

LUIZ ANTONIO ABDALLA

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Área de Medicina Interna do aluno Luiz Antonio Abdalla.

Campinas, 05 de março de 2002.


Prof. Dr. Paulo Afonso Ribeiro Jorge
Orientador

***EFEITOS DA VITAMINA E SOBRE O FLUXO
CORONÁRIO ENDOTÉLIO-DEPENDENTE EM CÃES
HIPERCOLESTEROLÊMICOS***

CAMPINAS

2002

LUIZ ANTONIO ABDALLA

***EFEITOS DA VITAMINA E SOBRE O FLUXO
CORONÁRIO ENDOTÉLIO-DEPENDENTE EM CÃES
HIPERCOLESTEROLÊMICOS***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas,
área de Medicina Interna.*

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO AFONSO RIBEIRO JORGE

CAMPINAS

2002

UNIDADE 8e
Nº CHAMADA T/UNICAMP
Ab31e
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 49384
PROC 16-837102
C _____ D X
PREÇO R\$ 11,00
DATA 05/06/02
Nº CPD _____

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

CM00168285-5

BIB ID 242732

Ab31e Abdalla, Luiz Antonio
Efeitos da vitamina E sobre o fluxo coronário endotélio – dependente
em cães hipercolesterolêmicos / Luiz Antonio Abdalla. Campinas, SP
: [s.n.], 2001.

Orientador : Paulo Afonso Ribeiro Jorge
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Acetilcolina. 2. Artérias coronárias. 3. Colesterol. 4.
Endotélio. I. Paulo Afonso Ribeiro Jorge. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Paulo Afonso Ribeiro Jorge

Membros:

1. Prof. Dr. Michel Batlouni

2. Prof. Dr. Ari Timerman

3. Prof. Dr. Paulo Afonso Ribeiro Jorge

4. Prof. Dr. Sigisfredo Luis Brenelli

5. Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, área de concentração em Medicina Interna da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 05/03/2002

20224666

DEDICATÓRIA

*Para meu pai, Luiz, médico,
meu mestre primeiro e melhor amigo,
presença inspiradora, fidalga
e edificante, exemplo de trabalho,
dignidade, conquista, honra,
verdade e ética em cada
instante de minha vida.*

*Para minha mãe, Maria Thereza,
presença de amor, apoio e
dedicação ímpar, carinhosa,
acolhedora e sempre pronta a ajudar.*

*Para Rachel, minha esposa e amiga,
companheira em todos os momentos,
presença constante que impulsiona
e ilumina a minha trajetória.*

*Para Giovanna e Georgia,
filhas amorosas, estudiosas e batalhadoras,
motivo de alegrias, estímulo e luz na minha vida,
pelo amor, pelo apoio e compreensão.*

*Para Regina, minha única e querida irmã,
Sílvia, meu cunhado e amigo, e meus sobrinhos
Veridiana, Verônica e Vinícius,
pelo amor e carinho que nos une.*

Ao Professor Dr. Paulo Afonso Ribeiro Jorge, meu zeloso orientador e amigo, exemplo de professor e pesquisador ilustre, sempre presente nas horas difíceis com seus conselhos e apoio científico, meu sincero reconhecimento pela disponibilidade, oportunidade e incentivo à pesquisa na área de Aterosclerose e Função Endotelial e orientação valiosa na elaboração desta tese.

Ao Prof. Dr. Michel Batlouni, Diretor Científico do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, professor e pesquisador ilustre, meu reconhecimento pela amizade, valiosas opiniões, disponibilidade, incentivo e apoio.

Ao Prof. Dr. J. Eduardo M. R. Sousa, diretor geral do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, exemplo dignificante da nossa especialidade, meu reconhecimento pela amizade, apoio e grande incentivo.

Ao Prof. Dr. Adib Jatene, competência maior de nossa especialidade, pela excelente amizade e pelos muitos ensinamentos recebidos.

Ao Prof. Dr. Leopoldo Piegas, ao Prof. Dr. Hélio M. de Magalhães, à Profa. Dra. Amanda Guerra de Moraes Rego Sousa, diretores do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, pela excelente amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Ari Timerman, Chefe da Seção de Emergências e Terapia Intensiva do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, pelos muitos ensinamentos recebidos em nossa longa e fraterna convivência no exercício da profissão, pela grande amizade, auxílio e apoio.

Ao Prof. Dr. Eros Antonio da Almeida, Chefe do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela amizade e pelo acolhimento no Laboratório de Endotélio, Lípides e Aterosclerose do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental.

Ao Dr. Luiz Credidio Neto, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelo auxílio competente na preparação do modelo experimental.

À bióloga Regina Mitiko Ozaki, do Laboratório de Endotélio, Lípides e Aterosclerose do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela assistência incansável e colaboração nas dosagens bioquímicas deste estudo.

Ao Prof. Dr. Sigisfredo Luís Brenelli, Coordenador de Ensino da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela amizade e atenciosa colaboração junto à Diretoria de Apoio Didático, Científico e Computacional.

À Sra. Rachel Lemos Abdalla, incansável digitadora das inúmeras correções deste estudo.

Ao Prof. Dr. Carlos Gun, ao Prof. Dr. Rui F. Ramos e aos Drs. João Manuel Rossi Neto, Álvaro Avezum Júnior, Antonio Carlos M. Bianco, integrantes da Seção de Emergências e Terapia Intensiva do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, pela amizade e cooperação.

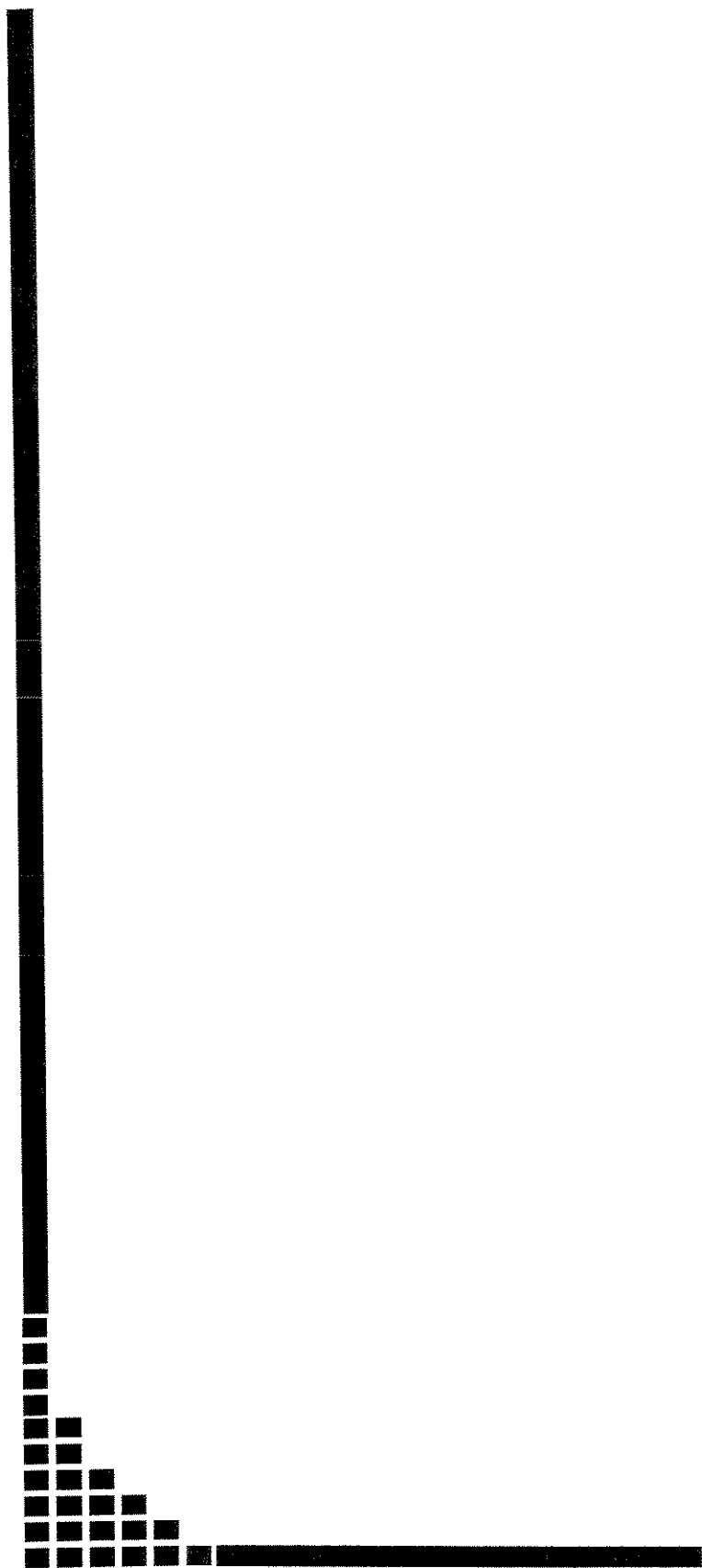
À Maria Rita Barbosa Frezzarin, pela revisão da estrutura e apresentação desta tese.

À Sílvia Auxiliadora de Lúcio, pela editoração final deste trabalho.

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xi</i>
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4. RESULTADOS.....	26
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO.....	36
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
8. SUMMARY.....	40
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
10. ANEXOS.....	53

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1: Valores do fluxo coronário, frequência cardíaca e pressão aórtica, durante administração de acetilcolina, no grupo-controle.....	54
Tabela 2: Valores do fluxo coronário, frequência cardíaca e pressão aórtica, durante administração de acetilcolina, no grupo hipercolesterolêmico.....	55
Tabela 3: Valores do fluxo coronário, frequência cardíaca e pressão aórtica, durante a administração de acetilcolina, no grupo Vitamina E.....	56
Tabela 4: Medidas de posição e dispersão das variáveis contínuas relativas ao grupo-controle.....	57
Tabela 5: Medidas de posição e dispersão das variáveis contínuas relativas ao grupo hipercolesterolêmico.....	58
Tabela 6: Medidas de posição e dispersão das variáveis contínuas relativas ao grupo Vitamina E.....	59

	<i>PÁG.</i>
Figura 1: Refere-se ao diagrama de dispersão dos valores do colesterol plasmático total. Os valores são expressos em mg/dl.....	60
Figura 2: Refere-se ao diagrama de dispersão dos valores da diferença percentual do fluxo coronário durante a infusão de acetilcolina (5µg/kg/min).....	61
Figura 3: Refere-se ao diagrama de dispersão dos valores da diferença percentual do fluxo coronário durante a infusão de nitroprussiato de sódio (0.5µg/kg/min).....	62
Figura 4: Refere-se ao diagrama de dispersão dos valores do colesterol tecidual. Os valores são expressos em mg/mg (tecido seco).....	63
Figura 5: Refere-se ao diagrama de dispersão dos valores do MDA tecidual. Os valores são expressos em nmol/mg tecido.....	64



RESUMO

Foram estudados os efeitos da vitamina E sobre o fluxo coronário endotélio-dependente em cães hipercolesterolêmicos.

A pesquisa foi realizada em 21 cães machos adultos, pesando em média $7,4 \pm 1,0$ kg, que foram divididos em três grupos: controle, hipercolesterolêmico e vitamina E. Os animais do grupo hipercolesterolêmico foram alimentados com uma dieta rica em colesterol (5% g/g) e óleo de coco (10% g/g) por 40 dias. O grupo vitamina E recebeu a mesma dieta, acrescida de 400 UI de vitamina E, durante os últimos 15 dias do experimento. Os níveis de colesterol total sérico foram avaliados no começo e no final do estudo, por meio de “kits” enzimáticos e espectrofotômetro Beckman 700. O fluxo coronário foi medido por um fluxômetro eletromagnético (Caroline Instruments, Inc.), usando-se um probe, posicionado na artéria coronária descendente anterior esquerda, próximo ao óstio. Uma agulha, conectada a uma bomba de infusão, foi introduzida na artéria coronária para administração de acetilcolina (ACH) e nitroprussiato de sódio (NPS), à velocidade de $5\mu\text{g/kg/min}$. A aorta foi canulada para medida da pressão arterial por intermédio de transdutor acoplado a polígrafo da marca Siemens (Mingograph 804). Os teores de colesterol e malonodialdeído (MDA) foram, também, medidos em segmentos de vaso coronário.

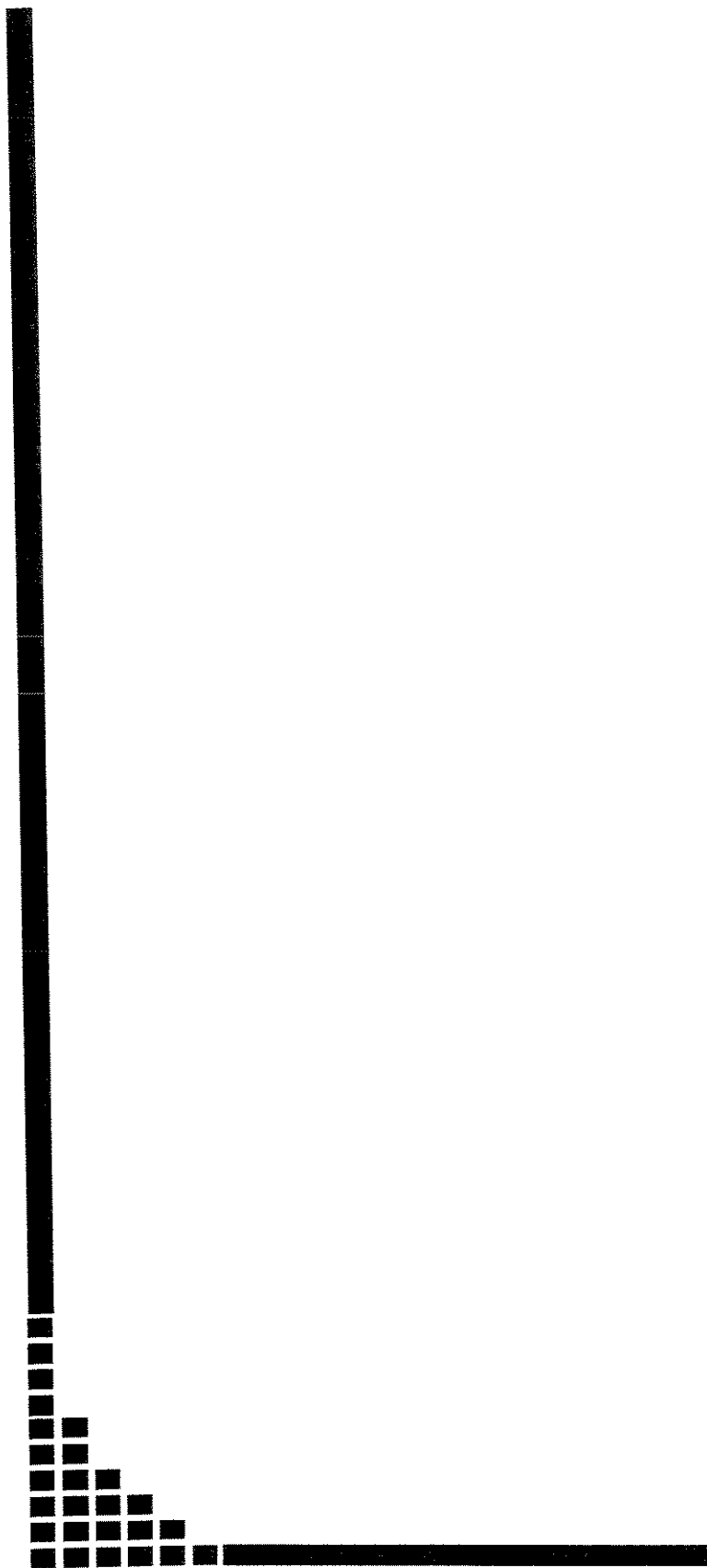
Após 40 dias, os níveis de colesterol sérico haviam aumentado em 203%, no grupo hipercolesterolêmico e, em 198%, no grupo da vitamina E. Entretanto, esta diferença não foi significativa ($P>0,05$). A pressão sangüínea na aorta e a freqüência cardíaca permaneceram sem alteração, durante a administração de ACH. Contudo, a pressão sistólica e a diastólica diminuíram e a freqüência cardíaca aumentou durante a infusão de NPS.

O teor de colesterol tecidual e MDA aumentaram, significativamente, ($P<0,05$) nas amostras de artéria coronária do grupo hipercolesterolêmico, comparativamente aos animais do grupo-controle. A vitamina E reduziu o colesterol tecidual e o MDA nos animais hipercolesterolêmicos ($P<0,05$).

