

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA NUTRIÇÃO
ÁREA DE NUTRIÇÃO BÁSICA E EXPERIMENTAL**

**EFEITO DA VITAMINA E ISOLADA E EM ASSOCIAÇÃO COM
DROGAS REDUTORAS DO COLESTEROL PLASMÁTICO
SOBRE O PERFIL LIPÍDICO E A OXIDAÇÃO DA
LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDL) EM COELHOS
HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

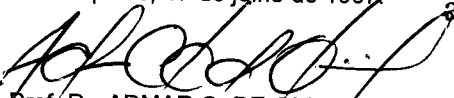
LIDIA LUZ CRUZ NEYRA
Bióloga

Prof. Dr. ADMAR COSTA DE OLIVEIRA
Orientador

PARECER

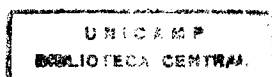
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por LIDIA LUZ CRUZ NEYRA e aprovada pela Comissão Julgadora em 17 de julho de 1997.

Campinas, 17 de julho de 1997.


Prof. Dr. ADMAR C. DE OLIVEIRA
Presidente da Banca

Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade
para obtenção do Título de Doutor em Ciência da
Nutrição

1997



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	11/Unicamp
N.º	4922
V.	Ex
TEMP. SC/	31.582
PROD.	28/197
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	02/09/97
SPD	

CM-00099927-8

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

C889e

Cruz Neyra, Lidia Luz

Efeito da vitamina E isolada e em associação com drogas redutoras do colesterol plasmático sobre o perfil lipídico e a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) em coelhos hipercolesterolêmicos / Lidia Luz Cruz Neyra. -- Campinas, SP:[s.n.], 1997.

Orientador: Admar Costa de Oliveira
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

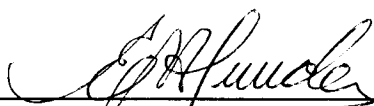
I.Colesterol^X 2.Lipoproteínas^λ 3.Vitamina E^λ I.Oliveira, Admar Costa de. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

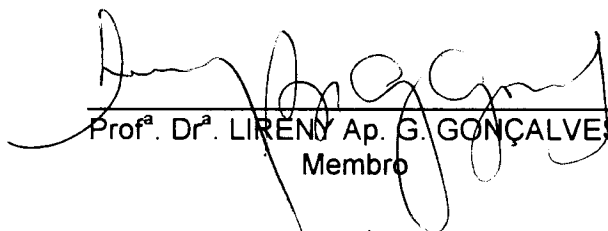


Prof. Dr. ADMAR COSTA DE OLIVEIRA
Orientador

Prof. Dr. PAULO AFONSO RIBEIRO JORGE
Membro



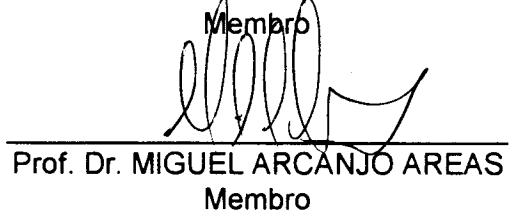
Prof. Dr. EROS ANTONIO DE ALMEIDA
Membro



Prof.ª Dr.ª LIRENY Ap. G. GONÇALVES
Membro



Prof. Dr. JAIME AMAYA FARFAN
Membro



Prof. Dr. MIGUEL ARCANJO AREAS
Membro

Prof.ª Dr.ª FLÁVIA MARIA NETTO
Membro

Campinas, 17 de Julho de 1997

*Aos meus pais pelo apoio, incentivo e
carinho, nesses anos de vindas e voltas.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr., Admar Costa de Oliveira pela confiança, orientação e apoio na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Afonso Ribeiro Jorge, chefe do Laboratório de Cardiologia Experimental do Núcleo de Medicina e Cirurgia experimental da Faculdade de Ciências Médicas, pelo seu constante apoio, pelo exemplo de rigor científico e pela possibilidade de usar os recursos de seu laboratório.

À Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Samico Cavalcanti, chefe do Laboratório de Pesquisas Bioquímicas do CAISM, pelo apoio, por permitir usar seu laboratório para executar o presente trabalho e pela amizade.

Aos colegas dos laboratórios de Cardiologia Experimental (NMCE), Pesquisas Bioquímicas (CAISM) Bioquímica (HC) e Lípides (DEPAN): Regina Osaki, Fernando Guimarães, Soely Reis, Lúcia Castilho, pela colaboração e apoio constante.

Aos estatísticos Marco Simonetti, Hélio José de Abreu, Eliani Guelli e Luciane pela orientação e preparação das análises estatísticas.

À Mirian, Sandra, Vinícius, Márcia, Contado e Cinthia, pela amizade e apoio constante.

Aos Docentes e funcionários do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, pelo apoio.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos pelo auxílio, sempre que solicitados.

À toda minha família pela paciência, compreensão, apoio e incentivo.

À todos aqueles que por ventura não foram mencionados, agradeço por terem feito parte de uma longa jornada da minha vida. Serão sempre lembrados.

ÍNDICE GERAL

	página
ÍNDICE DE TABELAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
RESUMO	12
SUMMARY	14
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Metabolismo das lipoproteínas	20
2.1.1 Metabolismo de quilomícrons	22
2.1.2 Metabolismo das VLDL	23
2.1.3 Metabolismo das LDL	24
2.1.4 Metabolismo das HDL	26
2.2 Lesão aterosclerótica e LDL oxidada	27
2.3 Antioxidantes	31
2.3.1 Vitamina E	32
2.3.2 Beta-caroteno	34
2.3.3 Vitamina C	35

3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Material	37
3.2 Métodos	37
3.2.1 Animais e dieta	37
3.2.2 Coleta de sangue	39
3.2.3 Isolamento da LDL	39
3.2.4 Diálise da LDL	40
3.2.5 Modificação oxidativa da LDL	40
3.2.6 Determinação do colesterol da HDL	41
3.2.7 Determinação do colesterol e triacilgliceróis plasmáticos	41
3.2.8 Determinação da composição química da LDL	42
3.2.9 Análise Estatística	42
4 RESULTADOS	45
4.1 Colesterol plasmático	45
4.2 Triacilgliceróis	46
4.3 Lipoproteínas plasmáticas	47
4.3.1 LDL-c	48
4.3.2 VLDL-c	48
4.3.3 HDL-c	49
4.4 Distribuição percentual das lipoproteínas	49
4.5 Proporções lipídicas	51
4.6 Composição da LDL	52
4.7 Distribuição percentual da cada componente da LDL	54
4.8 Modificação oxidativa da LDL	55
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÕES	83
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

ÍNDICE DE TABELAS

	página
Tabela 1 Média ($\pm$ desvio padrão) do peso inicial e final dos coelhos submetidos a dietas normo e hipercolesterolêmica	56
Tabela 2 Média ($\pm$ desvio padrão) das concentrações de colesterol total e o colesterol das lipoproteínas plasmáticas (expressas em mg/dl)	57
Tabela 3 Média ($\pm$ desvio padrão) das proporções lipídicas entre CT/HDL e LDL/HDL	58
Tabela 4 Média ($\pm$ desvio padrão) das concentrações do colesterol (C), triacilgliceróis (Tg), proteínas (Prt) e fosfolipídios (Fosf) da LDL (expressas em mg/dl)	59

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1 Esquema de trabalho. HDL=lipoproteína de alta densidade, LDL=lipoproteína de baixa densidade, pp=precipitante, TBARS= substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico.	43
Figura 2 Isolamento da LDL. VLDL=lipoproteína de muito baixa densidade: LDL=lipoproteína de baixa densidade, HDL= lipoproteína de alta densidade, d=densidade, PBS=tampão fosfato salino.	44
Figura 3 Colesterol total plasmático (média $\pm$ desvio padrão) dos grupos hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE), vitamina E+Sinvastatina (SE) durante 2 dias, antes do 30° de experimentação. Letras distintas indicam diferença entre grupos ($p<0,05$).	60
Figura 4 Colesterol total plasmático (média $\pm$ desvio padrão) dos grupos hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE), vitamina E+Sinvastatina (SE) durante 4 dias, antes do 30° de experimentação. Letras distintas indicam diferença entre grupos ($p<0,05$).	60
Figura 5 Colesterol total plasmático (média $\pm$ desvio padrão) dos grupos hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE), vitamina E+Sinvastatina (SE) durante 6 dias, antes do 30° de experimentação. Letras distintas indicam diferença entre grupos ($p<0,05$).	61

- Figura 6** Concentrações de triacilgliceróis plasmáticos (média $\pm$ desvio padrão) dos grupos hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE), vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 2 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença entre grupos ($p < 0,05$). 61
- Figura 7** Concentrações de triacilgliceróis plasmáticos (média $\pm$ desvio padrão) dos grupos hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE), vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 4 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença entre grupos ($p < 0,05$). 62
- Figura 8** Concentrações de triacilgliceróis plasmáticos (média $\pm$ desvio padrão) dos grupos hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE), vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 6 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença entre grupos ($p < 0,05$). 62
- Figura 9** Média $\pm$ desvio padrão da distribuição percentual do colesterol nas lipoproteínas plasmáticas LDL-c, VLDL-c e HDL-c, dos grupos hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE), vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 2 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). 63
- Figura 10** Média $\pm$ desvio padrão da distribuição percentual do colesterol nas lipoprcteínas plasmáticas LDL-c, VLDL-c e HDL-c, dos grupos hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina 63

E+Pravastatina (PE), vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 4 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 11 Média $\pm$ desvio padrão da distribuição percentual do colesterol nas lipoproteínas plasmáticas LDL-c, VLDL-c e HDL-c, dos grupos hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE), vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 6 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). 64

Figura 12 Média $\pm$ desvio padrão da composição percentual da LDL (p/p) dos grupos: hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE), vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 2 dias, antes do 30º dia do experimento. Letras distintas indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,005$). 64

Figura 13 Média $\pm$ desvio padrão da composição percentual da LDL (p/p) dos grupos: hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE), vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 4 dias, antes do 30º dia do experimento. Letras distintas indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,005$). 65

Figura 14 Média $\pm$ desvio padrão da composição percentual da LDL (p/p) dos grupos: hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE), vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 6 dias, antes do 30º dia do experimento. Letras distintas indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,005$). 65

Figura 15 Média $\pm$ desvio padrão da peroxidação da LDL nativa (LDL-nn) e LDL oxidada (LDL-ox) expressa em nanomoles de dialdeído malônico (MDA)/mg de proteína. Grupos hipercolesterolêmico (HH) e tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE), vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 2 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença entre os grupos ($p<0,05$). TBARS=substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico. 66

Figura 16 Média $\pm$ desvio padrão da peroxidação da LDL nativa (LDL-nn) e LDL oxidada (LDL-ox) expressa em nanomoles de dialdeído malônico (MDA)/mg de proteína. Grupos hipercolesterolêmico (HH) e tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE), vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 4 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença entre os grupos ($p<0,05$). TBARS=substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico. 66

Figura 17 Média $\pm$ desvio padrão da peroxidação da LDL nativa (LDL-nn) e LDL oxidada (LDL-ox) expressa em nanomoles de dialdeído malônico (MDA)/mg de proteína. Grupos hipercolesterolêmico (HH) e tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE), vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 6 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença entre os grupos ($p<0,05$). TBARS=substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico. 67

RESUMO

Recentes evidências sugerem que a modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade (LDL) é aterogênica e que as substâncias antioxidantes podem proteger a LDL contra a oxidação. A vitamina E é um importante antioxidante da dieta e o principal antioxidante lipossolúvel encontrado no plasma e nas lipoproteínas.

