1984; 10: 1-76.

Naito, HK, David J. *Laboratory considerations: Determination of cholesterol triglycerides, phospholipides and others lipidis in blood and tissues*. In *laboratory and research methods in biology andmedicine lipid research methodology*. Alan R, Liss, INC, New York 1981; 1-76.

Nawrocki JW, Weiss SR, Davidson ME, et al. Reduction of LDL cholesterol by 25% to 60% in patients with primary hypercholesterolemia by atorvastatina, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 678-682.

Nenseter MS, Volden V, Tonstad S, Gudmundsen O, Ose L, Drevon CA. Modification of low density lipoprotein in relation to intake of fatty acids and antioxidants. *World Rev Nutr Diet*. 1994;75:144-148.

Newman H, Zilversmit J. Quantitative aspects of cholesterol flux in rabbit atheromatous lesions. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore 1962; 227(7):2078-2084.

Nitemberg A, Isabelle Foulr JM, Bichat C. Acetylcholine induces constriction of normal coronary arteries in young heavy smokers. *Circulation* 1992, 86: 1-158.

of tissue factor in human monocytes. *Atherosclerosis* 2002; 163: 39-47.

Olsson GO, Blasetto JW, Bryzinski BS, Caplan RJ, Gold A. The stain wars. *Lancet*. 2003; 362(9398):1855-1856.

Olsson GO, Blasetto JW, Bryzinski BS, Caplan Rj, Gold A. The wars. *Lancet*. 2003; 362(9398):1855-1856.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-666.

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derive relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.

Pamer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-666.

Parthasarathy S, Khoo JC, Miller E, Barnett J, Witztum J, Steinberg D. Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modifications: Implications for dietary prevention of atherosclerosis. *Proceeding National Academy Science USA*, Washington 1990;87(8):3894-3898.

Parthasarathy S, Steinbrecher UP, Barnett J, Witztum J, Steinberg D. Essential; role of phospholipase A2 activity in endothelial cell-induced modification of low density lipoprotein. Proceeding National Academy Science USA, Washington 1985; 82(9): 3000-3004.

Quintão ECR. Colesterol e Aterosclerose. 1a. ed. Rio de Janeiro: Qualitmark, 1992. 275 p.il. 20cm. ISBN 85-85360-19-4.

Quintão ECR. Estatinas no tratamento de hipercolesterolemia. Revista da Associação Médica Brasileira, São Paulo 1994;.40(1):50-58.

Raines E, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis: British Heart Journal. London 1993;.69(1):S30-S37.

Ribeiro Jorge PA, Ozaki MR, Metzke K – Effects of Simvastatin and Pravastatin on endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolemic rabbits. Exp Toxic Pathol 1994; 46: 465-69.

Ribeiro Jorge PA; Neyra LC; Ozaki MR; Almeida EA. Rapid reversal of endothelial dysfunction in hypercholesterolemic rabbits treated with simvastatin and pravastatin. Clin Exp Pharmacol Physiol 1997;24: 948-95.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. N Engl J Med 1986; 314: 488-500.

Roth R, Gaubatz J, Gotto A, Patsch J. Effect of cholesterol feeding on the distribution of plasma lipoproteins and on the metabolism of apolipoprotein E in the rabbit. Journal of Lipid Research, Bethesda 1983; 24(1):1-11.

Sacks FM, Pfeffer MA et al. The effects of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels Care Study N Engl 1996, 14: 1001-9.

Salonen J, Ya-Hertuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpeler H, Salonen R et al. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. Lancet, London 1992;.339(8798):883-887.

Scalia R, Appel JZ, Lefer AM. Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit. (Bellosta S. Atherosclerosis 1998; 137: S101-S109.

Schaeffer EJ, Ordovas JM, Lan SM, Ghiselli G, Kashyap ML, Srivastava LS, et al. Familial apolipoprotein A-I and C-III deficiency, variant II. *Journal of Lipid Research*, Bethesda 1985; 26(9):1089-1101.

Schieffer B, Drexler H, Ling BN et al. G-protein coupled receptors control vascular smooth muscle cell proliferation via pp-60 c-src and p21 ras. *Am J Physiol* 1997; 272(6Pt): C2019-2030.

Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. A modern view of atherogenesis. *The American Journal of Cardiology*, New York FEB 1993; 71 n.6.(suppl), p.9B-14B.

Scow RO, Blanchette-Mackie EJ, Smith LC. Transport of lipid across capilar endothelium. *Federation Proceedings*, Bethesda 1980; 39: 2610-2617.

Scow Ro, Blanchette-Mackie EJ, Smith LC. Transport of lipid across capilar endothelium. *Federation Proceedings*, Bethesda 1980; 39: 2610-2617.

Shireman R. Formation, metabolism and physiologic effects of oxidatively modified low density lipoprotein. *The Journal of Nutrition*, Bethesda 1996; 126(.4S):1049S-1052S.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modification of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *The New England Journal of Medical*, London 1989; 320(14):915-924.

Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake D, Witztum J, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipidis. *Proceeding National Academy Science USA*, Washington D.C. 1984; 81(12):3883-3887.

Steinbrecher UP, Witztum JL, Parthasarathy S, Steinber G. Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. *Arteriosclerosis and Trombosis*, Dallas 1987; 7(1):135-143.

Strandberg TE, Vanhanen H, Tikkanen MJ. Effect of statins on C-reactive protein in patients with coronary artery disease. *Lancet* 1999; 353(9147):118-9.

Stringer M, Gorog P, Freeman A, Kakkar V. Lipid peroxides and atherosclerosis. *British Medical Journal*, London 1989; 298(6669):281-284.

Stroes ESG, Kastelein JJ, Cosentino F, et al. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1997; 99: 41-46.

Tomikawa M, Makayasu T, Tawara K, Kameda KY, Abiko Y. Effect of pantethine on lipoprotein profiles and HDL subfractions in experimental hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis, Shannon* 1982; 41(1):1-11.

Tribble D. Lipoprotein oxidation in dyslipidemia insights into general mechanism affecting lipoprotein oxidative behavior. *Current Opinion in Lipidology, Philadelphia* 1995; 6(4):196-208.

Tsao P, McEvoy LM, Drexler H et al. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation* 1994; 89: 2176-82.

Verschuren WMM, Jacobs DR, Bloemberg BPM, et al. Serum total cholesterol and long-term coronary heart disease mortality in different cultures: twenty-five-year follow-up of the Seven Countries Study. *Jama* 1995; 274: 131-136.

Vita JÁ, Yeung AC, Winford M, Hadgson JM, Treasure CB, Klein L, Werns S. Effects of cholesterol lowering therapy on coronary endothelial vasomotor function et al. *Circulation* 2000; 102: 846-851.

Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med.* 2001; 3(4):93-102.

Witzum J. Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis. *British Heart Journal, London* Jan 1993; 69, (suppl). p. S12-S18.

Yia-Herttuala S, Palenski W, Rosenfeld M, Parthasarathy S, Carew T, Butter S, et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *Journal of Clinical Investigation, San Diego* 1989; 84(4):1086-1095.

Zakhary R, Gaine SP, Dinerman JJJ et al. Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 795-798.