A elevação do percentual do fluxo coronário, durante a administração da ACH, foi significativamente menor no grupo hipercolesterolêmico, quando comparada com animais do grupo-controle ($P < 0,05$), mas manteve-se inalterada no grupo da vitamina E ($P > 0,05$). O fluxo coronário aumentou, durante a administração de NPS, no grupo da vitamina E ($P < 0,05$).

Concluiu-se que a hipercolesterolemia reduziu o fluxo coronário endotélio-dependente e aumentou o teor de colesterol tecidual e de MDA nas artérias coronárias. A vitamina E reduziu o MDA e o teor de colesterol tecidual, sem afetar significativamente o nível de colesterol sérico. A vitamina E restaurou o fluxo coronário, revertendo a disfunção endotelial na hipercolesterolemia.

Palavras-Chave: vitamina E, fluxo coronário endotélio-dependente, hipercolesterolemia, cão, acetilcolina, nitroprussiato de sódio.



1. INTRODUÇÃO

As complicações cardiovasculares, direta ou indiretamente relacionadas à aterosclerose, são responsáveis por mais de 640 mil óbitos/ ano, nos Estados Unidos. Os custos do tratamento com enfermidades cardiovasculares, nos Estados Unidos, chegaram a US\$ 138 bilhões em 1995, incluindo US\$ 80 bilhões para pagamento de hospitais e serviços afins (GOULD, 1991). Um dos fatores associados a este substancial aumento dos custos hospitalares foi representado pela progressiva expansão do emprego de cirurgias de revascularização e angioplastias coronárias. Note-se que estes procedimentos cirúrgicos, enquanto indispensáveis, buscam apenas equacionar o processo obstrutivo aterosclerótico. No Brasil, as doenças cardiovasculares são responsáveis por aproximadamente 300.000 mortes/ano, ou seja, 820 óbitos por dia ou 34 por hora, ou uma morte a cada dois minutos. Os custos representam 16,22% do orçamento da saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1993).

Dentro deste contexto, são plenamente justificáveis as propostas de estudos que busquem o melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos na aterogênese, assim como iniciativas terapêuticas que possam prevenir o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas ou estabilizar a placa já instituída.

Na fase precoce da aterogênese, tem importância a relação entre as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) plasmáticas e a parede arterial e, de modo especial, o endotélio vascular.

A célula endotelial produz uma série de substâncias que modulam a motricidade arterial e interagem com elementos do sangue, prevenindo a trombose, o vasoespasma e regulando o metabolismo da parede arterial e as respostas à injúria vascular (LUSCHER, 1994; JANG, LINCOFF, PLOW, 1994; RIBEIRO JORGE *et al.*, 1998).

A membrana da célula endotelial apresenta uma série de receptores (G-proteínas) que interagem com agonistas e antagonistas, resultando em um complexo sistema de ajuste e proteção da função vascular.

O óxido nítrico (NO°) e as prostaciclina (PGI₂), produzidas no endotélio, atuam através da monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e da monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) da célula muscular lisa da parede arterial, reduzindo a concentração de cálcio no citosol e induzindo ao relaxamento vascular. São substâncias vasodilatadoras, antiagregantes plaquetárias e antiproliferativas, na resposta inflamatória. O endotélio produz também substâncias vasoconstrictoras, como a endotelina e a angiotensinaII, em resposta ao estiramento mecânico. O endotélio produz substâncias anti-trombóticas como a trombomodulina, a antitrombina III e fibrinolíticas como o ativador do plasminogênio tecidual (t-PA), assim como pró-trombóticas, como a tromboplastina tissular, o inibidor do ativador do plasminogênio (PAI 1) e o fator de von Willebrand.

As substâncias produzidas pelas plaquetas ativadas, como a adenosina trifosfato (ATP) e a adenosina difosfato (ADP), serotonina e tromboxane A₂, que induziriam à vasoconstrição, ao agir sobre os receptores de membrana da célula muscular lisa, têm, paradoxalmente, uma ação vasodilatadora, quando o endotélio está intacto, ao liberar NO° através dos receptores de membrana da célula endotelial.

De acordo com os conceitos vigentes, a formação da placa de aterosclerose decorre da deposição focal de macrófagos, envolvendo resíduos de LDL e colesterol, no espaço subendotelial do vaso (SCHWARTZ, VALENTE, SPRAGUE, 1991). Existem fortes evidências de que as LDL plasmáticas, na sua relação normal com a parede arterial, adentram as células endoteliais através de mecanismos de endocitose. SIMIONESCU & SIMIONESCU (1988) demonstraram, marcando partículas de LDL com ouro radioativo, carbono-¹⁴C e ¹²⁵I β-VLDL, a formação de invaginações na membrana da célula endotelial chamadas de "coated pits" e onde se localizariam os receptores específicos da apoB100. Estas invaginações se transformariam em vesículas de endocitose, carreando as partículas de LDL para o interior da célula endotelial. Dentro da célula, as partículas de LDL seriam englobadas em lisossomas e hidrolizadas em fosfolipídeos, triglicérides, proteínas, colesterol etc, e os receptores específicos reciclados até a superfície da membrana celular. O colesterol livre seria utilizado na formação e recomposição da membrana celular ou armazenado sob a forma de esteres de colesterol. Cerca de 10% das partículas de LDL atingiriam a região da íntima do vaso.

Na presença de hipercolesterolemia e conseqüente aumento das LDL, carreadoras do colesterol plasmático, aumentaria, em primeira instância, o processo normal de endocitose das LDL, através de receptores específicos e, em segunda instância, ocorreria endocitose através de receptores inespecíficos. Ambas as situações levariam ao aumento da concentração de LDL nativas, no interior da célula endotelial. O aumento da concentração de LDL nativa no interior da célula endotelial induziria a maior consumo de NO^o e mais acentuada produção de radicais livres. O aumento dos radicais livres levaria à peroxidação dos ácidos graxos das partículas de LDL e também à oxidação das proteínas apoB (STEINBERG *et al.*, 1989; WITZTUN & STEINBERG, 1991; HENNING & CHOW, 1988).

As LDL oxidadas, provavelmente através da transformação da lecitina em lisolecitina, provocariam a disrupção da Gi proteína, receptor de membrana por onde atuam inúmeros agonistas estimuladores da via de produção do óxido nítrico, levando ao comprometimento inicial da função da célula endotelial (STEINBERG *et al.*, 1989; FLAVAHAN, 1992). Posteriormente, outros receptores de membrana do tipo G proteína seriam comprometidos, impedindo a resposta celular à ação de outros agentes agonistas, como por exemplo os que induzem a produção de PGI₂. Como conseqüência, ficam atenuadas as respostas que produzem vasodilatação endotélio-dependente, facilitando a ocorrência de espasmos vasculares localizados. De outro lado, ocorre a adesão e agregação plaquetária, com potencial formação de trombose (LUDMER *et al.*, 1986; AMBROSE *et al.*, 1988; WEBSTER *et al.*, 1990; MEREDITH *et al.*, 1993). Existem evidências de que a hipercolesterolemia provoca disfunção endotelial. Este fato tem sido observado tanto no homem como em animais de experimentação (LUDMER *et al.*, 1986; JAYAKODY *et al.*, 1987; OSBORNE *et al.*, 1989 b). A disfunção endotelial apresenta graus variáveis de intensidade de comprometimento e mostra-se reversível, quando se reduz a hipercolesterolemia.

A célula endotelial disfuncional permitiria maior efluxo de LDL nativa e também de LDL oxidada para a região da íntima vascular, incrementando o processo de transcitose. Na íntima as LDL nativas se oxidariam, aumentando o contingente das LDL oxidadas, que induziriam a migração de monócitos e dariam início à formação das células

espumosas. Por este conceito, a chegada das partículas de LDL à região intimal ocorreria após comprometimento funcional da célula endotelial.

Esta compreensão da aterogênese imprime uma relação de causa e efeito entre a LDL oxidada, a disfunção endotelial e a formação de células espumosas. Note-se entretanto que, na fase inicial da aterogênese, não se observam monócitos na região da íntima, sugerindo fortemente que a chegada dos lipossomos extracelulares precede e, posteriormente, estimula a chegada de monócitos, os quais, fagocitando o conteúdo dos lipossomos, dariam origem às células espumosas. É importante citar que na formação das células espumosas e posterior organização da placa de aterosclerose, participam elementos da resposta inflamatória como as citocinas, moléculas de adesão e os fatores de crescimento celular (LUSCINKAS, KANSAS, DING, 1994).

É lícito concluir, pelas considerações acima, que a disfunção endotelial na hipercolesterolemia seria provocada por dois mecanismos principais: a) aumento de concentração das partículas de LDL no endotélio e b) peroxidação dos ácidos graxos, dos triglicérides, fosfolípidos e proteínas Apo B das LDL, no interior da célula endotelial.

Desta forma, as iniciativas terapêuticas lógicas estariam voltadas para a redução do colesterol plasmático e controle da peroxidação lipídica e proteica.

A redução do colesterol plasmático e das LDL, através de dieta ou de medicação hipocolesterolêmica limitaria e, por hipótese, reverteria o mecanismo de endocitose em nível da célula endotelial, preservando a função do endotélio e evitando a formação das células espumosas ou propiciando a remoção do acúmulo de colesterol e interferindo nas reações inflamatórias e, conseqüentemente, estabilizando a placa.

Diferentes estudos clínicos têm demonstrado significativa redução de eventos coronarianos e morte por doença coronária, com a administração de medicamentos redutores do colesterol plasmático, seja na prevenção primária ou secundária. O estudo THE SCANDINAVIAN SIMVASTATIN SURVIVAL STUDY GROUP, 1994 (4S), de prevenção secundária, por exemplo, demonstrou que a redução do colesterol diminuiu a mortalidade total em todos os subgrupos de pacientes, incluindo idosos e mulheres que já

apresentavam doença coronária. A redução do risco de mortalidade por doença coronária foi de 42% e a redução da mortalidade total foi 30%. O estudo THE WEST OF SCOTLAND CORONARY PREVENTION STUDY GROUP (WOSCOPS) (SHEPERD *et al.*, 1995) de prevenção primária, que incluiu 6.595 indivíduos com hipercolesterolemia ($>7.0\text{mmol/l}$), mas sem histórico prévio de doença arterial coronária, revelou que o tratamento com pravastatina, na dose de 40mg/dia, reduziu significativamente o risco de morbidade e de mortalidade. O benefício do tratamento já se evidenciou nos primeiros 6 meses. Outros estudos como o THE CHOLESTEROL AND RECURRENT EVENTS (CARE) (SACKS *et al.*, 1996), o THE LONG TERM INTERVENTION WITH PRAVASTATIN IN ISCHAEMIC DISEASE (LIPID) STUDY GROUP, 1998 e o AIR FORCE / TEXAS CORONARY ATHEROSCLEROSIS PREVENTION STUDY (AFCAPS/TexCAPS) (DOWNS *et al.*, 1998) também chegaram às mesmas conclusões.

Há, assim, comprovação médico-científica de que a redução da colesterolemia traz benefícios importantes sobre a morbidade e mortalidade relacionadas à aterosclerose.

Como a redução dos eventos clínicos, nestes estudos, ocorreu sem significante alteração do diâmetro da placa de aterosclerose coronária, atribuiu-se ao endotélio, restaurado na sua função e ao controle da resposta inflamatória a melhor evolução do quadro clínico.

Dentro desta linha de pensamento, estudos científicos desenvolvidos em animais de experimentação, revelaram que a redução do colesterol plasmático leva à reversão da disfunção endotelial (HARRISON *et al.*, 1987; OSBORNE *et al.*, 1989 a). RIBEIRO JORGE, OSAKI, METZE (1994), estudaram o efeito da pravastatina e da simvastatina sobre a reversão da disfunção endotelial em coelhos hipercolesterolêmicos. Verificaram que a pravastatina, com 15 dias de administração, foi capaz de reverter parcialmente a disfunção endotelial. Destaca-se, neste experimento, que ocorreu reversão da disfunção endotelial e da contagem do número de células espumosas na parede arterial, mesmo na presença de níveis ainda razoavelmente elevados do colesterol plasmático. Esta diminuição do número de células espumosas e a reversão da disfunção endotelial é que parece ser o mecanismo primordial na prevenção da aterogênese e estabilização da placa. Também em pacientes com aterosclerose coronária, tem sido relatado um significativo

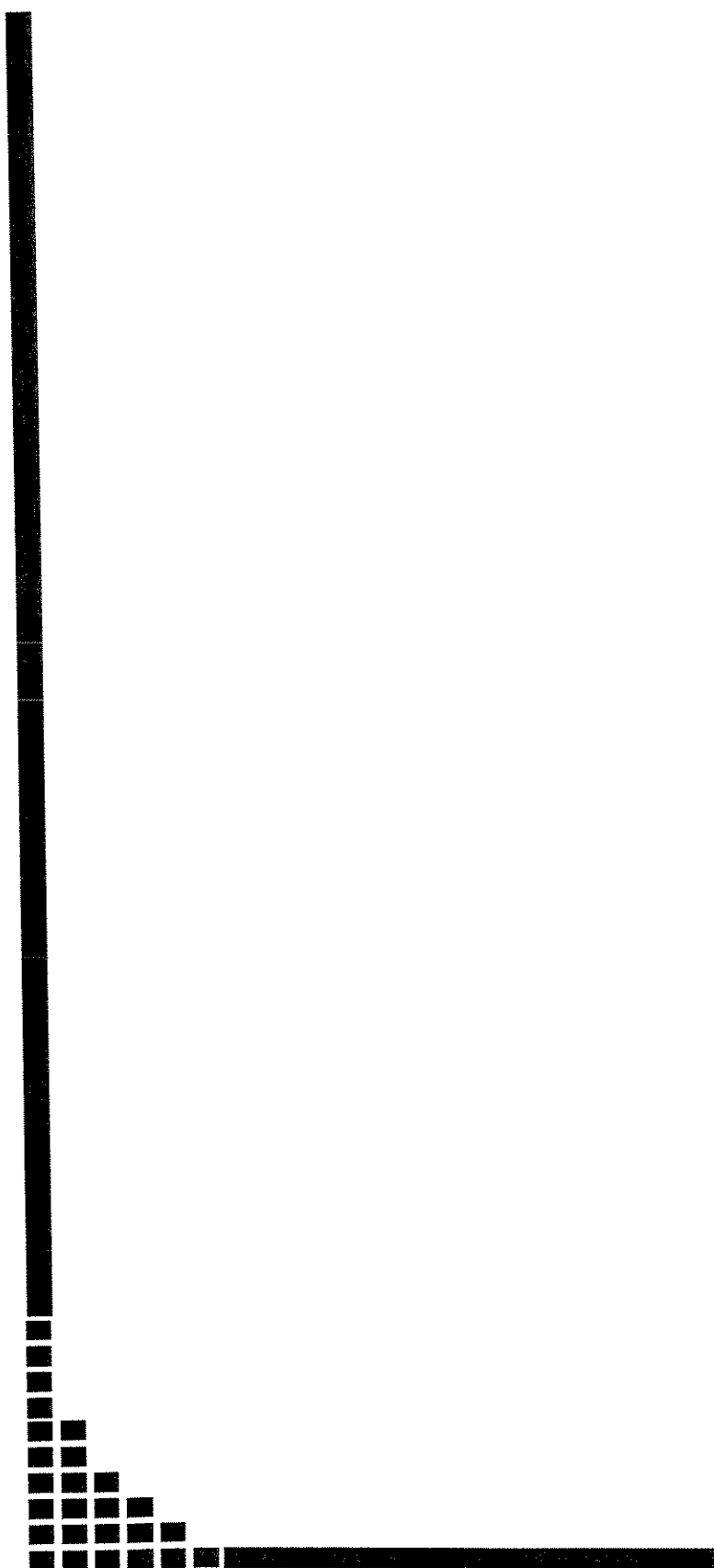
aumento da resposta vascular mediada pelo endotélio, após o uso de drogas redutoras do colesterol plasmático (LEUNG, LAU, WONG, 1993; EGASHIRA *et al.*, 1994; TREASURE *et al.*, 1995).

Outra vertente considerada para a preservação da função endotelial e sua repercussão na aterosclerose, refere-se ao controle da peroxidação lipídica das partículas de LDL e dos lípidos e proteínas da própria membrana da célula endotelial.

Dentro desta proposição, foram consideradas as substâncias denominadas antioxidantes. São agentes redutores intracelulares, capazes de desintoxicar os intermediários de oxigênio nas células (CHAMPE & HARVEY, 1994).