Por outro lado, níveis altos de LDL-colesterol são o principal fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose. As drogas inibidoras da enzima limitante da biossíntese do colesterol, a 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) reductase, são usadas para o tratamento da hipercolesterolemia.

O objetivo do presente estudo foi determinar o efeito e o tempo em que a vitamina E, administrada isoladamente ou associada à Pravastatina e à Sinvastatina atua sobre o perfil lipídico plasmático e sobre a peroxidação lipídica da LDL, em coelhos hipercolesterolêmicos.

Cento e trinta e seis coelhos machos, brancos, da raça Nova Zelândia, de $2,0 \pm 0,1$ kg de peso foram aleatoriamente divididos em 17 grupos, com 8 animais cada: o grupo normocolesterolêmico (NN) recebeu dieta comercial, o grupo hipercolesterolêmico (HH) recebeu a dieta comercial suplementada com 0,5% de colesterol (p/p) e os outros 15 grupos receberam a mesma dieta durante 30 dias com os seguintes tratamentos : suplementação de vitamina E (E-2, E-4, E-6), Pravastatina (P-2, P-4, P-6), Sinvastatina (S-2, S-4, S-6), vitamina E + Pravastatina (PE-2, PE-4, PE-6) e vitamina E + Sinvastatina (SE-2, SE-4, SE-6), durante os 2, 4 e 6 dias antes do término do experimento. A vitamina E (50 U.I./dia), a Pravastatina (15 mg/dia) , a Sinvastatina (10 mg/dia), e a vitamina E associada à Pravastatina ou a Sinvastatina foram administradas oralmente por intubação orogástrica.

Ao final do experimento, foi coletado o sangue dos animais através de punção cardíaca. O colesterol total plasmático (CT), triacilgliceróis (TG), HDL-colesterol (HDL-c), foram determinados através de métodos enzimáticos. As

lipoproteínas, VLDL e LDL foram isoladas por ultracentrifugação. A extensão da oxidação e a susceptibilidade da LDL em sofrer oxidação *in vitro* foram medidas pelo conteúdo de dialdeído malônico (MDA), estimado pelo TBARS (substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico).

Foi observada uma diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol total, triacilgliceróis, LDL-colesterol (LDL-c) e VLDL-colesterol (VLDL-c) no grupo que recebeu vitamina E, durante 6 dias ($p < 0,05$). As mudanças das relações lipídicas CT/HDL-c e LDL-c/HDL-c e a composição lipídica da LDL ocorreu também neste período de tempo.

Os grupos que receberam vitamina E+Pravastatina (PE) e vitamina E+Sinvastatina (SE) apresentaram menores níveis de CT e lipoproteína. Nestes grupos diminuíram CT e TG, no quarto dia de tratamento. Os níveis de LDL-c diminuíram no segundo e quarto dia de tratamento para os grupos PE e SE, respectivamente. Os níveis de HDL-c aumentaram somente nos grupos PE-6 e SE-6. A composição lipídica da LDL foi alterada nos grupos PE-4 e SE-6.

O perfil lipídico dos grupos que receberam pravastatina e sinvastatina isoladamente, foi alterado no quarto dia de tratamento, reduzindo os níveis plasmáticos de CT, TG, VLDL-c e LDL-c.

A LDL isolada de coelhos tratados com vitamina E mostrou ser altamente resistente à modificação oxidativa pelos íons de cobre. Os níveis de MDA nos grupos E-6, PE-6, SE-6, P-6 e S-6 mostraram uma redução de 75, 60, 53, 19 e 18% respectivamente.

Os resultados indicam que os coelhos hipercolesterolêmicos tratados com PE e SE tiveram uma significativa proteção da LDL contra a oxidação induzida em um tempo precoce. Assim, a associação de drogas hipocolesterolêmicas com vitamina E foi mais efetiva.

A suplementação de vitamina E a coelhos com hipercolesterolemia experimental protege contra a oxidação da LDL, com tendência a normalizar o perfil lipídico e portanto, sugerindo um potencial efeito sobre o risco da doença coronária.

oxidation *in vitro* were measured by malonic dialdehyde (MDA) levels, estimated as thiobarbituric-acid reacting substances (TBARS).

Results showed that total cholesterol, triacylglycerols, LDL-cholesterol (LDL-c) and VLDL-cholesterol (VLDL-c) levels were reduced in the groups of rabbits that received vitamin E for 6 days ($p < 0,05$). TC/LDL-c and LDL-c/HDL-c ratios and composition of the LDL changed upon this time period.

Rabbits in all groups treated with PE and SE showed lower TC and lipoproteins than those of others groups. TC and TG decreased in PE and SE groups after 4 days of treatment. LDL-c levels decreased in PE and SE groups at 2 and 4 days after treatment, respectively. HDL-c levels increased in PE-6 and SE-6 groups. Lipid composition of LDL was changed in PE-4 and SE-6 groups.

The blood lipid profile changed in groups treated with pravastatin and simvastatin, during 4 days; TC, TG, VLDL-c and LDL-c were decreased.

LDL isolated from those groups of rabbits under treatment with vitamin E were shown to be highly resistant to oxidative modification by cupric ions. MDA content of oxidized LDL were reduced by 75, 60, 55, 19 and 18% following treatment with E-6, PE-6, SE-6, P-6 and S-6, respectively.

These data indicate that hypercholesterolemic rabbits treated with PE and SE conferred significant protection to the LDL against oxidative modification in a short time, thus the association of hypocholesterolemic drugs with vitamin E being more effective than vitamin E alone.

It is suggested that supplementing the diet of hypercholesterolemic rabbits with vitamin E may protect against the oxidation of LDL and could normalize the altered lipid profile of atherogenesis, thereby reducing the risk for coronary heart disease.

1 INTRODUÇÃO

Os estudos epidemiológicos pioneiros com mais de 40 anos de duração, realizados na cidade de Framingham (EUA), possibilitaram demonstrar que as doenças coronárias (angina de peito e infarto de miocárdio) guardam relação direta com a hipercolesterolemia, sendo que, para valores progressivamente mais elevados, correspondem riscos proporcionalmente maiores (KANDEL et al., 1979). Está comprovado que a hipercolesterolemia é um fator de risco importante para o desenvolvimento precoce da aterosclerose e é consequência do aumento da quantidade da lipoproteína de baixa densidade, Low Density Lipoprotein - LDL, (CARLSON & BÖTTINGER, 1985). Por outro lado, 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 estreitamento do lume das artérias grandes e médias, devido ao espessamento local da íntima. Numerosas investigações sobre os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na patogênese da aterosclerose são ainda controversos. A hipótese mais amplamente aceita é que a aterosclerose é uma resposta imune-inflamatória da íntima arterial à injúria, ocasionada por fatores extrínsecos, principalmente a hipercolesterolemia (DAVIES & WOOLF, 1993). A lesão aterosclerótica é caracterizada, histologicamente pela proliferação celular de macrófagos, células musculares lisas e acúmulo de colesterol na íntima arterial, desenvolvendo-se em várias etapas. Inicialmente, ocorre formação da faixa ou linhas de gordura (fatty streak) na íntima arterial, caracterizada pelo acúmulo de colesterol em macrófagos residentes, convertendo-se em células espumosas, *foam cell*. (STEINBERG et al., 1989). Posteriormente, a faixa de gordura se transforma em uma placa fibrosa, coberta com denso tecido conectivo, contendo diferentes tipos celulares, que incluem as células espumosas, macrófagos e linfócitos T.

Na fase de formação da lesão aterosclerótica, há um maior recrutamento de monócitos nas áreas propensas à lesão, porém, em humanos e em animais normocolesterolêmicos. Os monócitos têm muito poucos receptores para LDL e, ocasionalmente, aderem-se ao endotélio arterial e penetram na íntima. Os monócitos, na íntima arterial, sofrem ativação e diferenciação celular, transformando-se em macrófagos residentes, processo que está associado com as mudanças das suas funções (YIA-HERTUALA et al., 1989; WITZUM, 1993).

O excesso da LDL na circulação acarreta maior número de partículas da LDL na região da íntima, geração de células espumosas e disfunção do endotélio arterial (STEINBERG et al., 1989; CHIN et al., 1992).

GOLDSTEIN et al. (1979) foram os primeiros a descrever uma LDL modificada quimicamente no laboratório, a LDL acetilada, capaz de transformar macrófagos em células espumosas, *in vitro*; essa captação foi atribuída a um novo receptor designado como seqüestrante (scavenger receptor). STEINBERG et al. (1989) mostraram que células endoteliais, musculares lisas e os próprios monócitos-macrófagos podem induzir a oxidação da LDL. Assim, os três componentes da parede arterial podem converter a LDL a uma forma reconhecível pelos receptores seqüestrantes dos macrófagos e gerar as células espumosas. Estes receptores não são regulados pelo controle "feed-back", levando a uma captura excessiva de colesterol (DAVIES & WOOLF, 1993). Os receptores seqüestrantes também reconhecem a LDL oxidada *in vitro*, pela incubação da lipoproteína com células em cultura ou com íons metálicos, sendo que as mudanças físico-químicas e biológicas da LDL são similares às aquelas produzidas na oxidação *in vivo* (LUC & FRUCHART, 1991).

Os estudos do fenômeno da oxidação da LDL, mostram que a oxidação é consequência da ação de radicais livres, levando à peroxidação dos ácidos graxos dos fosfolípidios, triacilgliceróis, ésteres de colesterol e colesterol livre (STEINBRECHER et al., 1984; HALLIWELL & CHIRICO, 1993; AVIRAM, 1993). Os produtos da oxidação da LDL exercem vários mecanismos aterogênicos, atuando como substâncias quimiotáticas para os monócitos, inibindo a migração de macrófagos e citotóxicas (SCHWARTZ et al., 1993). A LDL oxidada altera a

expressão genética das células arteriais e ativa a resposta imune que, por sua vez, modula a resposta inflamatória (LIU et al., 1994).

O sistema de defesa antioxidante do organismo protege as células dos efeitos danosos dos radicais livres, evitando a peroxidação dos ácidos graxos polinsaturados (HALLIWELL, et al., 1995). Este sistema consiste de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase, a catalase e de micronutrientes que incluem minerais como selênio, cobre, zinco e manganês e as vitaminas E, C e beta-caroteno (HENEKENS & GAZIANO, 1993).

A vitamina E é um antioxidante lipossolúvel que protege as células e os tecidos contra os efeitos destrutivos dos radicais livres. Existem evidências que a alta ingestão da vitamina E, em homens, resulta em uma significativa diminuição da incidência de eventos coronarianos (GEY & PUSKA, 1989; RIMM et al., 1993, GEY et al., 1991). JIALAL et al. (1995) relataram que a dose mínima de alfa-tocoferol, principal membro da família da vitamina E, necessária para reduzir, significativamente, a susceptibilidade de oxidação da LDL humana, é de 400 U.I. por dia.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a diminuição do colesterol plasmático, através do uso de drogas hipocolesterolêmicas, reduz também a incidência de doenças coronárias (COBBE & SHEPHERD, 1993; HUNNIGHAKE et al., 1990). As drogas hipocolesterolêmicas mais efetivas são denominadas estatinas. São substâncias derivadas de microorganismos, as quais interferem eficazmente na síntese celular de colesterol por inibição competitiva com a enzima hidroximetil-glutaril coenzima A redutase (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 e a Simvastatina.

Os resultados das pesquisas sobre o uso de drogas hipocolesterolêmicas e o uso de antioxidantes confirmam que a redução do colesterol e da peroxidação lipídica influem na diminuição de eventos coronarianos (KANNEL et

al., 1979; GRUNDY, 1988; REIHNER et al., 1990; RIEMERSMA et al., 1991; GEY et al., 1991). Estes estudos abrem um amplo campo de investigação no sentido de verificar o mecanismo de ação das substâncias antioxidantes, administradas isoladamente ou em associação com drogas prevalentemente hipocolesterolêmicas. Mas um outro assunto ainda não estudado, refere-se ao tempo de ação das substâncias antioxidantes sobre o perfil lipídico plasmático e a proteção na peroxidação lipídica. Este tema tem importância, considerando a velocidade do efeito protetor do antioxidante para evitar a oxidação da LDL, modificação responsável por graves consequências fisiológicas como o desenvolvimento da lesão aterosclerótica na parede arterial. Estudos isolados mostram que a combinação de antioxidantes com drogas redutoras de colesterol pode reduzir a incidência de processos coronários adversos (ANDERSON et al., 1995).

O presente estudo foi conduzido para determinar o efeito e o tempo de ação com que a vitamina E administrada de forma isolada ou em associação com as drogas hipocolesterolêmicas atua sobre o colesterol total, as lipoproteínas e os triacilgliceróis plasmáticos e ainda sobre a peroxidação e a composição da LDL nativa e a oxidada *in vitro*. Para tal, foi utilizado o modelo experimental de hipercolesterolemia induzida em coelhos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Os principais lipídios do organismo são: esteróis, triacilgliceróis, fosfolipídios 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 fosfolipídios, 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 lipídios bem como para a regulação do seu metabolismo, atuando como cofatores de enzimas e mediando a interação das lipoproteínas com receptores celulares, responsáveis pela remoção das partículas 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 5 principais classes, além de várias subfrações, de acordo com a 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; lipoproteínas de baixa densidade (LDL), com densidade entre 1,019 e 1,063 g/ml 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 VLDL constituem-se principalmente de triacilgliceróis (84% e 55%) e pequenas porcentagens de colesterol (7% e 20%), fosfolipídios (7% e 18%) e apolipoproteínas (2% e 8%). As IDL, remanescentes das VLDL, possuem aproximadamente 33% de triacilgliceróis e 33% de colesterol. As LDL são constituídas principalmente de colesterol (48%) sendo 38% em ésteres de colesterol. As HDL contêm em torno de 50% de proteínas, 25% de fosfolipídios, 20% de colesterol e apenas traços de triacilgliceróis (MILLS & LANE, 1984).

Cada lipoproteína apresenta determinada apolipoproteína. A apolipoproteína A-I (apo A-I) é o principal componente das HDL, estando presente também nos QM, VLDL e seus remanescentes, mas não é encontrada nas LDL. 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 e sua função é ainda pouco conhecida (BERWEVER et al., 1988).

A apo B está presente nos QM, VLDL, IDL e LDL. Existe dois tipos principais de apo B que se originam de um mesmo gene; a apo B-100, de 512 KDa de peso molecular, que é sintetizada no fígado e está presente nas LDL, VLDL e IDL, e a apo B-48 (241 KDa de peso molecular), que 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. Essa mudança promove a substituição do códon CAA, que corresponde ao aminoácido glutamina pelo códon UAA que termina a tradução (HIGUCHI et al., 1988).

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 a de 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 & GETS, 1984).

2.1.1 METABOLISMO DE QUILOMÍCRONS

O transporte de gordura de origem alimentar (triacilgliceróis e colesterol) 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 & HAMILTON, 1988). Os quilomícrons são transportados via ducto torácico até a circulação sistêmica, onde ocorrem trocas de apolipoproteínas e lipídios com 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 cofator é a apo C-II. A enzima lipoproteína lipase, aderida à superfície endotelial dos vasos sanguíneos, é 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 fosfolípidios, 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).

2.1.2 METABOLISMO DAS VLDL

A produção de gordura endógena de triacilgliceróis é feita pelo fígado e liberada na corrente sangüínea através da VLDL. Os triacilgliceróis são formados a partir da esterificação do glicerol por ácidos graxos captados principalmente da corrente sangüínea, 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 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 provêm 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 àquelas 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 fosfolipídios, até a completa transformação em LDL, que é constituída por fosfolipídios, colesterol livre, colesterol esterificado e apo B-100. Essas partículas são também removidas do plasma pelo receptores B-E (MYANT, 1990).

2.1.3 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 & GOLDSTEIN, 1986). A LDL é reconhecida por receptores B/E, que identificam a apo B, mas que têm alta afinidade pelas apo E, também presentes na LDL. O outro mecanismo é através dos receptores

seqüestrantes (scavenger receptors) dos macrófagos que permitem a acumulação de colesterol como ésteres de colesterol (COBBE & SHEPHERD, 1993).

O receptor B-E. descrito por BROWN & 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, denominada cavidade revestida (coated pit).

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 à proteína que suprime a atividade do gene responsável pela síntese do receptor de LDL (BROWN & 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 a protege do efeito lesivo do excesso deste. O aumento de colesterol celular provoca, também, estímulo na atividade

da enzima acil colesterolil 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 & GOLDSTEIN, 1986).

2.1.4 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 utilizado novamente. Neste processo, ao contrário da LDL, a qual está associada a um aumento do risco de aterosclerose, a HDL desempenha um papel protetor removendo o colesterol da superfície dos tecidos e transferindo-o para QM, VLDL e LDL, através da ação da enzima LCAT (lecitina-colesterol-acil transferase) e a CETP (proteína de transferência de colesterol esterificado).

A enzima LCAT, cujo cofator é a apolipoproteína A-I, esterifica o colesterol livre presente na superfície da HDL com os ácidos graxos dos fosfolípidios. A ação da LCAT permite que a HDL possa progressivamente receber mais colesterol livre e fosfolípidios 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 HDL₃ em HDL₂. A HDL₂ reconverte-se em HDL₃ pela remoção do colesterol esterificado no fígado ou pela transferência do mesmo para as lipoproteínas ricas em triacilgliceróis, através da proteína de transferência de colesterol esterificado (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 & SHEPHERD, 1993; GOTTO, 1987).

2.2 LESÃO ATEROSCLERÓTICA E LDL OXIDADA

A lesão aterosclerótica inicial é caracterizada pelo acúmulo de células sobrecarregadas com colesterol esterificado denominadas células espumosas (foam cells), 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. Estas células dão à superfície da íntima arterial o aspecto de linhas ou manchas lineares amareladas (fatty steaks), 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, que foram denominadas por BROWN e GOLDSTEIN (1983) de "scavenger pathways".
- Monócitos e macrófagos em cultura, quando incubados com grandes concentrações de LDL, não se transformam em células espumosas. Isso ocorre porque os macrófagos expressam poucos receptores para LDL e também porque a síntese desses receptores é inibida por altas concentrações de LDL no meio (retroalimentação negativa). 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 para gerar células espumosas (BROWN & 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 polinsaturados, 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 "scavenger" (STEINBRECHER et al., 1984; DAVIDSON, 1993; SCHWARTZ et al., 1993; PARTHASARATHY et al., 1985). Este processo é inibido pelos agentes antioxidantes (HALLIWELL & 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 & 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, há um maior recrutamento de monócitos nas áreas propensas à lesão. 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 das suas 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- β (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 peptídeos 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- β , 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; FARUQUI & DICORLETO, 1993). A LDL oxidada inibe a liberação do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) que prejudica o vasorelaxamento e provoca agregação de plaquetas. Por outro lado, anticorpos que reconhecem a LDL oxidada, mas não a LDL nativa foram encontrados no plasma de pacientes com aterosclerose avançada de carótida, (LIU et al., 1994; HANSSON, 1993; SALONEN et al., 1992).

O reconhecimento de LDL oxidada pelos receptores de macrófagos poderia ser resultado da derivação dos resíduos de lisina da apolipoproteína B

(Apo B), pelos produtos da peroxidação, que ocasionam mudanças na conformação e fragmentação da apo B (STEINBRECHER et al., 1987; GREENSPAM 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 e toxinas; a quantidade de LDL infiltrada no espaço subendotelial (que depende da concentração plasmática de LDL); a quantidade de ácidos graxos polinsaturados na LDL; o estímulo que aumenta o recrutamento de monócitos na íntima e sua conversão a macrófagos e o balanço entre compostos pró e antioxidantes no espaço subendotelial (WITZTUM, 1993; SHIREMAN, 1996). O ácido linoléico é o mais abundante, tanto nos fosfolipídios da superfície quanto no colesterol-éster e triacilgliceróis do núcleo das lipoproteínas. Dietas ricas em gorduras polinsaturadas são consideradas hipocolesterolêmicas (GRUNDY & DENKE, 1990), porém provocam a formação de lipoproteínas mais ricas em ácidos graxos polinsaturados, 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., 1988; 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 oxidada, o que não ocorre com o colesterol da LDL nativa. Também foi encontrado aumento de produtos de oxidação de lipídios no plasma de

pacientes com alto risco de infarto do miocárdio (STRINGER et al., 1989; LIU et al., 1992).

DE GRAAF (1991) e TRIBBLE et al. (1995), estudando diversas subclasses de LDL, identificadas por ultracentrifugação e por 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 essas partículas mais densas são propriamente mais aterogênicas ou são simplesmente marcadores de um perfil aterogênico (TRIBBLE, 1995).

2.3 ANTIOXIDANTES

O sistema de defesa antioxidante do organismo protege as células dos efeitos danosos dos radicais livres, evitando a peroxidação dos ácidos graxos polinsaturados (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 & GAZIANO, 1993; ABBEY et al., 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 sendo 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 & FULLER, 1993).

2.3.1 VITAMINA E

A vitamina E é o nome coletivo para agrupar os tocoferóis e os tocotrienóis, encontrados nos vegetais, especialmente em óleos. Estes compostos apresentam um anel cromanol, com substituições de grupos metila, que determina o tipo de isômero (α , β , γ , δ) e uma cadeia de fitilo que, no caso dos tocoferóis, é saturada e dos tocotrienóis apresenta três ligações insaturadas.

Existem oito formas de tocoferóis, sendo que o estereoisômero α -tocoferol é o mais abundante. Inicialmente, foi conhecido como a forma d-tocoferol e agora é referido como RRR- α -tocoferol (2R, 4'R, 8'R). Esta forma é a mais ativa que a mistura dos racematos (all-rac- α -tocoferol).

Em humanos e animais, o alfa-tocoferol distribui-se entre todas as lipoproteínas com maior proporção na LDL e na HDL (WILLIAMS et al., 1992). Incorporadas aos quilomícrons na circulação, as várias formas de vitamina E, em proporções relativa à sua abundância na dieta, podem ser transferidas às HDL e LDL. Quando os quilomícrons são capturados pelo fígado, uma proteína hepática, preferencialmente transfere a forma α -tocoferol à VLDL-nascente (TRABER & KAYDEN, 1989), que será, posteriormente convertida em LDL. Existem, em média, sete moléculas de vitamina E por partícula de LDL (PACKER, 1995).