A vitamina E é reconhecida como um potente antioxidante. Espera-se que ela atue interrompendo o ciclo de reações oxidativas, mas não sobre a produção dos radicais livres e sua utilização tem sido considerada como possibilidade promissora no controle da aterosclerose. As vitaminas E consistem de oito tocoferóis, dos quais o alfa-tocoferol é o mais ativo (AMES, SHIGENAGA, HAGEN, 1993; PACKER & FUCHS, 1993; ZIMMER, THÜRICH, SCHEER, 1993).

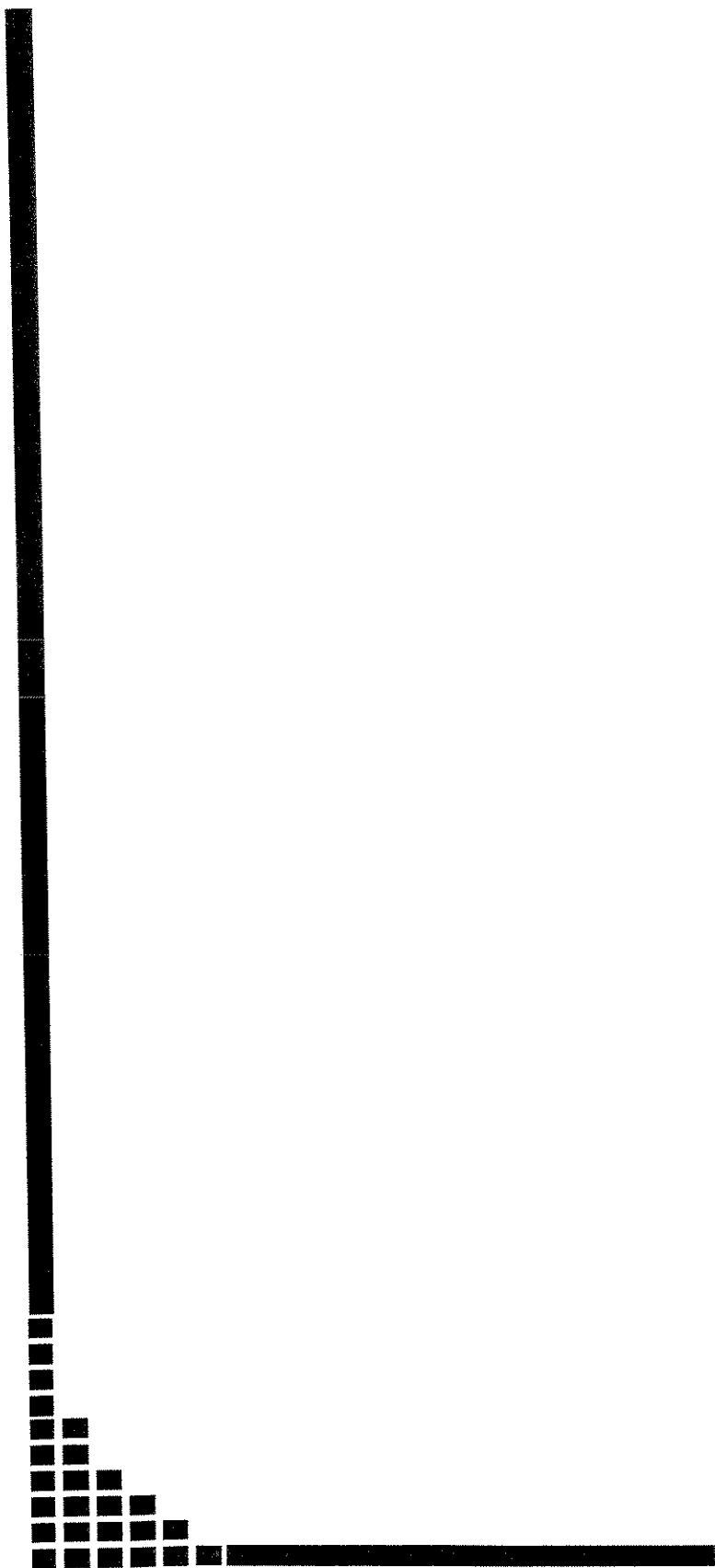
Dentro desta linha de pesquisa é que se propôs estudar o efeito da vitamina E sobre a peroxidação lipídica das LDL, sua influência sobre os lípidos plasmáticos e a função endotelial, na expectativa de que pudesse ter alguma aplicação clínica sobre a prevenção e o controle da aterosclerose.



2. OBJETIVOS

O objetivo principal do presente trabalho foi avaliar a influência da vitamina E sobre a disfunção endotelial coronária induzida pela hipercolesterolemia e analisada pela variação do fluxo coronário obtido durante a administração de ACH.

Como objetivo secundário, procurou-se verificar a influência da vitamina E sobre os valores do colesterol plasmático, o teor do colesterol tecidual e do MDA nos vasos coronários, buscando uma correlação com a função endotelial.



3. MATERIAL E MÉTODOS

As experiências foram realizadas de acordo com as recomendações do US NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH GUIDELINES FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS, utilizando-se 21 cães machos sem raça definida (SRD), com idade de 6 ± 2 anos e pesando em média $7,4 \pm 1,0$ kg, que foram divididos em 3 grupos: controle (N=7), hipercolesterolêmico (N=7) e vitamina E (N=7). Para evitar a influência dos níveis iniciais, relativamente elevados, do colesterol sérico que, naturalmente ocorrem nesta espécie animal, foram selecionados cães, com valores plasmáticos do colesterol entre 100 e 150 mg/dl.

Os animais do grupo hipercolesterolêmico foram alimentados com dieta contendo 5% (g/g) de colesterol e 10% (g/g) de óleo de coco, durante 40 dias. O grupo vitamina E recebeu a mesma dieta que o grupo hipercolesterolêmico, por tempo igual, acrescida de 400 UI de vitamina E, uma vez ao dia, durante os últimos 15 dias do estudo.

O colesterol, óleo de coco e a vitamina E foram administrados em um *bolus* de carne para garantir que fosse dada, a cada animal, a mesma quantidade de cada substância. O grupo-controle recebeu somente carne, como placebo.

Os níveis do colesterol plasmático, em mg/dl, foram medidos no 1º e 40º dia da experiência, utilizando-se “kits” enzimáticos e espectrofotômetro Beckman 700.

No 40º dia, os animais foram anestesiados com pentobarbital (30mg/kg) e ventilados por tubo endotraqueal. O tórax foi aberto no quinto espaço intercostal e o coração, exposto através do pericárdio. A artéria coronária descendente anterior esquerda foi dissecada para posicionar-se um fluxômetro eletromagnético (Caroline Instruments, Inc.) próximo ao óstio coronário. Em seguida, uma agulha ligada à bomba de infusão, foi introduzida na artéria coronária, para a administração de ACH e NPS. Outra agulha foi introduzida na aorta e conectada a um transdutor de pressão. Todos os parâmetros fisiológicos foram registrados em polígrafo Siemens do modelo Mingograph 804.

Após a estabilização dos parâmetros circulatórios, foram registrados a pressão da aorta e o fluxo coronário, em situação basal. A seguir, ACH foi administrada na dose de 5µg/kg/min., por 3 minutos. Durante o último minuto, a pressão da aorta e o fluxo

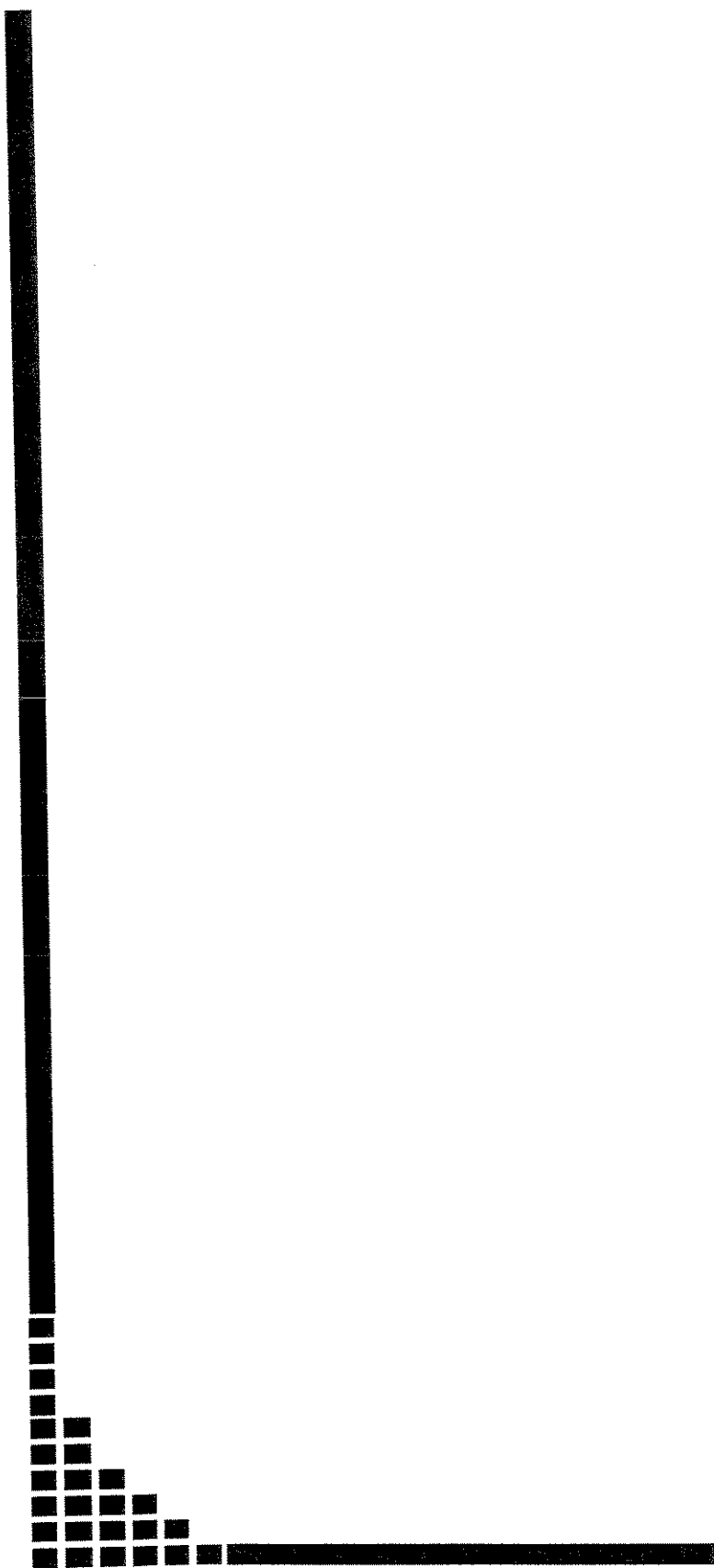
coronário foram novamente registrados. A mesma seqüência e dose foram usadas para a infusão do NPS. As doses utilizadas foram estabelecidas em experiências preliminares do nosso grupo, para este modelo experimental.

Os valores correspondentes ao fluxo coronário foram obtidos, recortando-se o contorno das curvas de fluxo registradas em papel e pesando em balança analítica. Os pesos obtidos, foram comparados antes e após a administração de ACH e NPS, caracterizando-se para cada grupo o percentual de variação do fluxo coronário.

As pressões foram determinadas, comparando-se a altura do pico sistólico e diastólico das curvas, com valor "standard".

O teor de colesterol, em segmentos da artéria coronária, foi determinado de acordo com o método de NAITO & DAVID (1981). As amostras foram secas e homogeneizadas a 4 °C em 5ml de 0,13 MTris-HCL, pH 7,4, contendo 0,01 M NaN₃. Os lípides totais foram extraídos por homogeneização em 10 volumes de clorofórmio-metanol (2:1 V/V), contendo, como antioxidante, 0,001% de hidroxitolueno. Uma segunda extração foi realizada através do procedimento de FOLCH & STANLEY (1956). O colesterol total foi então medido, usando-se o ensaio específico supramencionado, para análise do colesterol plasmático.

Neste estudo, a peroxidação lipídica foi avaliada, dosando-se o conteúdo tecidual de MDA, um dos produtos finais da peroxidação lipídica. As amostras de artéria coronária foram homogeneizadas em ácido tricloroacético (TCA) gelado (mg de tecido por ml de 10% de TCA). Após a centrifugação, adicionou-se volume de supernadante a igual volume de ácido tiobarbitúrico a 0,67%, sendo a mistura aquecida a 100 °C, por 20 minutos. A concentração resultante de MDA foi calculada através da absorção a 532 nm, utilizando-se coeficiente de extinção de $1,49 \times 10^{-5}$ e expressa em nmol/mg de tecido (CASSINI *et al.*, 1986).



4. RESULTADOS

No início do estudo, os cães pesavam em média 7.33 ± 1.05 , 6.75 ± 0.98 e 7.53 ± 0.65 kg e, no fim de 40 dias 7.87 ± 1.18 , 6.45 ± 0.97 e 7.87 ± 0.79 kg, nos grupos: controle, hipercolesterolêmico e vitamina E, respectivamente. Estes pesos não foram significativamente diferentes.

Os níveis do colesterol plasmático total são mostrados em Anexos, Figura 1 e Tabelas 4,5 e 6. Após 40 dias, o nível do colesterol plasmático, no grupo-controle, não foi significativamente diferente daquele encontrado no começo do estudo. Nos grupos: hipercolesterolêmico e vitamina E, os níveis do colesterol sérico aumentaram cerca de 203% e 198%, respectivamente, mas a diferença entre estes dois grupos não foi significativa.

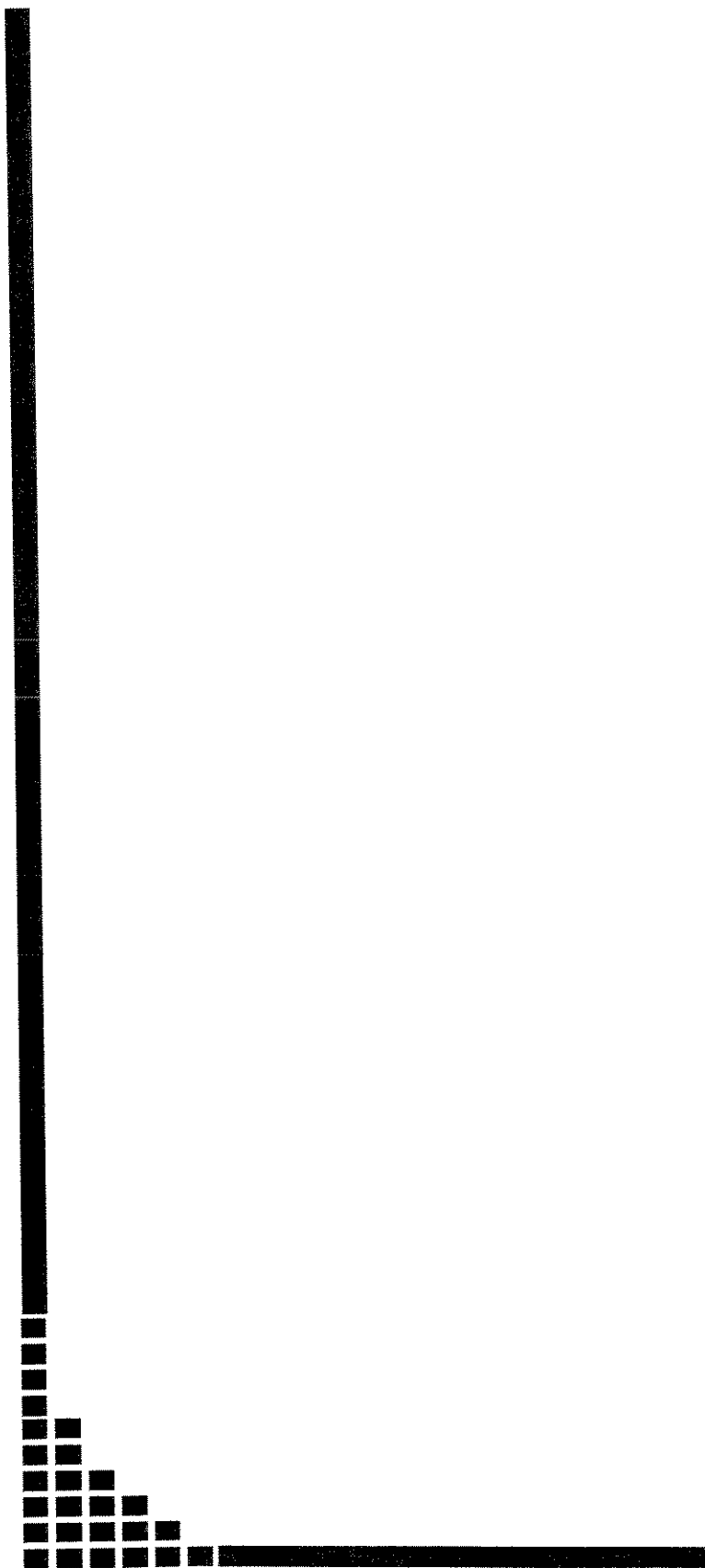
As pressões sistólica e diastólica da aorta e a frequência cardíaca não foram diferentes do controle, durante a administração de ACH, para cada animal e em qualquer dos grupos (Anexos, Tabelas 1,2,3).