O papel primário da vitamina E é interferir com a cadeia de propagação dos radicais livres, na fase inicial da peroxidação lipídica (MACHLIN, 1987; HENNEKENS & GAZIANO, 1993). A vitamina E doa seu hidrogênio aos radicais peróxilos, evitando assim a propagação.

Outras funções biológicas da vitamina E compreendem a) regulação da síntese da proteína xantina oxidase, que em caso de deficiência em animais, os níveis desta enzima estão aumentados, sugerindo que há maior produção de

íons superóxidos; b) modulação do metabolismo de xenobióticos, através da inibição ou ativação das enzimas localizadas nos microssomas; c) regulação da proliferação celular e d) formação de prostaglandinas, envolvidas na regulação da resposta imune (NIKI et al., 1989). Ainda não se conhece se estas funções são independentes da atividade antioxidante da vitamina E. CHOW (1991) relatou que as membranas celulares constituem o sítio primário de dano em caso de deficiência de vitamina E, sugerindo que a vitamina E participa na estabilidade da membrana.

A atividade antioxidante e biológica das várias formas da vitamina E não são idênticas, sendo que o α -tocoferol apresenta a maior atividade antioxidante, enquanto que o δ -tocoferol somente tem 50% da atividade antioxidante, apesar de ser a principal forma na dieta humana (KAYDEN & TRABER, 1993).

Nos últimos anos tem sido pesquisado o conceito de que certos antioxidantes podem atuar como antiaterogênicos. GEY et al. (1991) e GEY & PUSKA (1989) observaram uma correlação inversa, fortemente significativa, entre a mortalidade por isquemia miocárdica e os níveis plasmáticos de vitamina E, em um estudo que representou 16 populações européias com diferente incidência da doença.

RIEMERSMA et al. (1991) relataram que a angina de peito, o indicador clínico da doença isquêmica cardiovascular, está associada com a diminuição das concentrações plasmáticas de vitamina E, C e beta-caroteno. Por outro lado, DIEBER-ROTHENEDER et al. (1991), JIALAL & GRUNDY (1992) e JIALAL & FULLER (1993) relataram que a suplementação de vitamina E aumenta a resistência da LDL a oxidar-se, enquanto que ESTERBAUER et al. (1991), verificaram que a resistência à oxidação da LDL proveniente de doadores normais, não está relacionada ao conteúdo de α -tocoferol, concluindo que o α -tocoferol é importante, mas não o único que determina a resistência da LDL à oxidação.

KILLION et al. (1996) observaram que ocorre alteração do metabolismo da vitamina E nos tecidos de indivíduos com várias manifestações de

aterosclerose. WILLIAMS et al. (1992) administraram vitamina E a coelhos hipercolesterolêmicos e observaram inibição do desenvolvimento das lesões iniciais. Os estudos de BYERS (1993) indicaram que existe uma relação inversa entre o suplemento de vitamina E e a doença cardiocoronária. A suplementação de vitamina E tem um efeito protetor contra esta doença, sendo que, geralmente, a suplementação é 40 a 50 vezes maior que os níveis da dieta.

2.3.2 BETA-CAROTENO

O beta-caroteno, membro da família de pigmentos vegetais carotenóides, é precursor da vitamina A. Esta acumula-se em elevadas concentrações nas membranas de certos tecidos. É transportado predominantemente pelas lipoproteínas. O beta-caroteno atua como um varredor eficaz do oxigênio singlete servindo como antioxidante lipossolúvel adicional. Já a vitamina A tem pouca capacidade de sequestrar radicais livres (JIALAL & FULLER, 1993; FREI, 1995).

ESTERBAUER et al. (1989) e JILAL & FULLER (1993) observaram que o beta-caroteno inibe a modificação oxidativa *in vitro* da LDL. Por outro lado, estudos epidemiológicos demonstraram que existe uma inversa correlação entre as concentrações plasmáticas de beta-caroteno e as doenças cardiovasculares (DUELL, 1996).

THOMAS (1995) relatou que o beta-caroteno é um potente antioxidante em baixas pressões de oxigênio, sugerindo que o beta-caroteno e outros carotenóides devem estar concentrados nas regiões celulares expostas à baixa pressão de oxigênio.

2.3.3 VITAMINA C

A vitamina C (ácido ascórbico) é um antioxidante hidrofílico que reage com os radicais superóxidos, hidróxilos e oxigênio singlete (FREI, 1991). A vitamina C regenera a vitamina E de sua forma alfa-tocoferoxil. Os estudos epidemiológicos sugerem que baixos níveis plasmáticos de ácido ascórbico estão correlacionados com a maior incidência da aterosclerose (JIALAL & FULLER, 1993; MOREL et al., 1994).

O ácido ascórbico na presença de metais de transição pode provocar a formação de radicais livres, mas esta evidência não tem sido reportado *in vivo* (MACHLIN & BENDICH, 1987).

JIALAL et al. (1990) encontraram que a vitamina C inibe a oxidação da LDL, quando incubada em cultura de macrófagos ou com íons de cobre, e os estudos com animais de experimentação têm demonstrado que a suplementação de vitamina C diminui a aterosclerose (DUELL, 1996).

Estudos epidemiológicos em humanos tem relatado uma inversa relação entre a suplementação de vitamina C e a mortalidade por doença coronária (DUELL, 1996).

2.4 DROGAS HIPOCOLESTEROLÊMICAS

Na redução da hipercolesterolemia, usam-se diversas drogas com mecanismo de ação distinta, interferindo na velocidade de produção, na captura pelos tecidos e na composição das lipoproteínas. As estatinas têm causado revolução no tratamento da hipercolesterolemia devido ao seu potencial na prevenção de doença vascular aterosclerótica. Estas drogas são inibidoras de 3-hidroxi-3-metil-glutaril Coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), levando à

diminuição da velocidade de síntese de colesterol e conseqüentemente da hipercolesterolemia (ILLINGWORTH, 1988; QUINTÃO, 1994).

A estrutura molecular das estatinas assemelha-se a HMG-CoA, que é transformado em ácido mevalônico, precursor da biossíntese do colesterol. Ao competir com o sítio ativo da enzima HMG-CoA redutase, a produção do ácido mevalônico é bloqueada. Transitoriamente, diminui a síntese de colesterol, levando à desinibição da produção de RNA mensageiro da enzima, cujo nível celular aumenta. Cria-se um novo estado de equilíbrio, no qual a produção de colesterol fica normal ou discretamente diminuída, porém à custa de elevado nível da enzima. Esta regulação genômica está acoplada ao aumento de produção de receptores chamados B-E, de alta afinidade, responsáveis pelo reconhecimento de LDL e VLDL nos hepatócitos. Conseqüentemente, ocorre o aumento do catabolismo destas lipoproteínas, diminuindo sua concentração no plasma (REIHNER et al., 1990).

As estatinas; a sinvastatina e a pravastatina, diferem no fato da primeira estar na forma lactona, lipofílica, precisando ser convertida, no organismo, para forma ácida para ser ativa, enquanto que a segunda já se encontra na forma ativa.

Poucos estudos têm sido realizados comparando a eficiência das estatinas entre si. As reduções médias da hipercolesterolemia são de 23 e 16 % para sinvastatina e pravastatina, em dose de 10 mg/dia. e de 35 e 25 % em dose de 25 mg/dia, respectivamente (GRUNDY, 1988)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

O colesterol ultrapuro foi obtido de Amresco, Solon, Ohio, EUA; o 1,1,3,3-tetrametoxipropano (T1642) e a albumina sérica de bovino, fração V, foram obtidos de Sigma Chemical Company (St. Degussa, Divisão Labofarma SP).

Os kits enzimáticos para a determinação de colesterol CHOD-PAP (1497448) e o reativo precipitante para separar HDL (543004) foram adquiridos do Laboratório Boehringer Mannheim (Biochemica-Mannheim, Alemanha) e o kit para determinar fosfolípidios, do laboratório Doles (Goiás, Brasil).

O brometo de potássio p.a. (C-07491) e o sulfato cúprico pentahidratado (C-1843) foram obtidos da Cinética Química, (S.P., Brasil) e o ácido tricloroacético (C-446) da Vetec Química (S.P., Brasil). O kit enzimático para determinar triacilglicéris (114354.0001), ácido 2-tiobarbitúrico (8180), sais e reagentes foram obtidos da Merck (S.P., Brasil).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 ANIMAIS E DIETA

Utilizou-se 136 coelhos brancos, mestiços machos da raça New Zealand, com 16 semanas de idade e com peso de 2.0 ± 0.1 kg, fornecidos pela granja CRIEX (São Paulo, Brasil). Os animais foram aleatorizados, colocados em gaiolas individuais e submetidos a 17 tratamentos com 8 unidades experimentais para cada grupo.

Os coelhos foram mantidos no biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas (UNICAMP), com temperatura controlada entre 20 e 22 °C com período de luz de 12 horas.

A dieta foi fornecida em quantidade limitada a 100 g/dia durante 30 dias para obter a mesma velocidade de crescimento, água foi fornecida ad-libitum. Foi usada uma dieta base não purificada, de fórmula aberta (Criacoelho, de Mogiana Alimentos, S.P., Brasil, peletizada, contendo 20% de proteína, 45% de

carboidrato, 5% de gordura, 16% de fibra e 14 % de cinzas (p/p). As concentrações de proteína, lipídios e carboidratos foram verificadas através dos métodos descritos no AOAC, 1980.

A dieta base foi fornecida ao grupo normocolesterolêmico, enquanto que os outros 16 grupos de coelhos foram submetidos à dieta base com 0,5% de colesterol. A suplementação foi feita dissolvendo 5 g de colesterol em 100 g de gordura de Babaçu (TR Brasil), aquecida e logo misturada com 1 kg da dieta base, até que os pellets tivessem absorvido completamente os lipídios. Esta dieta foi preparada semanalmente e armazenada a 4° C. A gordura de Babaçu proporcionou 70, 17 e 13% de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados respectivamente.

A concentração de colesterol na dieta e a dose usada de vitamina E foram baseadas nos resultados de TOMIKAWA et al 1982 e KLEINVELD et al. , 1994 respectivamente.

Todos os grupos, exceto os grupos normocolesterolêmico e hipercolesterolêmico (HH), foram submetidos aos seguintes tratamentos:

Grupo 1 :Normocolesterolêmico (NN)

Grupo 2: Hipercolesterolêmico (HH)

Grupo 3: HH +suplementação com vitamina E durante 2 dias (E-2)

Grupo 4: HH + suplementação com vitamina E, durante 4 dias (E-4)

Grupo 5: HH + suplementação com vitamina E, durante 6 dias (E-6)

Grupo 6: HH + administração de Pravastatina, durante 2 dias (P-2)

Grupo 7: HH + administração de Pravastatina, durante 4 dias (P-4)

Grupo 8: HH + administração de Pravastatina, durante 6 dias (P-6)

Grupo 9: HH + administração de Sinvastatina, durante 2 dias (S-2)

Grupo 10: HH + administração de Sinvastatina, durante 4 dias (S-4)

Grupo 11: HH + administração de Sinvastatina, durante 6 dias (S-6)

Grupo 12: HH + Pravastatina + vitamina E, durante 2 dias (PE-2)

Grupo 13: HH + Pravastatina + vitamina E, durante 4 dias (PE-4)

Grupo 14: HH + Pravastatina + vitamina E, durante 6 dias (PE-6)

Grupo 15: HH + Sinvastatina + vitamina E, durante 2 dias (SE-2)

Grupo 16: HH + Sinvastatina + vitamina E, durante 4 dias (SE-4)

Grupo 17: HH + Sinvastatina + vitamina E, durante 6 dias (SE-6)

A vitamina E (50 U.I.) e as drogas hipocolesterolêmicas, pravastatina (15 mg) e sinvastatina (10 mg), estas dissolvidas em 5 ml de água, foram administradas cada manhã por intubação orogástrica, usando-se uma Sonda Levine nº 12, durante os 2, 4 e 6 dias, antes do 30º dia do experimento.

A vitamina E, sintética, sob a forma de acetato dl- α -tocoferol (1 U.I. equivalente a 1 mg), foi fornecida pelo laboratório farmacêutico Aché e a pravastatina sódica (Pravacol) e a sinvastatina (Zocor) foram fornecidas pelos laboratórios Bristol-Myers-Squibb e Merck-Sharp-Dohme, respectivamente.

3.2.2 COLETA DE SANGUE

Os coelhos, deixados em jejum por 16 horas, foram imobilizados para extrair o sangue por punção cardíaca, usando uma seringa de 20 ml com agulha 40 x 12 mm (18G 1½). O sangue foi coletado em tubos 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 Sorvall (Modelo RC5C, Du Pont Company, Newtown, CT, EUA) a 4°C, por 20 minutos, a 3.000 r.p.m. e imediatamente processado, segundo o esquema de trabalho da Figura 1. Todas as análises foram feitas em duplicata.

3.2.3 ISOLAMENTO DA LDL

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 ClearTM " apropriados para o rotor 50.3 T1 e centrifugada a velocidade de 40.000 r.p.m. (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 foram retirados e mantidos em gelo, removendo a camada sobrenadante por aspiração com pipeta pasteur de ponta fina, obtendo-se a VLDL (d <1,006 g/ml). A fase inferior foi ajustada à 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- Na_2 / litro. Os tubos foram submetidos a uma segunda centrifugação a 40.000 r.p.m. por 20 horas, a 4°C. A camada superior contendo LDL ($d = 1,006-1,063$ g/ml) foi 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. O protocolo experimental está representado na Figura 2.

3.2.4 DIÁLISE DE LDL

Para remover os sais e o EDTA, a LDL foi dialisada contra o tampão fosfato salino 0,02 M, pH 7,4 (contendo NaCl 0,9%, Na_2HPO_4 0,3%, NaH_2PO_4 0,2 % e NaOH 0,038%), a 4° C por 24 horas, com agitação suave, utilizando 2 litros de tampão para cada 6 sacos de membrana de diálise de 10.000 daltons, contendo um volume de 1,5 a 2,0 ml de LDL.

3.2.5 MODIFICAÇÃO OXIDATIVA DA LDL

A oxidação da LDL foi realizada de maneira similar ao método de PARTHASARATHY et al. (1990), incubando-se 200 μg de proteína de LDL / ml em tampão fosfato 10 mM, pH 7,4 com 20 μl de uma solução de 1mM de sulfato de cobre, por 24 horas em banho maria a 37°C com agitação, em tubo aberto para facilitar a troca com o oxigênio atmosférico. A oxidação foi interrompida pelo resfriamento e adição de 20 μl de 1 mM de EDTA- Na_2 .

A extensão da peroxidação lipídica foi medida pela produção de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS), expressas como equivalentes de dialdeído malônico (MDA) por mg de proteína (PARTHASARATHY et al., 1985). Foi misturada 100 μg de proteína da LDL em um volume final de 0,5 ml com 1 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,67% em 0,05M NaOH) e 300 μl de ácido tricloroacético (TCA 50%), incubando-se a 100° C por 30 minutos e logo resfriado em banho de gelo e centrifugado a 2.500

r.p.m. por 15 minutos. A leitura do sobrenadante foi feita a 532 nm, usando espectrofotômetro Beckman DU-70.

A quantificação de TBARS foi feita pela comparação com a curva padrão (0 - 0,05 mM) de equivalentes de dialdeído malônico (MDA) gerado pela hidrólise ácida do 1,1,3,3 tetrametoxipropano.

3.2.6 DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL DA HDL

Para a obtenção da fração da HDL, utilizou-se o método de precipitação das lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade, VLDL e LDL, que contém apo B, segundo o método de LOPEZ-VIRELLA et al. (1977).

A 500 µl de plasma adicionou-se 1 ml do reagente precipitante das lipoproteínas VLDL e LDL (HDL-colesterol, Boehringer Mannheim), contendo ácido fosfotúngstico (0,55 mM) e cloreto de magnésio (25 mM). O plasma foi agitado em vórtex, mantido à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugando a 2.500 r.p.m. por 20 minutos. O sobrenadante foi aspirado e, neste, mediu-se o colesterol da HDL.

3.2.7 DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL E TRIACILGLICERÓIS PLASMÁTICOS

A medida do colesterol plasmático foi determinada pelo método enzimático, usando o kit de colesterol CHOD-PAP (Boehringer-Mannheim), onde a hidrólise do colesterol e ésteres de colesterol estão acopladas a uma reação de cor, monitorada a 546 nm (WARNICK, 1986). A 10 µl de plasma foi adicionado 1 ml de reagente, 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 (Merck), onde a hidrólise libera o glicerol que é determinado por uma reação de cor, com leitura a 546 nm (WARNICK, 1986). Uma solução de glicerol, correspondente a 200 mg/dl de triacilgliceróis, foi usada como padrão.

Para 10 µl de amostra adicionou-se, 1 ml de reagente, incubando-se a 37°C por 5 minutos.

3.2.8 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 fosfolipídios e proteínas. Os fosfolipídios foram determinados pelo método enzimático usando o kit enzimático (Doles), onde a hidrólise foi associada a uma reação de cor, com leitura a 510 nm (WARNICK, 1986).

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

3.2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A diferença do perfil lipídico, da composição da LDL e da peroxidação lipídica entre os diversos tratamentos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), usando o procedimento "general linear model" (PROC GLM), do software Statiscal Analysis System (SAS Institute, Cary NC, EUA), versão 6.08 para computador IBM. O grupo normocolesterolêmico, com dieta normal, não foi usado nesta análise.

As comparações múltiplas foram determinadas pelo teste de Tukey, ao nível de probabilidade de 5%. Todos os dados foram expressos como as médias e desvio padrão.

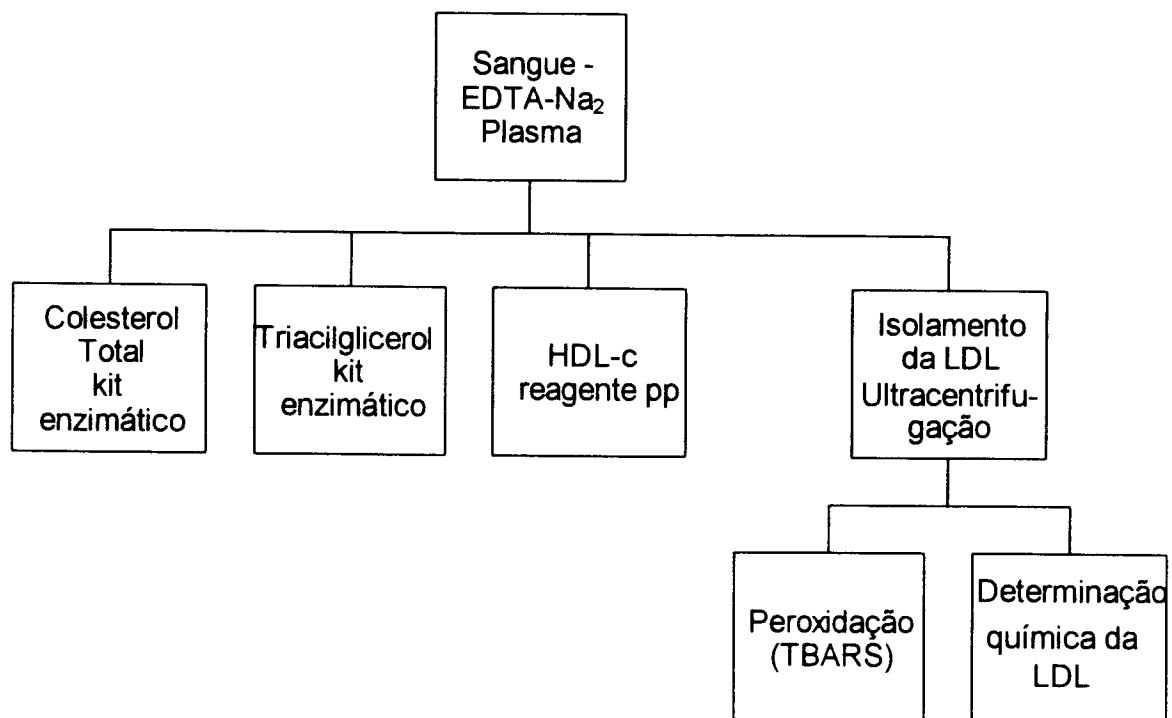


Figura 1 Esquema Geral de Trabalho. HDL=lipoproteína de alta densidade, LDL=lipoproteína de baixa densidade, pp=precipitante, TBARS=substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico.

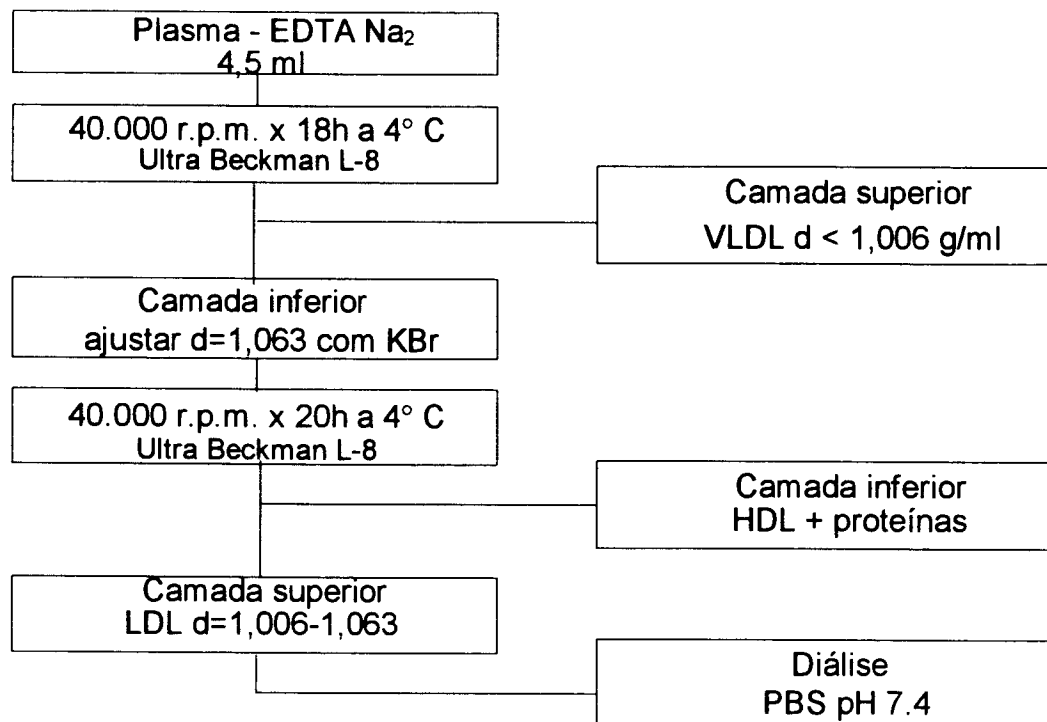


Figura 2 Isolamento da LDL e VLDL. LDL= lipoproteína de baixa densidade, VLDL= lipoproteína de muito baixa densidade, PBS= tampão fosfato-salino, d=densidade.