Em Anexos, as Figuras 2 e 3 mostram o diagrama de dispersão dos valores do fluxo coronário expresso como a diferença percentual entre os valores basais e os obtidos durante a administração de ACH e NPS, respectivamente. O fluxo coronário aumentou $213.5 \pm 29.2\%$, durante a administração de ACH no grupo-controle, $118.4 \pm 27.7\%$, no grupo hipercolesterolêmico e $246.2 \pm 28.0\%$, no grupo da vitamina E (Anexos, Tabelas 1,2 e 3). A comparação da diferença de fluxo (%) entre o grupo hipercolesterolêmico e o grupo-controle foi significativa ($P < 0,05$), observando-se nítida redução do percentual no grupo hipercolesterolêmico. A comparação da diferença de fluxo (%), entre o grupo vitamina E e os grupos hipercolesterolêmico e controle, somente foi significativa em relação ao grupo hipercolesterolêmico ($P < 0,05$) (Figura 2). A diferença de fluxo coronário (%), durante a administração de NPS, foi de $193.3 \pm 13.9\%$ para o grupo-controle, de $192.5 \pm 14.9\%$ para o grupo hipercolesterolêmico e de $228.1 \pm 16.5\%$ para o grupo da vitamina E. A diferença percentual no fluxo coronário foi maior no grupo da vitamina E do que nos outros dois grupos ($P < 0.05$) (Figura 3).

O teor de colesterol nas artérias coronárias, no grupo da vitamina E, foi significativamente menor do que aquele observado no grupo hipercolesterolêmico ($P<0.05$), mas não foi diferente do grupo-controle (Anexos, Figura 4 e Tabelas 4,5 e 6).

Os valores do MDA nas artérias coronárias, no grupo hipercolesterolêmico, foram maiores do que aqueles observados no grupo-controle e no grupo da vitamina E ($P<0.05$). Os valores no último grupo foram, significativamente, menores do que aqueles do grupo-controle ($P<0.05$) (Anexos, Figura 5 e Tabelas 4,5 e 6).

A análise das alterações no fluxo coronário, no nível do colesterol plasmático, no teor do colesterol tecidual e no MDA, entre os grupos, mostrou que a hipercolesterolemia aumentou o nível do colesterol sérico, o teor do colesterol tecidual e o MDA na parede da artéria coronária, em relação ao grupo-controle. Por outro lado, foi reduzida a diferença percentual no fluxo coronário endotélio-dependente. A vitamina E reduziu o teor do colesterol tecidual e do MDA sem afetar, significativamente, o nível do colesterol sérico, quando comparado com o grupo hipercolesterolêmico. A diferença percentual no fluxo coronário endotélio-dependente aumentou no grupo da vitamina E.



5. DISCUSSÃO

O emprego de antioxidantes como proposição para preservar a função endotelial e prevenir a aterosclerose tem apresentado resultados conflitantes na literatura.

O trabalho inicial de KITA *et al.* (1987) demonstrou o efeito do probucol, antioxidante sintético, na redução da % da área de aterosclerose da aorta de coelhos Watanabe (WHHL). No trabalho de CAREW, SCHWENKE, STEINBERG (1987) comparou-se o efeito do probucol com a lovastatina também em coelhos WHHL. O probucol foi mais efetivo em reduzir a porcentagem da área de placas da aorta, sem interferir no nível do colesterol plasmático. Este medicamento aumentou a resistência da LDL à oxidação *in vitro*. Por este experimento, o probucol, sem interferir na concentração do colesterol plasmático, reduziu a área de aterosclerose, provavelmente prevenindo a peroxidação das LDL na célula endotelial e na íntima do vaso.

Também em pacientes hipercolesterolêmicos foi observado que o probucol foi capaz de reverter a disfunção endotelial (ANDERSON *et al.*, 1995).

De outro lado, o estudo de KEANEY Jr, GAZIANO, XU (1993) que comparou o efeito da vitamina E e do probucol em coelhos WHHL, na dose de 0.025 % (mg/mg), pelo período de 6 meses, mostrou que o probucol não interferiu na % de aterosclerose da aorta. No homem, o probucol não regrediu ou inibiu a progressão da aterosclerose femoral (WALDIUS *et al.*, 1988).

A superóxido dismutase (SOD), também foi testada no controle do "stress" oxidativo. MUGGE *et al.* (1991) verificaram que a administração SOD a coelhos hipercolesterolêmicos foi capaz de recompor o relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta torácica.

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que a vitamina E, antioxidante endógeno, aumenta a resistência da LDL às modificações oxidativas (DIEBER-ROTHEENEDER *et al.*, 1991; SUSUKAWA *et al.*, 1995) e pode influir sobre o risco de doença coronária (RIMM *et al.*, 1993 a).

STEWART-LEE *et al.* (1994) relataram que a dieta com vitamina E (0.2%) restaurou o relaxamento vascular induzido pela ACH em preparações de artéria carótida, obtidas de coelhos da raça Nova Zelândia, alimentados com 1% de colesterol. Os níveis de colesterol plasmático, destes animais, não foram significativamente afetados pela administração da vitamina E. QIAO *et al.* (1993) observaram que a administração de vitamina E a cobaias alimentadas com colesterol, diminuiu em 12.2% o nível do colesterol sérico total, após um mês. Além disto, houve redução da área de células espumosas e da distribuição de proteoglicanos na íntima. WÓJCICKI *et al.* (1991), administrando vitamina E a coelhos WHHL, na dose de 0.5 % (mg/mg), verificou redução da oxidação das LDL e diminuição em 32 % da área de aterosclerose da aorta. RIBEIRO JORGE *et al.* (1998) observaram reversão da disfunção endotelial em coelhos hipercolesterolêmicos, tratados com 50 UI de vitamina E, a par da redução do MDA das LDL plasmáticas e da parede arterial. Em humanos, JIALAL & GRUNDY (1992) demonstraram que a suplementação de vitamina E na dieta, reduziu a suscetibilidade da LDL à oxidação.

Os resultados do presente trabalho revelaram que a vitamina E reduziu a peroxidação lipídica na parede arterial, diminuiu a concentração do colesterol tecidual sem interferir no colesterol plasmático e reverteu a disfunção endotelial provocada pela hipercolesterolemia. Cabe destacar que o presente estudo utilizou como animal de experimentação o cão, analisando a função endotelial através da variação do fluxo coronário, na intenção de que o modelo experimental fosse mais próximo do que ocorre no homem. Entretanto, a maioria dos trabalhos que estudaram a influência da vitamina E sobre a função endotelial, utilizaram tiras de aorta de coelhos, como animal de experimentação.

O mecanismo provável, pelo qual a vitamina E preserva a função endotelial e influi na aterogênese, decorre de sua ação antioxidante. A vitamina E aumenta o conteúdo de alfa-tocoferol na estrutura da partícula de LDL, interferindo na cadeia de produção de radicais livres e por este mecanismo aumenta sua resistência à oxidação. Este fato tem sido observado em culturas de células do endotélio vascular (JESSUP *et al.*, 1990; BELCHER *et al.*, 1993).

Um dos assuntos sujeitos à discussão e relativo aos achados do presente trabalho refere-se ao mecanismo pelo qual ocorreu redução do teor de colesterol na parede da aorta, sem correspondente redução do colesterol plasmático. A interpretação deste achado é que a vitamina E incorpora-se também na estrutura da membrana da célula endotelial, intercala-se entre as moléculas de fosfolípídeos, fornecendo radicais H^+ , os quais interrompem a cadeia de reações que levam à peroxidação dos ácidos graxos e proteínas. A incorporação da vitamina E, dentro das membranas celulares e das LDL, é considerada condição indispensável para que ela possa desenvolver sua ação antioxidante (BARCLAY, BAILEY, KONG, 1985; FUKUZAWA, TAKASE, TSUKATANI, 1985).

Nestas condições, o controle da peroxidação de lípidos e proteínas, seja nas partículas de LDL, seja na membrana celular, preservaria o nível basal de NO^o e a função endotelial, permitindo então a movimentação do colesterol por um mecanismo de retroendocitose, que seria finalmente captado pelas partículas de HDL, reduzindo, por consequência, o teor de colesterol na parede arterial. Alguns trabalhos sugerem que o pré-tratamento do endotélio com vitamina E, pode inibir o dano decorrente da adesão dos neutrófilos na parede vascular, pela restauração da produção basal de NO^o e PGI_2 e a preservação da função endotelial (BOOGAERTS *et al.*, 1984).

Entretanto, alguns estudos, em que coelhos foram alimentados com dieta hipercolesterolêmica suplementada com vitamina E, têm fornecido resultados conflitantes sobre a capacidade desta substância de inibir a formação da lesão aterosclerótica (WESTROP, MILLER, WILSON, 1982; GODFRIED *et al.*, 1989; WILLIAMS *et al.*, 1992). Estas discrepâncias foram relacionadas a diferentes doses de vitamina E administradas. KLEINVEL, DEMACKER, STALENHOF (1994) demonstraram que a dose ideal de vitamina E, na dieta, está ao redor de 0,025 % (mg/mg). Com esta dose, observaram efeito antioxidante mais intenso da vitamina E, maior redução da lesão aterosclerótica da aorta, em coelhos WHHL, mas, sem diminuição dos níveis de colesterol plasmático. No presente estudo, a dose de vitamina E administrada foi cerca de 0,02% (mg/mg) (uma vez que os cães consumiram aproximadamente 200g/dia de ração) e não reduziu o nível do colesterol sérico.

Alguns achados em animais de experimentação e em humanos revelaram, entretanto, que a melhoria da peroxidação lipídica não guarda relação com a reversão da disfunção endotelial e merecem mais aprofundada reflexão. KEANEY, GAZIANO, XU (1994) relataram que a dose de aproximadamente 3000UI/dia, administrada a coelhos hipercolesterolêmicos por 28 dias, prolongou o tempo de oxidação das LDL, mas, paradoxalmente, não reduziu o relaxamento endotélio-dependente, em anéis de aorta desses animais. Em estudo realizado em pacientes hipercolesterolêmicos, utilizando antioxidantes, tais como, o beta caroteno, ácido ascórbico e vitamina E, GILLIGAN *et al.*, (1994), não observaram reversão da disfunção endotelial, avaliada pelo fluxo sanguíneo do antebraço, durante a administração de ACH, a despeito de significativa redução da susceptibilidade de oxidação das LDL. Estes autores utilizaram dose de 800 UI de vitamina E.

Outro ponto de reflexão refere-se aos resultados observados em estudos clínicos que analisaram a influência da vitamina E sobre a ocorrência de eventos e a mortalidade, em pacientes coronariopatas.

Vários estudos epidemiológicos têm relatado efeito protetor da vitamina E na doença coronária (GEY & PUSKA, 1989; RIEMERMAN *et al.*, 1991; RIMM *et al.*, 1993 b; REAVEN *et al.*, 1993).

O estudo CAMBRIDGE HEART ANTIOXIDANT STUDY (CHAOS) (STEPHENS *et al.*, 1996) de prevenção secundária, utilizou doses de vitamina E de 400 a 800 UI e mostrou redução de risco para infarto do miocárdio não fatal, mas não houve influência sobre a mortalidade total. Estes resultados, entretanto, foram revistos pelos autores, os quais verificaram que das 72 mortes observadas, 32 ocorreram no grupo placebo, 21 no grupo não tratado e somente 6 no grupo que recebeu vitamina E (MITCHINSON *et al.*, 1999). O estudo do GRUPPO ITALIANO PER LO STUDIO DELLA SOPRAVVIVENZA NELL'INFARTO MIOCARDICO (GISSI) (MARCHIOLI, 1999) apresentou resultados de interpretação complexa, embora as conclusões não revelassem benefício da vitamina E para pacientes que haviam sofrido infarto do miocárdio prévio. A dose de vitamina E utilizada foi de 300 UI. Este estudo foi motivo de diversas questionamentos na literatura. JIALAL *et al.* (1999) comentam que os resultados divulgados pelo estudo GISSI são inapropriados. Uma análise cuidadosa dos resultados

revelou redução de 20% de óbitos, de origem cardiovascular, 23% de mortes cardíacas e 35% de mortes súbitas. Estes autores concluem que a vitamina E traz um benefício potencial para a prevenção secundária da doença cardiovascular. O estudo THE HEART OUTCOMES PREVENTION EVALUATION STUDY INVESTIGATORS, 2000 (HOPE) mostrou que a vitamina E, quando comparada com o ramipril não apresentou valores significantes, em relação à redução de eventos e à mortalidade, quando comparada com indivíduos que receberam placebo. O estudo THE STUDY TO EVALUATE CAROTID ULTRASOUND CHANGES IN PATIENTS TREATED WITH RAMIPRIL AND VITAMIN E (SECURE) (LEEN *et al.*, 2001) também não mostrou influência da vitamina E sobre a placa de aterosclerose.

A análise da literatura permite concluir que a maioria dos trabalhos experimentais e clínicos, revela uma redução da peroxidação lipídica das partículas de LDL na hipercolesterolemia, quando tratada com vitamina E. O trabalho de KEANEY Jr *et al.* (1994), em que se utilizou dose maior de vitamina E, e, por conseqüência, maior proteção à oxidação das LDL, paradoxalmente, piorou a função endotelial. Resultados semelhantes chegou GILLIGAN *et al.* (1994) em pacientes hipercolesterolêmicos.

Se a vitamina E reduz a peroxidação lipídica e a disfunção endotelial está relacionada à LDL oxidada, porque ocorreu piora da função endotelial nestes estudos? Uma tentativa de explicação é dada por BOWRY & STOCKER (1992). Estes autores entendem que o alfa-tocoferol, quando em altas doses, pode aumentar a concentração de alfa-tocoferil nas partículas de LDL, que pode agir como radical oxidante. O NO^o também poderia reagir com alfa-tocoferol, para formar alfa-tocoferil. O fato de não ocorrer aumento da oxidação das LDL é explicado pelos autores, tendo em vista que a atividade pró-oxidante do alfa-tocoferol não é observada na presença de íons Cu⁺⁺, que foi utilizado na experiência para testar a resistência das LDL à oxidação.