4 RESULTADOS

Do início ao final do experimento os 17 grupos de coelhos apresentaram pesos corporais similares. Como pode-se apreciar na Tabela 1, não foram observadas diferenças significativas. Não foi observado nenhum efeito adverso visível; o aspecto saudável dos animais indicou que tanto o estado sanitário como o manejo foram eficientes e que o excesso de lipídios no alimento não alterou, aparentemente, a saúde dos coelhos.

4.1 Colesterol Plasmático

As Figuras 3, 4 e 5 representam as concentrações plasmáticas do colesterol total nos diversos grupos experimentais. Da observação das três figuras em conjunto, podemos analisar as diferenças entre os tratamentos, através das anotações estatísticas e para uma melhor compreensão dos efeitos, cada figura está desenhada para comparar os tratamentos durante um período de tempo (2, 4 e 6 dias) com o grupo hipercolesterolêmico.

O colesterol plasmático do grupo controle, hipercolesterolêmico HH, foi de $1360,51 \pm 159,22$ mg/dl, aumentando 23 vezes em relação ao valor do grupo normocolesterolêmico (NN).

Na Figura 3 apresentam-se as concentrações de colesterol plasmático do grupo HH, e dos grupos que receberam a suplementação de vitamina E (E-2), a administração de pravastatina (P-2), sinvastatina (S-2), e os que receberam vitamina E mais pravastatina (PE-2) e vitamina E mais sinvastatina (SE-2) durante dois dias. Observa-se que os níveis de colesterol total foram menores quando comparados com o grupo HH, sem alcançar significância estatística. Não foi observada diferença significativa entre os grupos que receberam os tratamento durante dois dias.

Os grupos P-4, PE-4, S-4 e SE-4, que receberam os tratamentos durante 4 dias, apresentaram menores níveis de colesterol total, estatisticamente significativos, quando comparados com o grupo HH. Porém não houve diferença significativa entre eles, nem com os grupos E-2, P-E, PE-2, S-2 e SE-2, que receberam os tratamentos durante dois dias (Figura 4).

Os grupos que receberam tratamento durante 6 dias, E-6, P-6, PE-6, S-6 e SE-6, apresentaram concentrações de CT menores significativamente ($p < 0,05$) quando comparados com o grupo HH. Os níveis de colesterol total nos grupos E-6, P-6 e S-6, por sua vez, não apresentaram diferença significativa entre eles, porém quando comparados com os grupos PE-6 e SE-6, observou-se diferença significativa, sendo que estes últimos apresentaram as menores concentrações de colesterol total (Figura 5).

Ao comparar os níveis de CT no tempo de tratamento de 6 dias com os de 2 e 4 dias, observou-se que estes dois últimos apresentaram maiores níveis de CT, estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

4.2 Triacilgliceróis

As figuras 6, 7 e 8 representam as concentrações plasmáticas de triacilgliceróis nos diversos grupos experimentais. Da observação das três figuras em conjunto, podemos analisar as diferenças entre os tratamentos, através das anotações estatísticas e para uma melhor compreensão dos efeitos, cada figura está desenhada para comparar os tratamentos durante um período de tempo (2, 4 e 6 dias) com o grupo hipercolesterolêmico.

O aumento de TG no grupo HH foi três vezes o valor do grupo com dieta normocolesterolêmica ($119,00 \pm 35,26$ mg/dl).

Na figura 6 representa-se os níveis dos triacilgliceróis plasmáticos (TG) para os grupos que receberam os tratamentos durante 2 dias. No grupo HH observou-se a maior concentração de TG ($308,28 \pm 78,61$ mg/dl), sem alcançar

diferenças significativas ($p < 0,05$), quando comparado com os grupos E-2, P-2, PE-2, S-2 e SE-2.

Na Figura 7 encontram-se os níveis de TG para os grupos que receberam os tratamentos durante 4 dias. Observou-se concentrações significativamente menores de TG ($p < 0,05$) nos grupos P-4, PE-4, S-4 e SE-4, em relação ao grupo HH. Quando comparados, entre si, os grupos que receberam os tratamentos durante 2 e 4 dias, não foram observadas diferenças significativas entre eles.

Na figura 8 observa-se os níveis de TG nos grupos que receberam tratamento durante 6 dias. Verificou-se que estes grupos tiveram níveis menores, estatisticamente significativos em relação ao grupo HH e os grupos P-6 e S-6 foram significativamente menores que os grupos E-6, PE-6 e SE-6.

Nos grupos com tratamento durante 2 e 4 dias, quando comparados com os grupos de tratamento de 6 dias foi observado que somente os grupos P-6 e S-6 apresentaram valores de TG significativamente menores ($p < 0,05$).

4.3 Lipoproteínas Plasmáticas

Na Tabela 2 apresenta-se o perfil das lipoproteínas plasmáticas, representado por LDL colesterol (LDL-c), VLDL colesterol (VLDL-c) e HDL colesterol (HDL-c).

As concentrações de LDL-c e VLDL-c no grupo HH foram 49 e 46 vezes maiores, respectivamente, do que no grupo normocolesterolêmico (NN), enquanto que a concentração de HDL-c foi apenas 1,5 vezes maior do que no grupo NN ($p < 0,05$).

4.3.1 LDL-c

Para 2 dias de tratamento, os grupos E-2, P-2, PE-2, S-2 e SE-2 tiveram concentrações da LDL-c menores que as do grupo HH, sem alcançar diferenças significativas, com exceção do grupo PE-2 (Tabela 2).

Os grupos com tratamento durante 4 dias, P-4, PE-4, e SE-4 apresentaram concentrações da LDL significativamente menores que as do grupo HH e quando comparados com os grupos que receberam tratamento durante 2 dias, foram observadas diferenças significativas somente no grupo S-2, que apresentou maior concentração de LDL-c.

Já os grupos com tratamento durante 6 dias, (E-6, P-6, PE-6, S-6 e SE-6) apresentaram todos valores de LDL-c significativamente menores quando comparados com as do grupo HH ($p < 0,05$). Os grupos PE-6 e SE-6 apresentaram as menores concentrações de LDL, sendo ainda significativamente diferentes dos grupos que receberam tratamento durante 2 e 4 dias, ($p < 0,05$).

4.3.2 VLDL-c

Nos grupos com os tratamentos durante 2 dias, PE-2 e SE-2 observou-se níveis significativamente menores da VLDL-c, quando comparados com o grupo controle (HH).

Os grupos que receberam tratamento durante o período de 4 dias, P-4, PE-4, S-4 e SE-4 apresentaram menores valores da VLDL-c, estatisticamente significativo, quando comparados com o grupo controle (HH) e já, comparando-se com os grupos que receberam tratamento durante 2 dias, diferiram, somente, do grupo E-2 que apresentou maior nível da VLDL-c.

Os grupos que receberam tratamento durante 6 dias apresentaram menores valores da VLDL-c, estatisticamente significativos, quando comparados com o grupo HH.

Os grupos PE-6 e S-6 apresentaram menores valores da VLDL-c, sendo significativamente diferentes dos valores dos grupos que receberam tratamento durante 2 e 4 dias ($p < 0,05$). Dentre os grupos que receberam tratamento durante 6 dias, verificou-se que o grupo PE-6 foi significativamente diferente, quando comparado com os grupos E-6, P-6, S-6 e SE-6, obtendo a menor concentração da VLDL-c, observada no grupo PE-6 ($p < 0,05$).

4.3.3 HDL-c

O grupo HH teve concentração significativamente maior de HDL-c, quando comparada com a do grupo normocolesterolêmico ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas dos níveis de HDL-c entre os grupos que receberam os tratamentos durante 2 e 4 dias, quando comparados com o grupo HH.

Não foram observadas diferenças significativa das concentrações da HDL-c entre os grupos que receberam tratamento por 6 dias. Porém, os níveis da HDL-c foram significativamente maiores nos grupos PE-6 e SE-6 quando comparados com os dos grupo HH ($p < 0,05$) e E-2, P-2, S-2, E-4 e S-4 ($p < 0,05$).

4.4 Distribuição percentual das lipoproteínas.

As figuras 9, 10 e 11 representam as percentagens das lipoproteínas em relação ao seu conteúdo de colesterol nos diversos grupos experimentais. Da observação das três figuras em conjunto, podemos analisar as diferenças entre os tratamentos, através das anotações estatísticas e para uma melhor compreensão dos efeitos, cada figura está desenhada para comparar os

tratamentos durante um período de tempo (2, 4 e 6 dias) com o grupo hipercolesterolêmico.

Na figura 9, apresenta-se as percentagens da LDL-c, VLDL-c e HDL-c, dos grupos E-2, P-2, PE-2, S-2 e SE-2. Observou-se que a maior percentagem de colesterol foi encontrado na LDL-c e a menor na HDL-c. Não houve diferença significativa na distribuição do colesterol entre o grupo HH e os grupos que receberam os tratamentos durante 2 dias.

Na Figura 10 apresenta-se as percentagens de LDL-c, VLDL-c e HDL-c dos grupos com tratamento durante 4 dias. A maior percentagem observada em todos os grupos também corresponde a LDL-c. Não houve diferença significativa da percentagem da LDL-c entre os grupos que receberam tratamento durante 4 dias, em relação ao grupo controle, tampouco houve diferença significativa entre eles.

Nas percentagens da VLDL-c, os grupos E-4, P-4 e PE-4 não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo HH. Já na distribuição percentual da HDL-c, os grupos P4 e PE-4 apresentaram maiores valores significativos em relação ao grupo HH.

A distribuição do colesterol nas lipoproteínas para o grupo com tratamento durante 6 dias, E-6, P-6, PE-6, S-6 e SE-6, apresenta-se na Figura 11. Em relação a percentagem da LDL foi observada diferença significativa entre os grupos SE-6 e HH, sendo que este último apresentou maior nível ($p < 0,05$). Na percentagem da VLDL-c, observa-se que os grupos E-6, P-6 e S-6 apresentaram valores significativamente menores em relação ao grupo HH ($p < 0,05$). Nas percentagens da HDL-c foram observadas diferenças significativas entre o grupo HH e os grupos E-6, P-6, PE-6, S-6 e SE-6, sendo que estes grupos apresentaram valores maiores ($p < 0,05$).