De qualquer forma, estes achados conduzem a uma melhor reflexão sobre o real papel do "stress" oxidativo como mecanismo de doença. Embora pareçam existir evidências convincentes sobre o papel do "stress" oxidativo no desencadeamento de doenças, como hipertensão arterial, diabetes, aterosclerose e insuficiência cardíaca (KODJA &

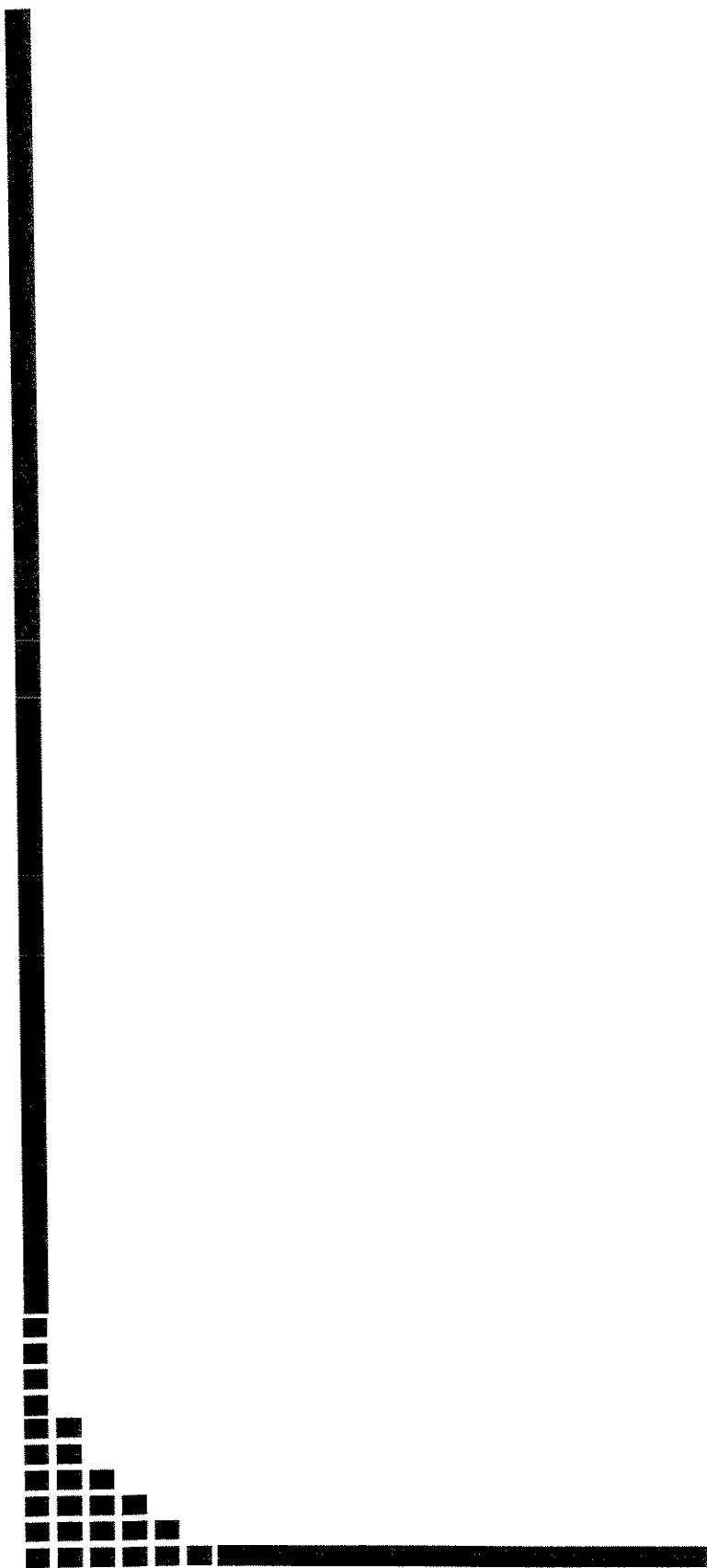
HARRISON, 1999) e a maioria dos trabalhos experimentais mostre reversão da disfunção endotelial, através da administração de SOD, restam dúvidas, porque o uso de antioxidantes, não preservou a função endotelial em alguns estudos experimentais e clínicos e porque não houve redução de eventos e da mortalidade, como concluem os grandes estudos randomizados, a despeito das controvérsias existentes.

Mais recentemente, o Dr. William A Pryor, renomado pesquisador e co- editor do jornal *Free Radical Biology & Medicine* (PRYOR, 2000) publicou uma ampla revisão relativa à vitamina E e deixa a seguinte mensagem :

Será extremamente difícil e provavelmente impossível, desenvolver "trials" que adequadamente testem a curva dose - efeito para a vitamina E. ... Também, os "trials" não serão capazes de distinguir entre pessoas que são responsivas e aquelas não responsivas (relacionado ao polimorfismo do gen para nitro óxido sintetase) e que estas últimas teriam um grande benefício com suplementação de vitamina E. ... Em vista do baixo risco de suplementação de vitamina E e a dificuldade de se obter mais que 15 a 30 UI/dia em uma dieta balanceada, existe atualmente, evidência suficiente para se recomendar suplementação de vitamina E (100 a 400 UI/dia) como parte de um programa de saúde-cardíaca que inclua frutas, vegetais e exercícios regulares.

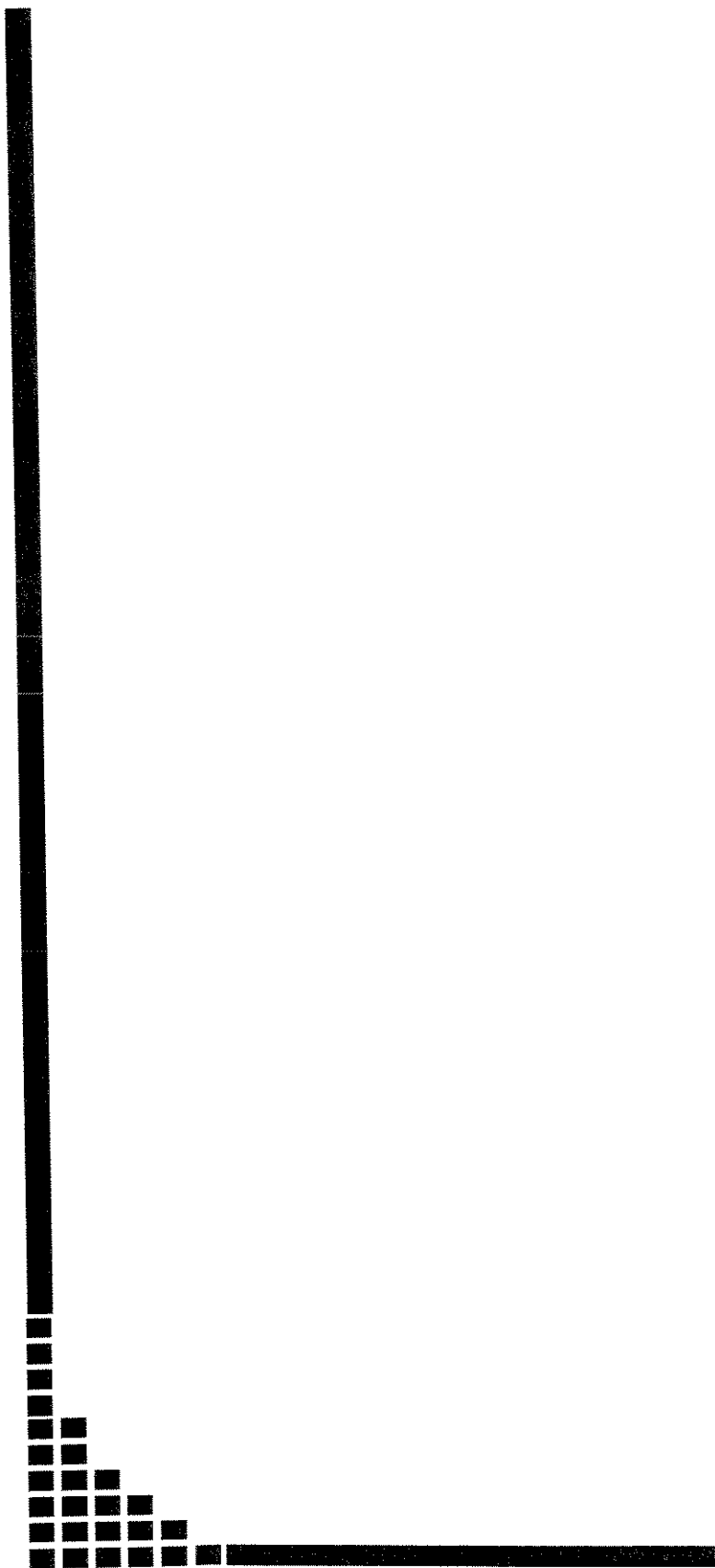
Como se pode depreender, o tema é controvertido e exige estudos científicos adicionais para esclarecimento mais definitivo destas importantes questões.

Este trabalho apresenta-se como uma contribuição ao assunto.



6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que a vitamina E, administrada a cães hipercolesterolêmicos, restaurou o fluxo sanguíneo coronário, revertendo a disfunção endotelial induzida pela hipercolesterolemia, reduziu o teor do colesterol tecidual e do MDA, sem influir nos valores do colesterol sérico.



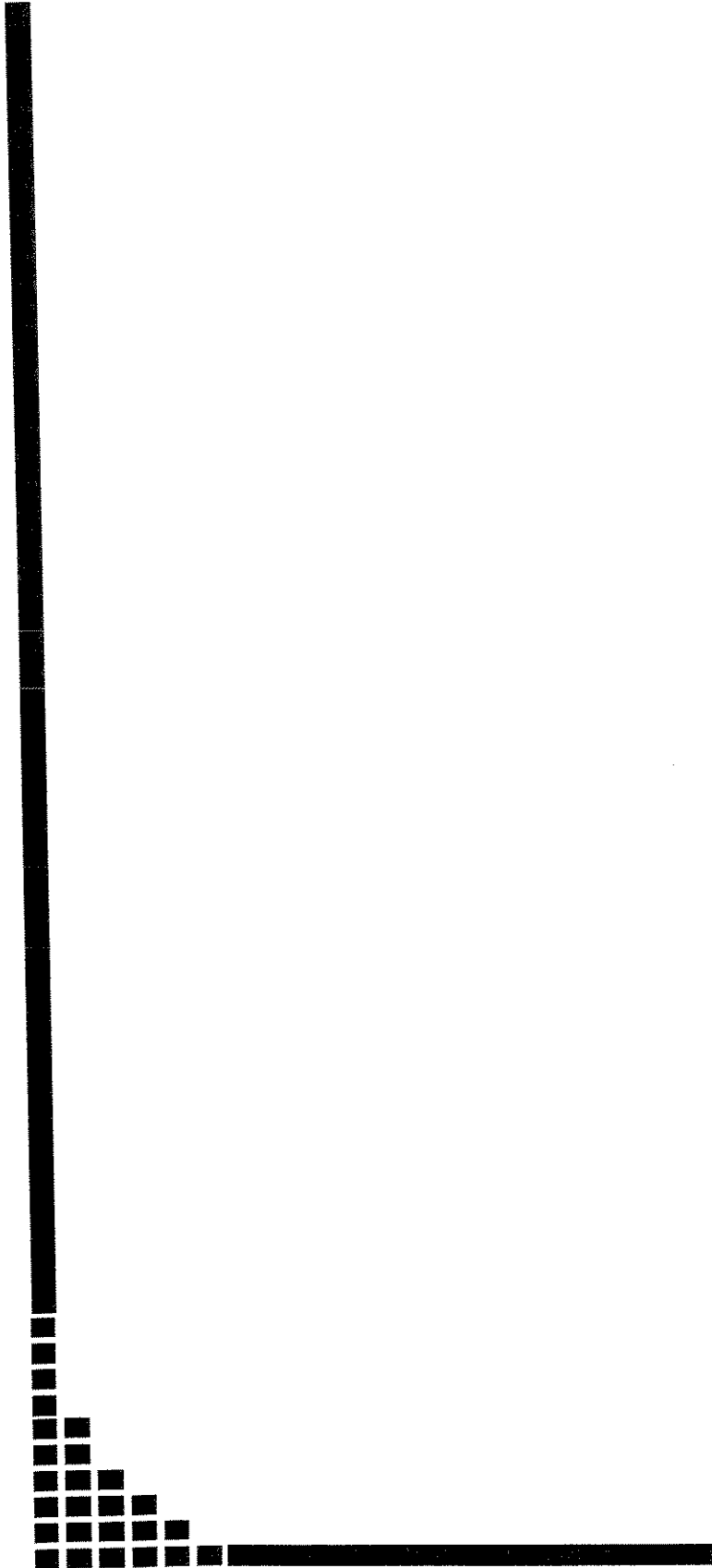
Para descrever os grupos são apresentadas as medidas de posição e dispersão (média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo) das variáveis contínuas (Anexos, Tabelas 4,5,6). O fluxo coronário foi expresso como a diferença percentual entre os valores basais do fluxo e aqueles obtidos durante a administração de ACH e NPS. A pressão sangüínea da aorta e a frequência cardíaca foram expressas em mmHg e batimentos por minuto, respectivamente. A concentração do colesterol plasmático e o teor de colesterol tecidual foram expressos em mg/dl e mg/mg de tecido, respectivamente. O MDA nas amostras de artéria coronária foi expresso em nmol/ mg tecido $\times 10^{-7}$.

Para comparação de 3 grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e nas comparações de 2 grupos independentes o teste de Mann-Whitney (CONOVER, 1971).

Para comparação de medidas avaliadas em dois momentos, na mesma unidade amostral, foi utilizado o teste de Wilcoxon para amostras relacionadas. (CONOVER, 1971).

O nível de significância adotado foi de 5% e a apresentação gráfica através de diagramas de dispersão.

Para análise estatística, utilizou-se o programa computacional SAS (1999-2000).

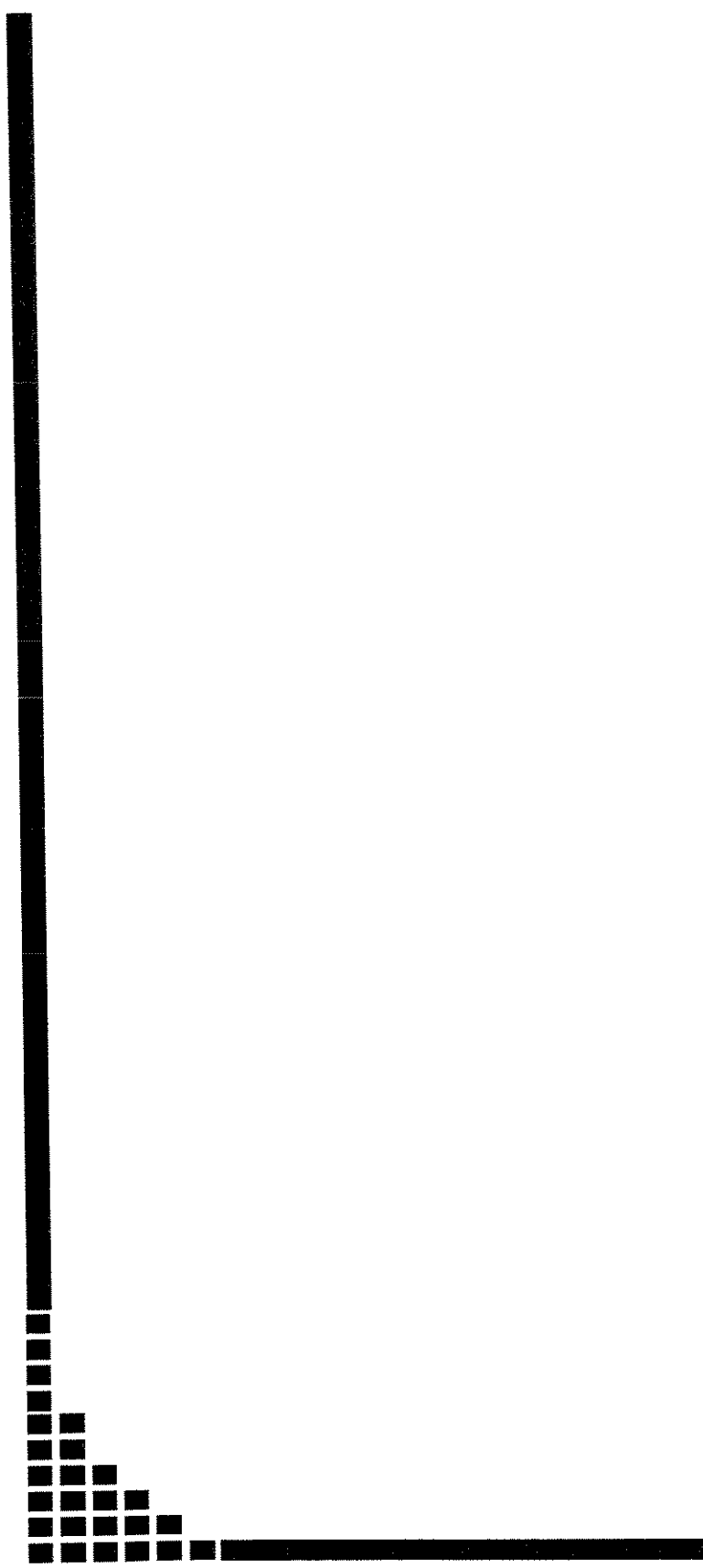


8. SUMMARY

The effects of vitamin E on endothelium-dependent coronary flow were studied in hypercholesterolemic dogs. Adult mongrel dogs weighing 7.4 ± 1.0 kg were divided into control, hypercholesterolemic and vitamin E groups. The animals in the hypercholesterolemic group were fed a diet enriched with cholesterol (5%w/w) and coconut oil (10%w/w) for 40 days. The vitamin E group received the same diet plus 400 IU of vitamin E during the last 15 days of the experiment. Total serum cholesterol levels were evaluated at the beginning and at the end of the experiment using a commercial enzyme kit and a Beckman analyzer. The coronary flow was determined by electromagnetic flowmetry using a probe positioned in the left anterior descending coronary artery, near the ostium. A needle connected to a perfusion pump was introduced into the coronary artery for the administration of acetylcholine and sodium nitroprusside at a rate of 5 μ g/kg per min. The aorta was cannulated for the measurement of arterial blood pressure via a pressure transducer coupled to a Siemens multi-channel recorder. The tissue cholesterol content and malonic dialdehyde (MDA) were also measured in isolated coronary vessel specimens. At the end of 40 days, the serum cholesterol levels had increased by 203% and 198% in the hypercholesterolemic and vitamin E groups, respectively. However, the difference in the levels of these two groups was not significant ($P > 0.05$). The aortic blood pressure and heart rate remained unchanged during acetylcholine administration. In contrast, systolic and diastolic pressure fell and the heart rate increased during the infusion of sodium nitroprusside.

The tissue cholesterol content and MDA were significantly ($P < 0.05$) increased in coronary artery specimens from the hypercholesterolemic compared to control animals. Vitamin E was able to reduce these increases in cholesterol treated animals ($P < 0.05$). The percent change in coronary flow during acetylcholine administration was significantly lower in the hypercholesterolemic group when compared with control animals ($P < 0.05$) but was unaltered in the vitamin E group ($P > 0.05$). During sodium nitroprusside administration, the coronary flow increased in the vitamin E group ($P < 0.05$). The authors conclude that hypercholesterolemia reduces endothelium-dependent coronary flow and increases the tissue cholesterol content and MDA of coronary arteries. Vitamin E decreases the MDA and the tissue cholesterol content without significantly affecting the total serum cholesterol level. Vitamin E may thus restore flow by reverting endothelial dysfunction.

Keywords: Vitamin E; Endothelium-dependent coronary flow; Hypercholesterolemia; Dog; Acetylcholine; Sodium nitroprusside.



9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROSE,J.A.; TANNENBAUN, M.A.; ALEXAPOULOS,D.; HJEMDAHL-MONSEN, C.E.; LEAVY,J.; WEIS,M.; BORRICO,S.; GORLIN,R.; FUSTER, V. - Angiographic progression of coronary artery disease and the development of myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol** 12:56-62, 1988.
- AMES,B.N.;SHIGENAGA,M.K.; HAGEN,T.M. - Oxidant, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc Natl Acad Sci USA** 90:7915-22, 1993.
- ANDERSON,T.J.; MEREDITH,I.T.; YEUNG,A.C.; FREI,B.; SELWIN,A.P.; GANZ,P. - The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. **N Engl J Med** 332:488-93, 1995.
- BARCLAY,L.R.; BAILEY,A.M.H.; KONG,D. - The antioxidant activity of alpha-tocopherol-bovine serum albumin complex in micellar and liposome autoxidations. **J Biol Chem** 26:15809-14, 1985.
- BELCHER,J.D.; BALLA,J.; BALLA,G.; JACOBS,D.R.; GROSS,M.; JACOB,H.S.; VERCELLOTTI,G.M. - Vitamin E, LDL and endothelium. **Arterioscler Thromb** 13:1779-89, 1993.
- BOOGAERTS,M.A.; VAN DE BROECK,J.; DECKMIN,H.; ROELANT,C.; VERMYLEN, J.; VERWILGHEN,R. - Protective effects of vitamin E on immune triggered granulocyte mediated endothelial injury. **Thromb Haemost** 51:89-92, 1984.
- BOWRY,V.K.U. & STOCKER,R. - Vitamin E in human low-density lipoprotein, when and how this antioxidant becomes a pro-oxidant. **Biochem J** 288:341-4, 1992.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE . Estatísticas de mortalidade 1989. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1993.
- CAREW,T.E.; SCHWENKE,D.C.; STEINBERG,D. - An antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: evidence that antioxidants *in vivo* can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage rich fatty streaks slowing down the progression of atherosclerosis in WHHL rabbits. **Proc Natl Acad Sci USA** 84:7725-9, 1987.

- CASSINI, A.F.; FERRALI, M.; POMPELLA, A.; MAELLARO, E.; COMPORTI, M. - Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissue of bromobenzene-intoxicated mice. *Am J Pathol* 123:520-31, 1986.
- CHAMPE, P. & HARVEY, R. - *Biochemistry*. Philadelphia, Lippincott Company, 1994.
- CONOVER, W.J. - *Practical nonparametric Statistics*. New York, John Wiley & Sons Inc., 1971.
- DIEBER-ROTHEENEDER, M.; PUHL, H.; WAEG, G.; STRIEGL, G.; ESTERBAUER, H. - Effect of oral supplementation with D-alpha-tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. *J Lipid Res* 32:1325-32, 1991.
- DOWNS, J.R.; CLEARFIELD, M.; WEIS, S.; WHITNEY, E.; SHAPIRO, D.R.; BEERE, P.A.; LANGENDORFER, A.; STEIN, E.A.; KRUYER, W.; GOTTO, A.M.JR. - Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force / Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 279:1615-22, 1998.
- EGASHIRA, K.; HIROOKA, Y.; KAI, H.; SUGIMACH, M.; SUZUKI, S.; INOU, T.; TAKESHITA, A. - Reduction in serum cholesterol with Pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia. *Circulation* 89:2519-24, 1994.
- FLAVAHAN, N.A. - Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. *Circulation* 85:1927-38, 1992.
- FOLCH, J.M. & STANLEY, G.H.S. - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 226:497-509, 1956.
- FUKUZAWA, K.; TAKASE, S.; TSUKATANI, H. - The effect of concentration on the antioxidant effectiveness of alfa-tocopherol of lipid peroxidation induced by superoxide Free Radical. *Arch Biochem Biophys* 240:117-20, 1985.

- GEY,K.F. & PUSKA,P. - Plasma vitamin E is inversely correlated to mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. **Ann NY Acad Sci** 570:268-82, 1989.
- GILLIGAN,D.M.; SACK,M.N.; GUETTA,V.; CASINO,P.R.; QUYYUMI,A.A.; RADER,D.J.; PANZA,J.; CANON III,R.O. - Effect of antioxidant vitamins on Low Density Lipoprotein oxidation and impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with hypercholesterolemia. **JACC** 24:1611-7, 1994.
- GODFRIED,S.S.L.; COMBS,G.F.; SARAOKO,J.M.; DILLINGHAN,L.A. - Potentiation of atherosclerotic lesions on rabbits by a high dietary level of vitamin E. **Br J Nutr** 61: 607-17, 1989.
- GOULD,K.LANCE - **Coronary Artery Stenosis**. New York, Elsevier Science Publishing Co., Inc., c1991.
- HARRISON,D.G.; ARMSTRONG,M.L.; FREIMAN,P.C.; HEISTAD,D.D. - Restoration of endothelium-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis. **J Clin Invest** 80:1808-11, 1987.
- THE HEART OUTCOMES PREVENTION EVALUATION STUDY INVESTIGATORS. - Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high risk patients. **N Engl J Med** 342:154-60, 2000.
- HENNING,B. & CHOW,C.K. - Lipid peroxidation and endothelial cell injury: implications in atherosclerosis. **Free Rad Biol Med** 4:99-106, 1988.
- JANG,J; LINCOFF,A.M.; PLOW,E.F. - Cell adhesion molecules in coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol** 24:1591-601, 1994.
- JAYAKODY,L.; SENARATNE,M.; THOMSON,A.; KAPPAGODA,T. - Endothelium-dependent relaxation in experimental atherosclerosis in the rabbit. **Circ Res** 60:251-64, 1987.
- JESSUP,W.; RANKIN,S.M.; WHALLEY,C.V.; HOULT,J.R.S.; SCOTT,J.; LEAKE,D.S. - Alpha-tocopherol consumption during low density lipoprotein oxidation. **Biochem J** 265:399-405, 1990.

- JIALAL,I.; DEVAJARAJ,S.; HUET,B.A.; TRABER,M. - GISSI-prevenzione trial (letter to editor) **Lancet** **354**:1554, 1999.
- JIALAL,I. & GRUNDY,S. - Effects of dietary supplementation with alfa-tocoferol on the oxidative modification of low density lipoprotein. **J Lip Res** **33**:899-906, 1992.
- KEANEY Jr,J.F.; GAZIANO,J.M.; XU,A. - Dietary antioxidants preserve endothelium-dependents vessel relaxation in cholesterol fed rabbits. **Proc Natl Acad Sci USA** **90**:11880-4, 1993.
- KEANEY Jr,J.F.; GAZIANO,J.M.; XU,A. - Low-dose a-tocoferol improves and high doses a-tocoferol worsens endothelial vasodilator function in cholesterol-fed rabbits. **J Clin Invest** **93**:844-51, 1994.
- KITA,T.; NAGANO,Y.; YOKODE, M.; ISHII, K.; KUME, N.; OSHIMA, A.; YOSHIDA, H.; KAWAI, C. - Probucol prevents the progression of atherosclerosis in the WHHL rabbit, an animal model for familiar hypercholesterolemia. **Proc Natl Acad Sci USA** **84**:5928-31, 1987.
- KLEINVEL, H.A.; DEMACKER, P.N.M.; STALENHOEF, A.F.H. - Comparative study on the effect of low-dose vitamin E and Probucol on the susceptibility of LDL to oxidation and the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **Arterioscler Thromb** **14**:1386-91, 1994.
- KODJA,G. & HARRISON,D. - Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological impotance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. **Cardiovas Res** **43**:562-71, 1999.
- LEEN,E.; YUSUF,S.; SZAVIK,V.; YI,Q.; SMITH,S.; MOORE COX,A.; BOSCH,J.; RILEY,W.; TEO,K. - Effects of ramipril and vitamin E on atherosclerosis: the study to evaluate carotid ultrasound changes in patients treated with ramipril and vitamin E (SECURE). **Circulation** **103**:919-25, 2001.
- LEUNG, W.H.; LAU, C.P.; WONG, C.K. - Beneficial effect of cholesterol-lowering therapy on coronary endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolemic patients. **Lancet** **341**:1496-500, 1993.

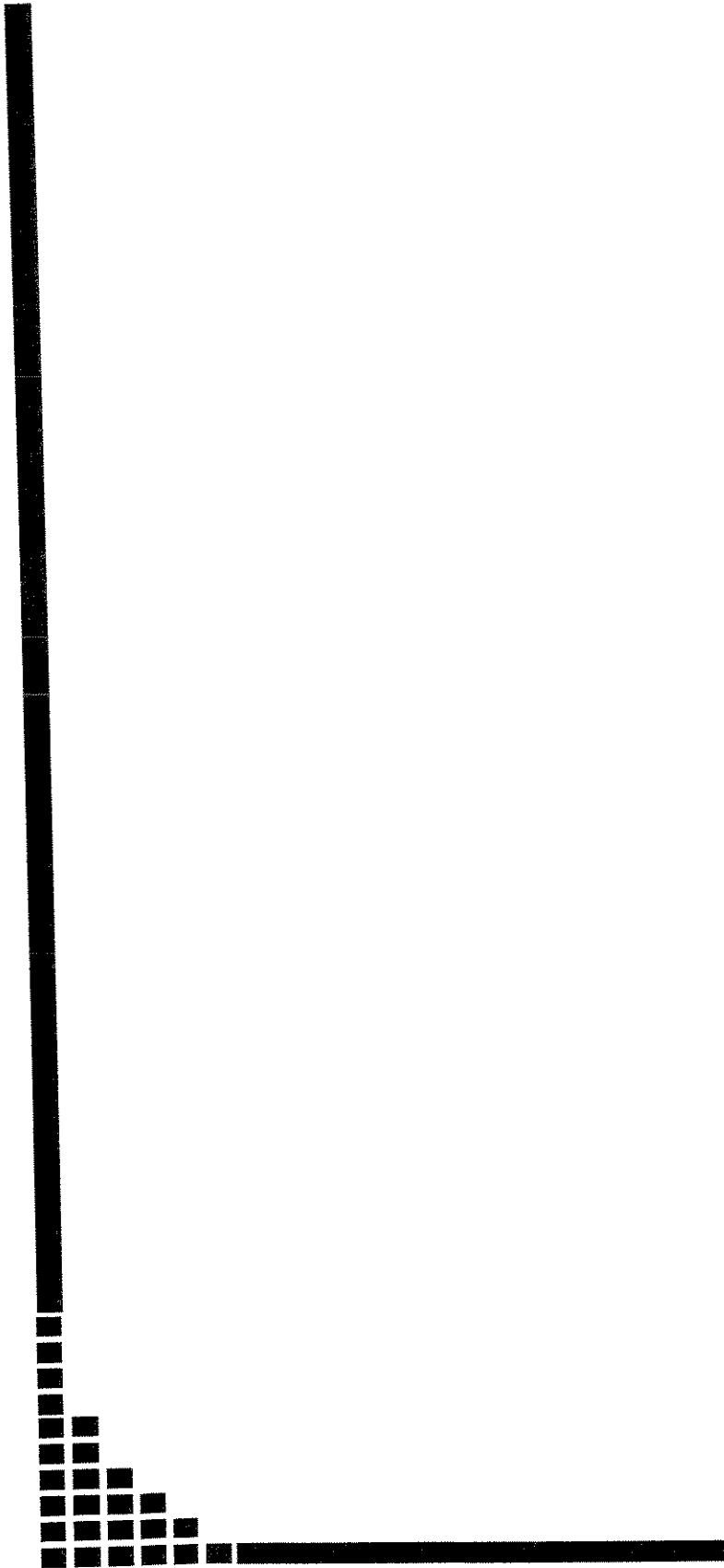
- THE LONG TERM INTERVENTION WITH PRAVASTATIN IN ISCHAEMIC DISEASE (LIPID) STUDY GROUP. - Prevention of Cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N Engl J Med* **339**:1349-57, 1998.
- LUDMER,P.L.; SELWYN,A.P.; SHOOK,T.L.; WAYNE,R.R.; MUDGE,G.H.; ALEXANDER,W.; GANZ,P. - Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* **315**:1046-51, 1986.
- LUSCHER,T.F. - The endothelium and cardiovascular disease: a complex relation. *N Engl J Med* **15**:1081-3, 1994.
- LUSCINKAS,F.W.; KANSAS,G.F.; DING,H. - Monocyte rolling, arrest and apreading on IL-4 activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, B1 integrins and B2 integrins. *J Cell Biol* **125**:1417-27, 1994.
- MARCHIOLI,R. - GISSI-Prevenzione investigators. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI - prevenzione trial. *Lancet* **354**:447-55, 1999.
- MEREDITH,I.T.; YEUNG,A.C.; WEIDINGER,F.F.; ANDERSON,T.J.; UEHATA,A.; RYAN,T.J.; SELWYN,A.P.; GANZ,P. - Role of impaired endothelium-dependent vasodilation in ischemic manifestations of coronary artery disease. *Circulation* **87**(suppl 5):V56-V66, 1993.
- MITCHINSON,M.J.; STEPHENS,N.G.; PARSONS,A.; BLIGH,E.; SCHOFIELD,P.M.; BROWN,M.J. - Mortality in the CHAOS trial. *Lancet* **353**:381-2, 1999.
- MUGGE,A.; ELMELL,J.H.; PETERSON,T.E.; HOFMAYER,T.G.; HEISTAD,D.D.; HARRISON,D.G. - Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* **69**:1293-300, 1991.
- NAITO,H.K. & DAVID,J.A. - Laboratory consideration: determination of cholesterol, triglycerides, phospholipids and others lipids in blood and tissues. In: _____ **Laboratory and Research Methods in Biology and medicine: Lipid research methodology**. New York, Alan R. Liss, Inc., 1981. p.1-76.

- OSBORNE, J.A.; LENTO, P.H.; SIEGFRIED, M.R.; STHAL, G.L.; FUSMAN, B.; LEFER, A.M. - Cardiovascular effects of acute hypercholesterolemia in rabbits: reversal with Lovastatin treatment. **J Clin Invest** 83:465-73, 1989 a.
- OSBORNE, J.A.; SIEGMAN, M.J.; SEDAR, A.W.; MOOERS, S.U.; LEFER, A.M. - Lack of endothelium-dependent relaxation in coronary resistance arteries of cholesterol-fed rabbits. **Am J Physiol** 256:C591-C597, 1989 b.
- PACKER, L. & FUCHS, J. - **Vitamin E in health and disease**. New York, Marcel Dekker, 1993.
- PRYOR, A.W. - Vitamin E and heart disease: basic science to clinical interventions trials. **Free Radical Biology & Medicine** 28:141-64, 2000.
- QIAO, Y.; YOKOYAMA, M.; KAMEYAMA, K.; ASANO, G. - Effect of vitamin E on vascular integrity in cholesterol-fed guinea pigs. **Arterioscler Thromb** 13:1885-992, 1993.
- REAVEN, P.D.; KHOUW, A.; BELTZ, W.F.; PARTHASARATHY, S.; WITZTUM, J. - Effect of dietary antioxidant combinations in humans. **Arterioscler Thromb** 13:590-600, 1993.
- RIBEIRO JORGE, P.A.; NEYRA, L.C.; OZAKI, R.M.; ALMEIDA, E. - Improvement in the endothelium-dependent relaxation in hipercholesterolemic rabbits treated with vitamin E. **Atherosclerosis** 140:333-9, 1998.
- RIBEIRO JORGE, P.A.; OZAKI, M.R.; METZE, K. - Effects of Simvastatin and Pravastatin on endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolemic rabbits. **J Tox Exp Pathol** 46:465-9, 1994.
- RIEMERMAN, R.A.; WOOD, D.A.; MACINTYRE, C.C.A.; ELTON, R.A.; GEY, K.F.; OLIVER, M.F. - Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A, C and E and carotene. **Lancet** 337:1-5, 1991.
- RIMM, E.B.; STAMPFER, M.J.; ASCHERIO, A.; GIOVANNUCCI, E.; COLDITS, G.A.; WILLET, W.C. - Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in men. **N Engl J Med** 328:1450-6, 1993 a.