Quando comparamos o tempo de tratamento e as percentagens das lipoproteínas, observou-se que, no segundo dia de tratamento, não houve diferenças significativas para as percentagens de LDL-c, VLDL-c e HDL-c. As diferenças apresentaram-se no quarto dia de tratamento, somente para as

percentagens de VLDL-c nos grupos S-4 e SE-4. Já no sexto dia de tratamento as mudanças das porcentagens foram observadas em todas as lipoproteínas.

O grupo SE-6 apresentou menor valor significativo da % LDL e os grupos E-6, P-6 e S-6 apresentaram menores valores significativos da % VLDL quando comparados com o grupo HH. No caso da percentagem de HDL, todos os grupos que receberam tratamentos durante 6 dias foram significativamente maiores ($p < 0,05$) que a do grupo HH

4.5 Proporções lipídicas

As proporções entre as concentrações do colesterol total, HDL-colesterol e LDL-colesterol são importantes para interpretar o risco para as doenças cardiovasculares. Os índices que relacionam o colesterol total, ou LDL-c, com HDL-c são denominados, respectivamente, de índice de risco 1 (colesterol total/HDL-c) e 2 (LDL-c/HDL-c). O risco para coronariopatia será tanto maior quanto maiores forem os valores desse índices.

Na tabela 3, apresenta-se as médias dos índices de risco CT/HDL-c e LDL-c/HDL-c. Estas proporções no grupo HH foram, respectivamente, 15 e 32 vezes maiores que o grupo normocolesterolêmico.

Os grupos que foram suplementados com vitamina E e/ou tratados com pravastatina ou sinvastatina durante 2 dias, não apresentaram diferenças significativas nos índices CT/HDL-c e LDL-c/HDL-c, quando comparados com o grupo HH.

O parâmetro CT/HDL-c nos grupos E-4, S-4 e SE-4 não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo HH. Porém, os grupos P-4 e PE-4 apresentaram valores significativamente menores quando comparados com o grupo HH. O índice lipídico LDL-c/HDL-c nos grupos E-4, S-4 e SE-4 não apresentaram diferenças significativas com respeito ao grupo HH, enquanto que os grupos P-4 e PE-4 tiveram menores valores significativos em relação ao grupo HH.

Os valores da proporção CT/HDL-c, nos grupos E-6, P-6, PE-6, S-6 e SE-6, que receberam tratamento durante 6 dias, foram significativamente menores, quando comparados com os do grupo HH. Os grupos PE-6 e SE-6 apresentaram valores significativamente menores na proporção CT/HDL-c em relação aos grupos que receberam tratamento durante 2 e 4 dias. Quanto aos valores de LDL-c/HDL-c, dos grupos que receberam tratamento durante 6 dias foram significativamente menores que os do grupo HH. Os grupos PE-6 e SE-6 apresentaram menores valores do que aqueles grupos que receberam tratamento durante 2 e 4 dias.

4.6 Composição da LDL

A Tabela 4 mostra a composição da LDL nas concentrações de colesterol (C), triacilgliceróis (Tg), fosfolipídios (Fosf) e de proteínas (Prt) expressas em mg/dl de plasma.

Em relação à composição da LDL, no grupo HH, observou-se aumento significativo do conteúdo de todos os componentes da LDL com respeito ao grupo normocolesterolêmico ($p < 0,05$), indicando o aumento na quantidade desta lipoproteína no plasma.

Já quanto à composição da LDL nos grupos E-2, P-2, PE-2, S-2 e SE-2, que receberam tratamento durante 2 dias, não foram observadas diferenças significativas com relação ao grupo HH.

Para os grupos que receberam tratamento durante 4 dias foram observadas diferenças significativas no conteúdo de colesterol e de triacilgliceróis da LDL em relação ao grupo HH. Em contrapartida, o conteúdo de fosfolipídios e proteínas não indicou diferenças significativas em relação ao grupo HH. Os grupos P-4, PE-4 e SE-4 apresentaram menores concentrações significativas do colesterol da LDL em relação ao grupo HH. Os grupos P-4 e PE-4 apresentaram menores concentrações de triacilgliceróis em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Nos grupos que receberam os tratamentos durante 6 dias houve diferença significativa na composição da LDL, no conteúdo de colesterol total, triacilgliceróis, proteínas e fosfolipídios em relação ao grupo HH. No que diz respeito aos conteúdos de colesterol, triacilgliceróis e proteínas da LDL, foram observadas concentrações significativamente menores em todos os grupos, quando comparados com o grupo HH ($p < 0,05$). Já as concentrações das proteínas da LDL nos grupos que receberam os tratamentos durante 6 dias, apresentaram menores valores significativos em relação aos demais grupos, com a exceção do grupo E-6 que não apresentou diferença significativa em relação ao grupo HH.

Foram observadas diferenças significativas nas concentrações dos fosfolipídios da LDL nos grupos P-6, PE-6, S-6 e SE-6 quando comparado com o grupo HH ($p < 0,05$), sendo que este último grupo teve uma maior concentração. Não apresentaram diferenças significativas de fosfolipídios os grupos que receberam tratamento durante 2 e 4 dias, quando comparados com o grupo HH.

Quando avaliou-se a relação das quantidades de lipídios totais (do núcleo e da superfície) da partícula da LDL e a quantidade de proteína, isto é a relação de $\text{Colesterol} + \text{Triacilgliceróis} + \text{Fosfolipídios} / \text{Proteína}$ ($C + Tg + Fosf / Prt$), observou-se um aumento de 2.6 vezes para o grupo HH em relação ao grupo normocolesterolêmico (Tabela 4). Não houve diferenças significativas na relação $C + Tg + Fosf / Prt$ da LDL entre os grupos que receberam os tratamentos durante 2 e 4 dias, quando comparados com o grupo HH. Entretanto, nos grupos tratados por um período de 6 dias houve diferenças significativas em relação ao grupo HH. Os valores da relação $C + Tg + Fosf / Prt$ da LDL nos grupos E-6, PE-6, e SE-6 foram significativamente menores em relação aos dos grupos P-2, SE-2, E-4, e SE-4 ($p < 0,05$).

4.7 Distribuição percentual de cada componente da LDL

As figuras 12, 13 e 14 representam a distribuição percentual de cada componente da LDL nos diversos grupos experimentais. Da observação das três figuras em conjunto, podemos analisar as diferenças entre os tratamentos, através das anotações estatísticas e para uma melhor compreensão dos efeitos, cada figura está desenhada para comparar os tratamentos durante um período de tempo (2, 4 e 6 dias) com o grupo hipercolesterolêmico.

Analizando-se a distribuição percentual de cada componente na LDL, surgem algumas alterações nas partículas, em decorrência do tratamento. Na Figura 12, apresenta-se a distribuição percentual da composição da LDL dos grupos que receberam tratamento durante 2 dias, E-2, P-2, PE-2, S-2, e SE-2, não sendo observadas diferenças significativas em relação ao grupo HH.

Não foi observada, também, nenhuma alteração nas percentagens dos componentes da LDL nos grupos que receberam tratamento durante 4 dias, em relação ao grupo HH (Figura 13).

Na Figura 14, apresenta-se as percentagens dos componentes da LDL dos grupos que receberam tratamento durante 6 dias. Com respeito a percentagem do colesterol, os grupos E-6, P-6, PE-6 e SE-6 apresentaram valores significativamente menores que os do grupo HH ($p < 0,05$). Ainda com relação a esse grupo, não foram observadas diferenças significativas entre as percentagens de triacilgliceróis nos grupos tratados durante 6 dias, enquanto que as percentagens das proteínas nos grupos PE-6 e SE-6 foram significativamente maiores que o grupo HH ($p < 0,05$). Nas percentagens dos fosfolipídios da LDL dos grupos E-6, P-6, PE-6, S-6 e SE-6 foram notadas, diferenças significativas em relação ao grupo HH.

4.8 Modificação oxidativa da LDL

Nas figuras 15, 16 e 17 apresenta-se a formação de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) expresso em nanomoles de dialdeído malônico (MDA) por mg de proteína da LDL, equivalente à extensão da peroxidação lipídica da LDL nativa (LDL-nn) e da LDL induzida à oxidação (LDL-ox) por incubação com íons de cobre, nos diversos grupos experimentais. Da observação das três figuras em conjunto, podemos analisar as diferenças entre os tratamentos, através das anotações estatísticas e para uma melhor compreensão dos efeitos, cada figura está desenhada para comparar os tratamentos durante um período de tempo (2, 4 e 6 dias) com o grupo hipercolesterolêmico.

As concentrações de MDA na peroxidação lipídica da LDL nativa e oxidada dos grupos E-2, P-2, PE-2, S-2 e SE-2, são apresentados na Figura 15. A formação de TBARS na LDL nativa dos grupos E-2 e PE-2 foram significativamente menores que a do grupo HH. Para a LDL oxidada, os valores de MDA foram significativamente menores para os grupos que receberam suplementação da vitamina E, grupos E-2, PE-2 e SE-2 em relação ao grupo HH.

Na Figura 16, apresenta-se a peroxidação lipídica da LDL para os grupos que receberam os tratamentos durante 4 dias. Observa-se que houve diferenças significativas entre as concentrações de MDA da LDL oxidada dos grupos E-4, P-4, PE-4 e SE-4 quando comparados com o grupo HH. No caso da LDL nativa, essas diferenças foram observadas nos grupos E-4, PE-4 e SE-4, apresentando valores menores.

Na Figura 17, apresenta-se as concentrações de MDA da peroxidação lipídica da LDL dos grupos que receberam os tratamentos durante 6 dias. Foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de MDA para LDL oxidada em todos os grupos em relação ao grupo HH. As concentrações de MDA para LDL nativa foram significativamente menores para os grupos E-6, PE-6 e SE-6 em relação ao grupo HH.

Tabela 1 Média ($\pm$ desvio padrão) do peso inicial e final dos coelhos submetidos a dieta normo e hipercolesterolêmica (n=8).

Grupo	Peso inicial (kg)	Peso final (kg)
	1º dia	30º dia
NN	2,0 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,3
HH	2,0 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,2
E-2	1,9 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,3
P-2	2,0 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,2
PE-2	1,9 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,3
S-2	2,0 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,2
SE-2	2,0 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,2
E-4	1,8 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,2
P-4	2,0 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,2
PE-4	1,9 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,2
S-4	1,9 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,1
SE-4	2,0 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,2
E-6	2,0 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,1
P-6	2,0 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,1
PE-6	2,0 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,2
S-6	2,0 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,2
SE-6	2,0 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,2

Grupos: normocolesterolêmico (NN), hipercolesterolêmicos (HH) e tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE), vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 2, 4 e 6 dias, antes do 30º dia do experimento.