- RIMM, E.B.; STAMPFER, M.J.; ASCHERIO, A.; GIOVANNUCCI, E.; COLDITZ, G.A.; WILLET, C.C. - Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. **N Engl J Med** 328:1444-9, 1993 b.
- SACKS, F.M.; PFEFFER, M.A.; MOVE, L.A.; ROULEAU, J.L.; RUTHERFORD, J.D.; COLE, T.G.; BROWN, L.; WAYNE, J.W.; MALCHOLM, J.O.A.; BRAUNWALD, E. - For the cholesterol and recurrent events trial investigators. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. **N Engl J Med** 335:1001-9, 1996.
- SAS System for Windows (Statistical Analysis System), version 8.1. SAS Institute Inc, 1999-2000, Cary, NC, USA.
- THE SCANDINAVIAN SIMVASTATIN SURVIVAL STUDY GROUP (4S). Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. **Lancet** 344:1383-9, 1994.
- SCHWARTZ, C.J.; VALENTE, A.J.; SPRAGUE, E.A. - The pathogenesis of atherosclerosis. An overview. **Clin Cardiol** 14:11-116, 1991.
- SHEPERD, J.; COBBE, S.M.; FORD, I.; ISLES, C.G.; LORIMER, A.R.; MacFARLANE, P.W., et al., for the West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. **N Engl J Med** 333:1301-7, 1995.
- SIMIONESCU, N. & SIMIONESCU, M. - **Endothelial cell biology in health and disease**. New York, Plenum Press, c1988.
- STEPHENS, N.G.; PARSONS, A.; SCHOFIELD, P.; KELLY, F.; CHEESEMAN, K.; MITCHINSON, M.J.; BROWN, M.J. - Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge heart antioxidant study (CHAOS). **Lancet** 347:781-6, 1996.
- STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E.; KHOO, J.C.; WITZTUM, J.L. - Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoproteins that increase atherogenicity. **N Engl J Med** 320:915-24, 1989.

- STEWART-LEE,A.L.; FORSTER,L.A.; NOUROOZ-ZADEH,J.; FERNS,G.A.A.;
ANGGARD,E.E. - Vitamin E protects against impairment of endothelium-mediated
relaxations in cholesterol-fed rabbits. **Arterioscler Thromb** 14:494-9, 1994.
- SUSUKAWA,M.; ISHIKAWA,T.; YOSHIDA,H.; NAKAMURA,H. - Effect of *in-vivo*
supplementation with low-dose vitamin E on susceptibility of low-density lipoprotein
and high-density lipoprotein to oxidative modification. **J Am Coll Nutr** 14:46-52,
1995.
- TREASURE, C.B.; KLEIN, J.L.; WEINTRAUB, W.S.; TALLEY, D.J.; STILLABOWER,
M.E.; KOSINSKI, A.S.; ZHANG, J.; BOCCUZZI, S.J.; CEDARHOLM, J.C.;
ALEXANDER, R.W. - Beneficial effect of cholesterol-lowering therapy on the
coronary endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolemic patients.
Lancet 332:481-7, 1995.
- US NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH GUIDELINES FOR THE CARE AND USE
OF LABORATORY ANIMALS. NIH Publication. No. 85-23, 1985.
- WALLDIUS,G.; CARLSON,L.A.; ERIKSON,V.; OLSSON,A.G.; JOHANSSON,J.;
MOLGOARD,J.; NIELSON,S.; STENPORT,G.; KAIJSER,L. - Development of
femoral atherosclerosis in hypercholesterolemic patients during treatment with
cholestyramine and probucol/placebo. Probucol Quantitative Regression Swidish
Trial (PQRST): a status report. **Am J Cardiol** 62 (3):37B-43B, 1988.
- WEBSTER, M.W.I.; CHESEBRO, J.H.; SMITH, H.C.; FRYE, R.L.; HOLMES, D.R.;
REEDER, G.S.; BRESNAHAN, D.R.; NISHIMURA, R.A.; CLEMENTS, I.P.;
BARDSLEY, W.T.; GRILL, D.E.; BAILEY, K.R.; FUSTER, V. - Myocardial
infarction and coronary artery occlusion; a prospective 5-year angiographic study.
J Am Coll Cardiol 15:218A, 1990.
- WESTROP,K.L.; MILLER,R.A.; WILSON,R.B. - Vitamin E in a rabbit model of
endogenous hypercholesterolemia and atherosclerosis. **Nut Rep Int** 25:83-8, 1982.

- WILLIAMS,R.J.; MOTTERAN, J.M.; SHARP, C.H.; GALLAGHER, P.J. - Dietary vitamin E and the attenuation of early lesion development in modified Watanabe rabbits. **Atherosclerosis** 94:153-9, 1992.
- WITZTUN,J.L. & STEINBERG,D. - Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. **J Clin Invest** 88:1785-92, 1991.
- WÓJCICKI,J.; RÓZEWICKA,L.; BARCEW-WIZNEWSKA,B.; SAMOCHOWIEC,L.; JUZWIAK,S.; KADLUBOWSKA,D.; TUTANOWSKI,S.; JUZYSZYYN,Z. - Effect of selenium and vitamin E on the development of experimental atherosclerosis in rabbits. **Atherosclerosis** 87:9-16, 1991.
- ZIMMER,G.; THÜRICH,T.; SCHEER,B. - Membrane fluidity and vitamin E. In: PACKER,L. & FUCHS, J., eds. - **Vitamin E in health and disease**. New York, Marcel Dekker, 1993. p. 207-222.



10. ANEXOS

Tabela 1: Valores do fluxo coronário, frequência cardíaca e pressão aórtica, durante administração de acetilcolina, no grupo-controle.

	FLUXO CORONÁRIO		FREQÜÊNCIA CARDÍACA (bat/ min)	PRESSÃO AÓRTICA (mmHg)	
	(mg)	%D		Sistólica	Diastólica
C1	3.6		117	130	80
ACH	11.2	213.5	117	130	80
C2	3.4		115	126	77
ACH	11.8	246.2	115	126	77
C3	4.2		140	132	79
ACH	11.7	180.9	140	132	79
C4	3.7		118	142	86
ACH	12.1	229.5	118	142	86
C5	2.8		145	116	77
ACH	8.3	197.6	145	116	77
C6	4.6		143	145	88
ACH	16.0	248.6	143	145	88
C7	2.3		118	132	83
ACH	6.4	178.3	118	132	83

C = valores controle; ACH = valores durante a administração de acetilcolina;

% D = diferença percentual entre os fluxos coronários para cada animal.

Tabela 2: Valores do fluxo coronário, frequência cardíaca e pressão aórtica, durante administração de acetilcolina, no grupo hipercolesterolêmico.

	FLUXO CORONÁRIO		FREQÜÊNCIA CARDÍACA (bat / min)	PRESSÃO AÓRTICA (mmHg)	
	(mg)	%D		Sistólica	Diastólica
C1	3.0		148	122	92
ACH	6.5	118.2	148	122	92
C2	2.8		130	128	75
ACH	5.1	83.4	130	128	75
C3	3.8		138	130	82
ACH	9.6	153.6	138	130	82
C4	4.0		140	126	80
ACH	9.4	136.5	140	126	80
C5	4.6		120	102	72
ACH	12.9	101.4	120	102	72
C6	2.4		138	128	78
ACH	5.9	146.4	138	128	78
C7	2.2		132	135	73
ACH	4.1	90.5	132	135	73

C = valores controle; ACH = valores durante a administração de acetilcolina;

% D = diferença percentual entre os fluxos coronários para cada animal.

Tabela 3: Valores do fluxo coronário, frequência cardíaca e pressão aórtica, durante a administração de acetilcolina, no grupo vitamina E.

	FLUXO CORONÁRIO		FREQÜÊNCIA CARDÍACA (bat / min)	PRESSÃO AÓRTICA (mmHg)	
	(mg)	%D		Sistólica	Diastólica
C1	3.2		135	138	78
ACH	11.0	246.5	135	138	78
C2	3.6		148	122	74
ACH	13.1	265.3	148	122	74
C3	4.2		122	133	80
ACH	13.7	228.4	122	133	80
C4	3.0		150	142	83
ACH	11.3	276.8	150	142	83
C5	3.8		130	140	76
ACH	12.0	216.9	130	140	76
C6	3.4		144	120	75
ACH	12.8	278.2	144	120	75
C7	2.8		138	136	70
ACH	8.7	211.4	138	136	70

C = valores controle; ACH = valores durante a administração de acetilcolina;

%D = diferença percentual entre os fluxos coronários para cada animal.

Tabela 4: Medidas de posição e dispersão das variáveis contínuas relativas ao grupo-controle.

	N	MÉDIA	DP	MAX	MEDIANA	MIN
Peso inicial (PI)	6	7.33	1.05	8.4	7.65	5.9
Peso final (PF)	6	7.87	1.18	9.2	7.95	6.4
Colesterol inicial (COL I)	4	136.78	11.6	147.9	139.35	120.5
Colesterol final (COL F)	5	136.11	10.92	148.32	137.5	119.4
Colesterol tecidual (COL TEC)	5	8.77	0.21	9.07	8.77	8.47
Ácido malonodialdeído (MDA)	5	8.18	0.54	8.94	8.19	7.45
Diferença fluxo coronário com acetilcolina	7	213.5	29.17	248.5	213.5	178.1
Diferença fluxo coronário com nitroprussiato	7	193.33	13.94	213.4	193.5	173.1
Fluxo coronário - Valores controle	7	3.51	0.78	4.6	3.6	2.3
Fluxo coronário - Valores durante a administração de acetilcolina	7	11.07	3.05	16	11.7	6.4
Frequência cardíaca	7	128	13.83	145	118	115
Pressão aórtica sistólica	7	131.86	9.7	145	132	116
Pressão aórtica diastólica	7	81.43	4.35	88	80	77

N = número de animais; DP = desvio padrão;

MAX = valor máximo; MIN = valor mínimo

Tabela 5: Medidas de posição e dispersão das variáveis contínuas relativas ao grupo hipercolesterolêmico.

	N	MÉDIA	DP	MAX	MEDIANA	MIN
Peso inicial (PI)	6	6.75	0.98	8.2	6.45	5.8
Peso final (PF)	6	6.45	0.97	8	6.15	5.4
Colesterol inicial (COL I)	6	139.27	29.65	175.5	129.3	107.5
Colesterol final (COL F)	7	422.78	15.95	452.08	418.4	405
Colesterol tecidual (COL TEC)	6	11.02	0.63	11.7	10.97	10.24
Ácido malonodialdeído (MDA)	4	29.38	10.51	44.7	26	20.8
Diferença fluxo coronário com acetilcolina	7	118.41	27.69	153.5	118.2	83.4
Diferença fluxo coronário com nitroprussiato	7	192.5	14.94	214.2	194.2	169.2
Fluxo coronário - Valores controle	7	3.26	0.89	4.6	3	2.2
Fluxo coronário - Valores durante a administração de acetilcolina	7	7.64	3.11	12.9	6.5	4.1
Frequência cardíaca	7	135.14	8.86	148	138	120
Pressão aórtica sistólica	7	124.43	10.64	135	128	102
Pressão aórtica diastólica	7	78.86	6.84	92	78	72

N = número de animais; DP = desvio padrão;

MAX = valor máximo; MIN = valor mínimo

Tabela 6: Medidas de posição e dispersão das variáveis contínuas relativas ao grupo Vitamina E.

	N	MÉDIA	DP	MAX	MEDIANA	MIN
Peso inicial (PI)	6	7.53	0.65	8.3	7.55	6.8
Peso final (PF)	6	7.87	0.79	9	7.9	6.9
Colesterol inicial (COL I)	5	138.86	17.61	167.3	132.4	120.8
Colesterol final (COL F)	6	414.15	23.85	442.3	411.83	384.2
Colesterol tecidual (COL TEC)	5	6.19	2.39	8.77	5.1	4
Ácido malonodialdeído (MDA)	5	4.96	2.13	7.44	4.48	2.98
Diferença fluxo coronário com acetilcolina	7	246.21	28.02	278.2	246.5	211.4
Diferença fluxo coronário com nitroprussiato	7	228.14	16.48	246	228.5	209.5
Fluxo coronário - Valores controle	7	3.43	0.48	4.2	3.4	2.8
Fluxo coronário - Valores durante a administração de acetilcolina	7	11.8	1.68	13.7	12	8.7
Frequência cardíaca	7	138.14	10.07	150	138	122
Pressão aórtica sistólica	7	133	8.7	142	136	120
Pressão aórtica diastólica	7	76.57	4.24	83	76	70

N = número de animais; DP = desvio padrão;

MAX = valor máximo; MIN = valor mínimo

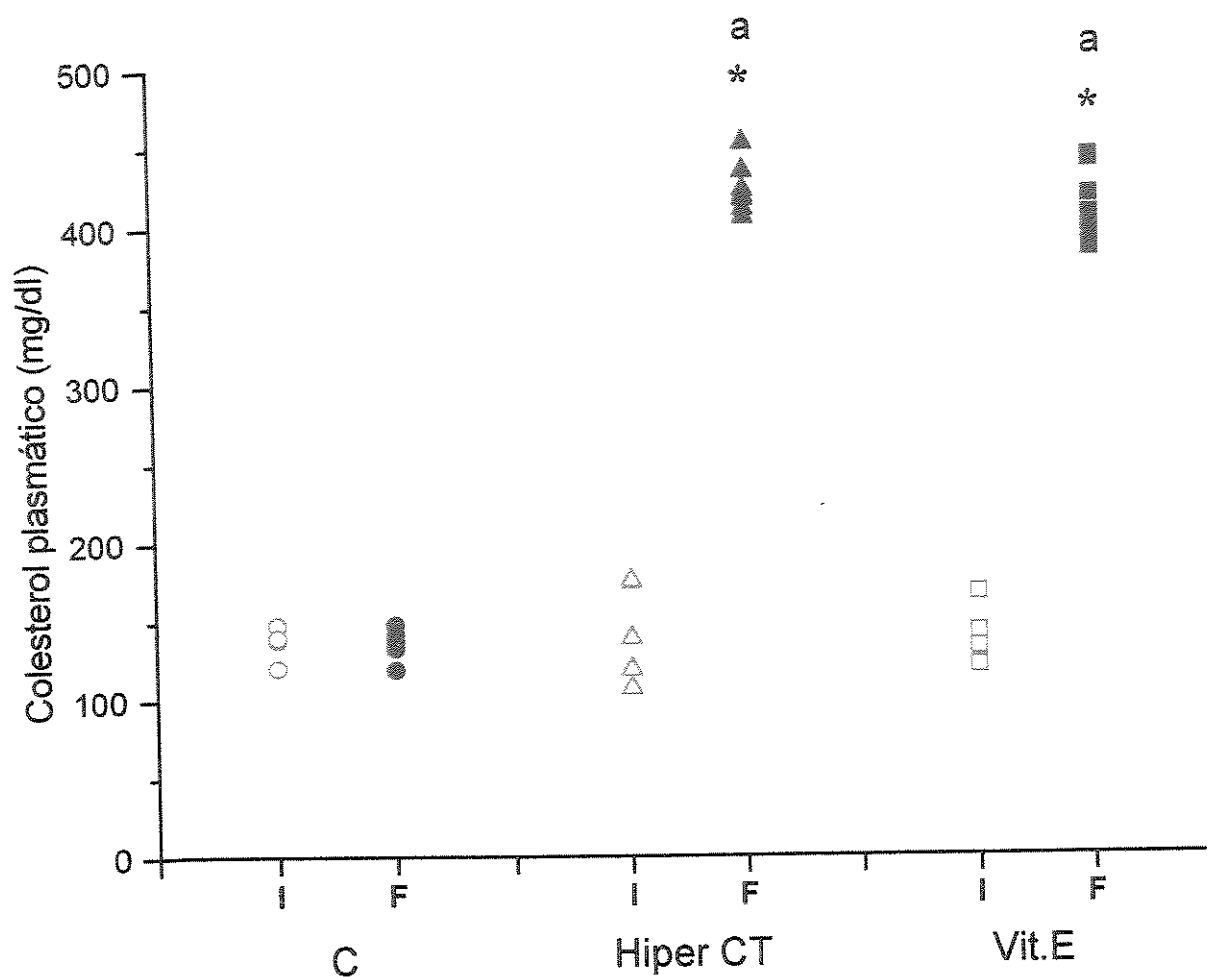


Figura 1: Diagrama de dispersão dos valores do colesterol plasmático total.

Os valores são expressos em mg/dl.

* $P < 0.05$ comparado com o grupo C.

a $P < 0.05$ comparado com os valores iniciais para cada grupo.

I = valores iniciais

F = valores após 40 dias

C, Hiper CT e Vit. E = grupos: controle, hipercolesterolêmico e vitamina E, respectivamente.

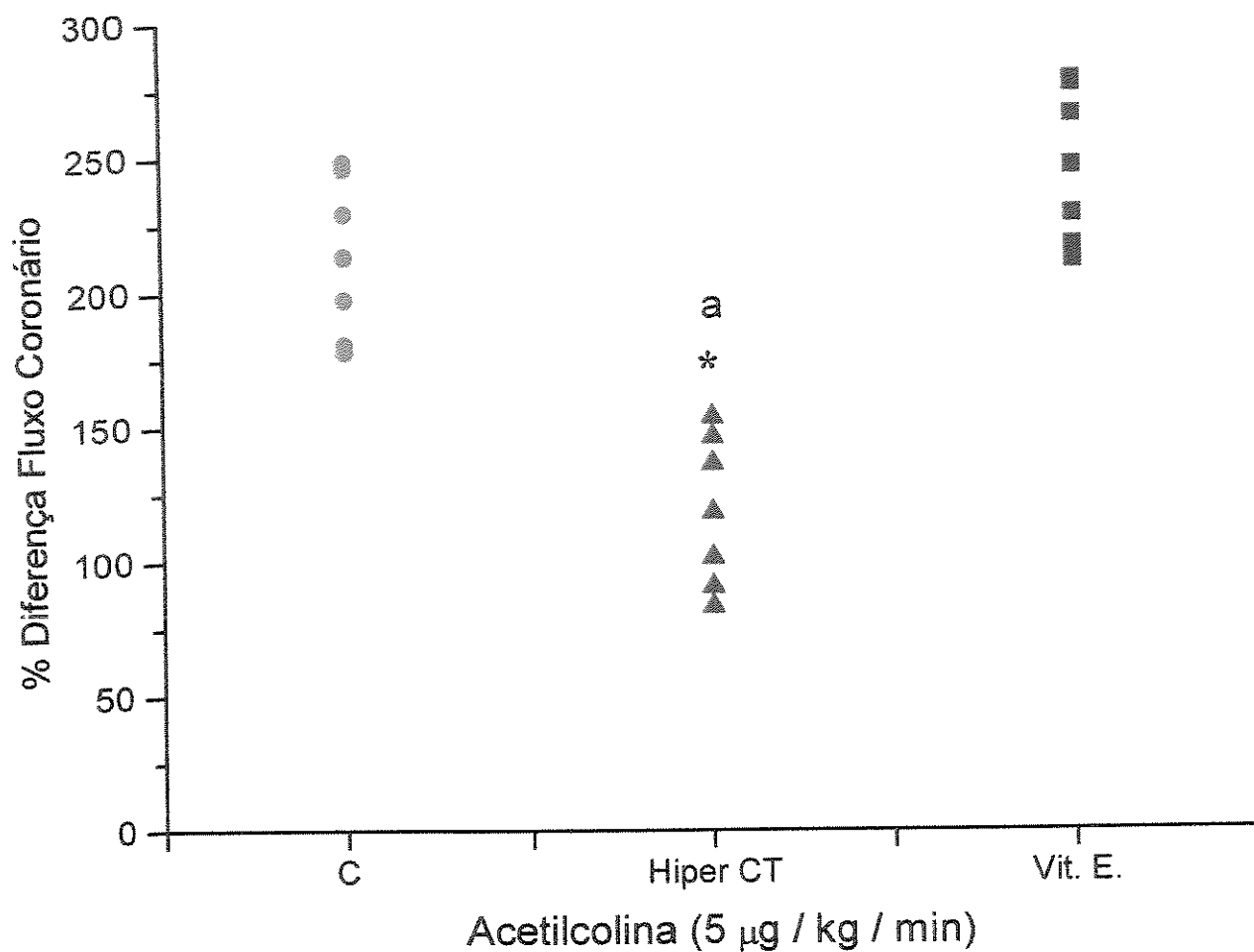


Figura 2: Diagrama de dispersão dos valores da diferença percentual do fluxo coronário durante a infusão de acetilcolina (5µg/kg/min).

* $P < 0.05$ comparado com o grupo C

a $P < 0.05$ comparado com o grupo Vit. E.

C, Hiper CT e Vit. E = grupos: controle, hipercolesterolêmico e vitamina E, respectivamente.

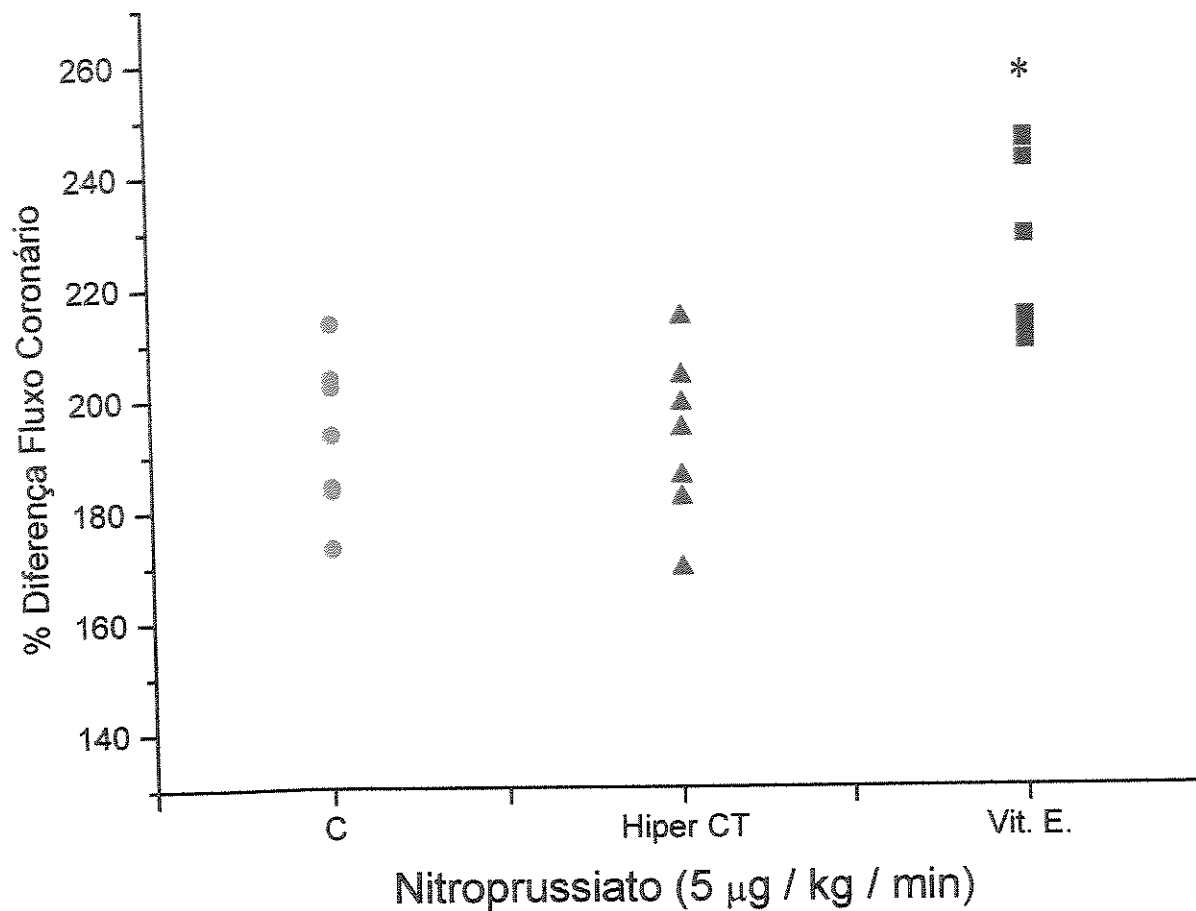


Figura 3: Diagrama de dispersão dos valores da diferença percentual do fluxo coronário durante a infusão de nitroprussiato de sódio (5µg / kg / min).

* $P < 0.05$ comparado com os grupos: C e Hiper CT.

C, Hiper CT e Vit. E = grupos: controle, hipercolesterolêmico e vitamina E, respectivamente.

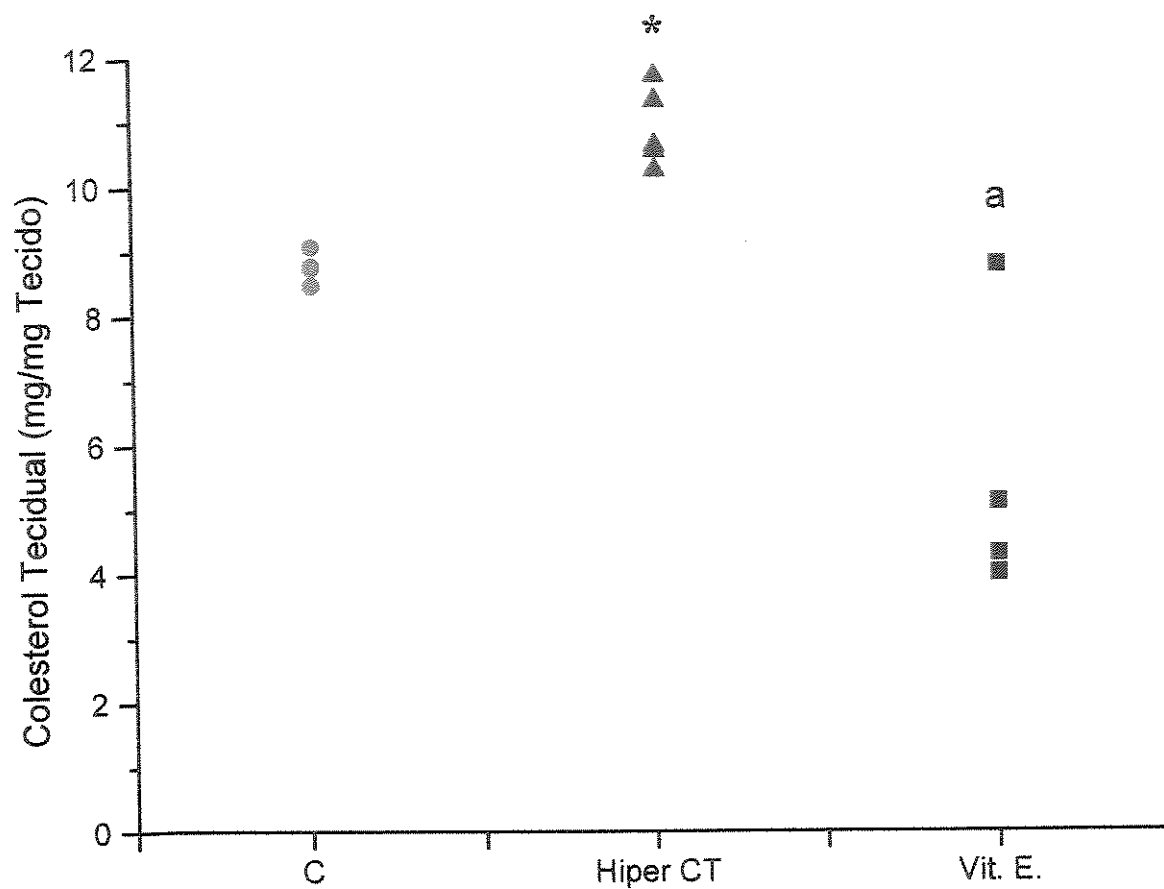


Figura 4: Diagrama de dispersão dos valores do colesterol tecidual.

Os valores são expressos em mg/mg (tecido seco).

* $P < 0.05$ comparado com o grupo C.

a $P < 0.05$ comparado com o grupo Hiper CT.

C, Hiper CT e Vit. E = grupos: controle, hipercolesterolêmico e vitamina E, respectivamente.

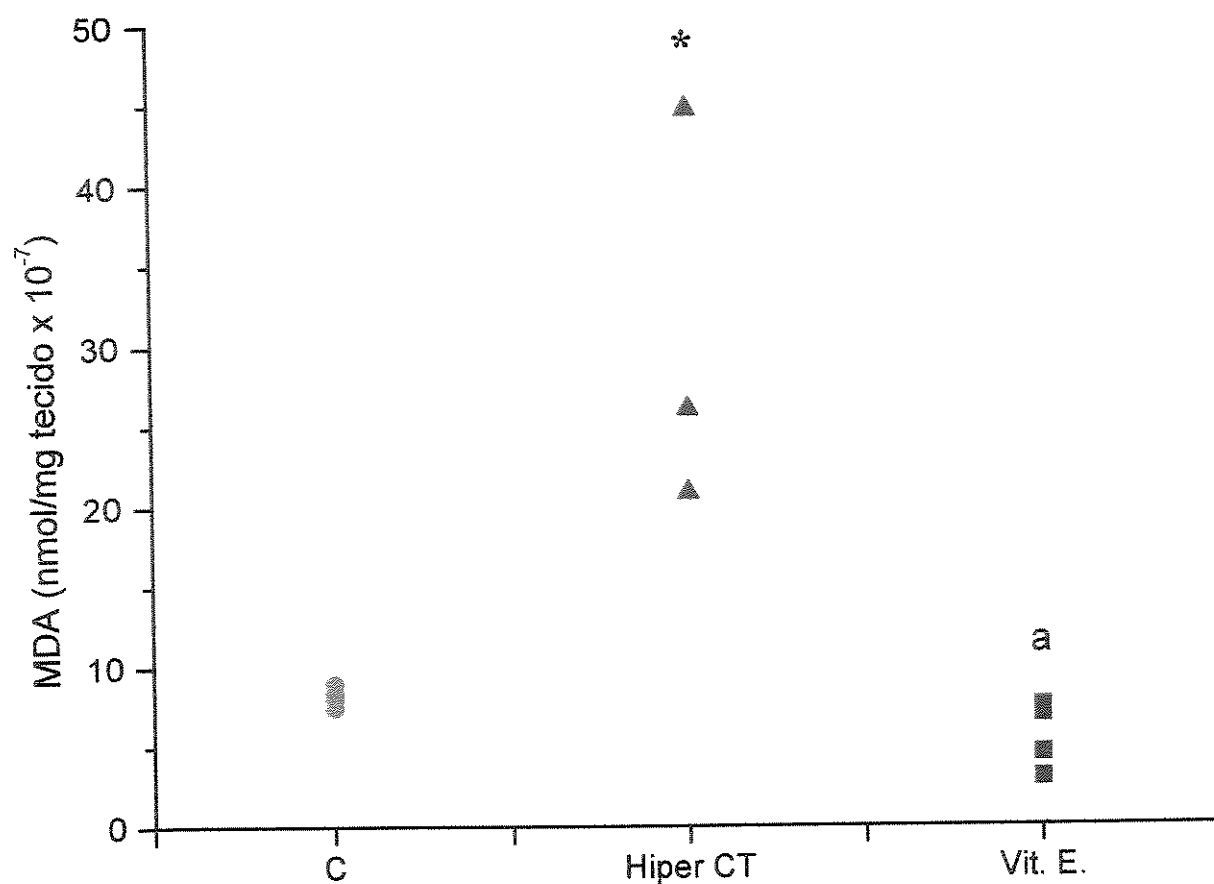


Figura 5: Diagrama de dispersão dos valores do MDA em artérias coronárias de cães.

Os valores são expressos em nmol/mg tecido.

* $P < 0.05$ comparado com os grupos C e Vit. E.

a $P < 0.05$ comparado com o grupo C.

C, Hiper CT, e Vit. E = grupos: controle, hipercolesterolêmico e vitamina E, respectivamente.