Tabela 2 Média ($\pm$ desvio padrão) das concentrações de colesterol total e o colesterol das Lipoproteínas plasmáticas (expressa em mg/dl)

	HDL-c	VLDL-c	LDL-c	CT
NN	32,28 $\pm$ 5,15	8,92 $\pm$ 2,22	18,41 $\pm$ 1,81	59,60 $\pm$ 4,92
HH	49,20 $\pm$ 4,63 ^b	410,53 $\pm$ 42,50 ^a	900,78 $\pm$ 148,07 ^a	1360,51 $\pm$ 159,22 ^a
E-2	49,67 $\pm$ 10,75 ^b	348,16 $\pm$ 56,88 ^a	791,24 $\pm$ 115,61 ^{ab}	1184,54 $\pm$ 162,59 ^{ab}
P-2	49,15 $\pm$ 8,27 ^b	295,50 $\pm$ 63,16 ^{ab}	794,01 $\pm$ 117,24 ^{ab}	1138,66 $\pm$ 155,82 ^b
PE-2	51,03 $\pm$ 8,13 ^{ab}	274,73 $\pm$ 52,25 ^{bc}	760,19 $\pm$ 121,99 ^{bcd}	1085,94 $\pm$ 92,34 ^{abc}
S-2	49,72 $\pm$ 6,93 ^b	281,19 $\pm$ 63,88 ^{abc}	849,57 $\pm$ 119,95 ^a	1172,13 $\pm$ 173,21 ^{ab}
SE-2	51,08 $\pm$ 6,20 ^{ab}	257,36 $\pm$ 62,57 ^{bc}	789,51 $\pm$ 85,59 ^{ab}	1097,96 $\pm$ 108,42 ^{abc}
E-4	49,88 $\pm$ 5,08 ^b	290,79 $\pm$ 51,73 ^{abc}	763,97 $\pm$ 110,48 ^{abc}	1109,69 $\pm$ 96,06 ^{abc}
P-4	55,09 $\pm$ 4,96 ^{ab}	268,81 $\pm$ 46,21 ^{bc}	730,70 $\pm$ 108,64 ^{bcd}	1054,56 $\pm$ 149,99 ^{bcd}
PE-4	54,80 $\pm$ 8,56 ^{ab}	270,97 $\pm$ 44,16 ^{bc}	724,00 $\pm$ 65,49 ^{bcd}	1049,77 $\pm$ 70,90 ^{bcd}
S-4	49,47 $\pm$ 4,06 ^b	267,78 $\pm$ 57,93 ^{bc}	768,21 $\pm$ 70,11 ^{abc}	1085,51 $\pm$ 110,92 ^{bcd}
SE-4	50,51 $\pm$ 7,33 ^{ab}	252,28 $\pm$ 24,12 ^{bc}	728,90 $\pm$ 102,00 ^{bcd}	1031,68 $\pm$ 125,51 ^{bcd}
E- 6	53,78 $\pm$ 7,29 ^{ab}	227,99 $\pm$ 51,63 ^{cd}	651,26 $\pm$ 71,03 ^{cd}	933,16 $\pm$ 65,98 ^{de}
P-6	55,01 $\pm$ 5,34 ^{ab}	232,55 $\pm$ 77,57 ^{bcd}	633,72 $\pm$ 78,01 ^d	921,27 $\pm$ 140,17 ^e
PE-6	57,98 $\pm$ 7,65 ^a	177,00 $\pm$ 60,24 ^e	418,03 $\pm$ 98,50 ^e	642,87 $\pm$ 140,32 ^f
S-6	54,11 $\pm$ 6,21 ^{ab}	217,04 $\pm$ 70,77 ^{de}	719,39 $\pm$ 100,98 ^{bcd}	956,20 $\pm$ 93,77 ^{cde}
SE- 6	59,75 $\pm$ 5,11 ^a	235,81 $\pm$ 38,95 ^{cd}	459,82 $\pm$ 98,83 ^e	755,38 $\pm$ 120,40 ^f

Grupo normocolesterolêmico (NN), hipercolesterolêmico (HH) e tratados com vitamina (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina, vitamina E+Sinvastatina durante 2, 4 e 6 dias, antes do 30º dia de experimentação. Médias seguidas com letras distintas diferem entre si ($p < 0,05$). HDL-c=HDL-colesterol, VLDL-c=VLDL-colesterol, LDL-c=LDL-colesterol, CT=colesterol total.

Tabela 3 Média ($\pm$ desvio padrão) das proporções lipídicas entre CT/HDL-c e LDL-c/HDL-c

Grupo	CT/HDL-c	LDL-c/HDL-c
NN	1,87 $\pm$ 0,18	0,58 $\pm$ 0,10
HH	28,14 $\pm$ 6,26 ^a	18,68 $\pm$ 4,94 ^a
E-2	22,96 $\pm$ 6,29 ^{ab}	16,78 $\pm$ 4,78 ^a
P-2	23,76 $\pm$ 5,31 ^{ab}	16,63 $\pm$ 4,14 ^a
PE-2	21,88 $\pm$ 5,11 ^{ab}	15,25 $\pm$ 3,82 ^b
S-2	23,57 $\pm$ 0,92 ^{ab}	17,11 $\pm$ 1,01 ^a
SE-2	21,77 $\pm$ 3,51 ^{ab}	15,68 $\pm$ 2,78 ^{ab}
E-4	21,78 $\pm$ 2,53 ^{ab}	15,38 $\pm$ 2,28 ^{ab}
P-4	19,19 $\pm$ 2,57 ^b	13,32 $\pm$ 2,08 ^b
PE-4	19,75 $\pm$ 4,68 ^b	13,68 $\pm$ 3,71 ^b
S-4	22,20 $\pm$ 4,07 ^{ab}	15,69 $\pm$ 2,62 ^{ab}
SE-4	20,65 $\pm$ 3,10 ^{ab}	14,59 $\pm$ 2,35 ^{ab}
E-6	17,49 $\pm$ 1,31 ^b	12,16 $\pm$ 0,79 ^b
P-6	17,09 $\pm$ 4,25 ^b	11,72 $\pm$ 2,54 ^b
PE-6	11,42 $\pm$ 3,72 ^c	7,39 $\pm$ 2,41 ^c
S-6	17,98 $\pm$ 3,58 ^b	13,59 $\pm$ 3,41 ^b
SE-6	12,73 $\pm$ 2,29 ^c	7,97 $\pm$ 1,68 ^c

Grupo normocolesterolêmico (NN), hipercolesterolêmico (HH) e tratados com vitamina (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina, vitamina E+Sinvastatina durante 2, 4 e 6 dias, antes do 30º dia de experimentação. Médias seguidas com letras distintas diferem entre si ($p < 0,05$). HDL-c=HDL-colesterol, VLDL-c=VLDL-colesterol, LDL-c=LDL-colesterol, CT=colesterol total.

Tabela 4 Média ($\pm$ desvio padrão) das concentrações do colesterol(c), triacilgliceróis (Tg), proteínas (Prt) e fosfolipídios (Fos) da LDL (expressa em mg/dl)

	c-LDL	Tg-LDL	Prt-LDL	Fos-LDL	C+Tg+Fos /Prt
NN	18,41 $\pm$ 1,81	5,20 $\pm$ 1,18	23,71 $\pm$ 3,64	12,11 $\pm$ 2,03	1,52 $\pm$ 0,84
HH	900,78 $\pm$ 148,07 ^a	103,64 $\pm$ 12,19 ^a	291,18 $\pm$ 20,71 ^a	143,03 $\pm$ 15,31 ^a	3,93 $\pm$ 0,35 ^{ab}
E-2	791,24 $\pm$ 54,61 ^{ab}	95,03 $\pm$ 7,24 ^a	272,00 $\pm$ 39,73 ^{ab}	134,62 $\pm$ 16,99 ^a	3,80 $\pm$ 0,37 ^{abc}
P-2	794,01 $\pm$ 117,24 ^{ab}	90,20 $\pm$ 12,82 ^{ab}	261,45 $\pm$ 18,37 ^{abc}	134,12 $\pm$ 13,31 ^a	3,92 $\pm$ 0,59 ^{ab}
PE-2	760,19 $\pm$ 121,99 ^{bcd}	84,48 $\pm$ 17,46 ^{abc}	259,52 $\pm$ 47,48 ^{abc}	131,35 $\pm$ 32,91 ^{ab}	3,78 $\pm$ 0,30 ^{abc}
S-2	849,57 $\pm$ 119,95 ^a	82,11 $\pm$ 6,78 ^{abc}	255,48 $\pm$ 21,84 ^{abc}	134,54 $\pm$ 11,34 ^a	4,17 $\pm$ 0,22 ^{ab}
SE-2	789,51 $\pm$ 85,59 ^{ab}	84,42 $\pm$ 5,69 ^{abc}	256,57 $\pm$ 23,85 ^{abc}	135,25 $\pm$ 10,05 ^a	3,94 $\pm$ 0,24 ^a
E-4	763,97 $\pm$ 110,48 ^{abc}	85,16 $\pm$ 9,48 ^{abc}	252,52 $\pm$ 36,76 ^{abc}	130,31 $\pm$ 22,76 ^{ab}	3,90 $\pm$ 0,42 ^{ab}
P-4	730,70 $\pm$ 108,64 ^{bcd}	73,89 $\pm$ 6,34 ^{bcd}	252,74 $\pm$ 23,08 ^{abc}	135,94 $\pm$ 10,84 ^a	3,72 $\pm$ 0,28 ^{abc}
PE-4	724,00 $\pm$ 65,49 ^{bcd}	76,62 $\pm$ 10,73 ^{bcd}	244,71 $\pm$ 13,87 ^{abc}	123,90 $\pm$ 9,24 ^{abcd}	3,80 $\pm$ 0,45 ^{abc}
S-4	768,21 $\pm$ 70,11 ^{abc}	78,91 $\pm$ 6,95 ^{bcd}	246,26 $\pm$ 18,78 ^{abc}	131,28 $\pm$ 8,77 ^{abc}	3,97 $\pm$ 0,16 ^{abc}
SE-4	728,90 $\pm$ 102,00 ^{bcd}	77,62 $\pm$ 12,56 ^{bcd}	244,07 $\pm$ 22,74 ^{abc}	127,72 $\pm$ 12,10 ^{abcd}	3,82 $\pm$ 0,21 ^{ab}
E-6	651,26 $\pm$ 71,03 ^{cd}	74,64 $\pm$ 5,39 ^{cde}	248,52 $\pm$ 14,52 ^{abc}	130,30 $\pm$ 12,76 ^{ab}	3,44 $\pm$ 0,21 ^c
P-6	635,72 $\pm$ 78,01 ^d	65,75 $\pm$ 9,53 ^e	224,21 $\pm$ 23,55 ^{cd}	120,66 $\pm$ 14,42 ^{bcd}	3,66 $\pm$ 0,15 ^{ct}
PE-6	418,03 $\pm$ 98,50 ^e	66,52 $\pm$ 22,65 ^e	214,87 $\pm$ 38,79 ^d	110,63 $\pm$ 21,00 ^{cd}	2,77 $\pm$ 0,39 ^d
S-6	719,39 $\pm$ 100,98 ^{bcd}	71,25 $\pm$ 6,23 ^{de}	215,41 $\pm$ 20,58 ^d	108,24 $\pm$ 17,24 ^{cd}	4,17 $\pm$ 0,25 ^a
SE-6	459,82 $\pm$ 98,83 ^e	68,79 $\pm$ 17,22 ^e	216,50 $\pm$ 18,46 ^d	105,40 $\pm$ 14,28 ^d	2,92 $\pm$ 0,54 ^d

Grupo normocolesterolêmico (NN), hipercolesterolêmico (HH) e tratados com vitamina (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina, vitamina E+Sinvastatina durante 2, 4 e 6 dias, antes do 30º dia de experimentação. Médias seguidas com letras distintas diferem entre si ($p < 0,05$). HDL-c=HDL-colesterol, VLDL-c=VLDL-colesterol, LDL-c=LDL-colesterol, CT=colesterol total.

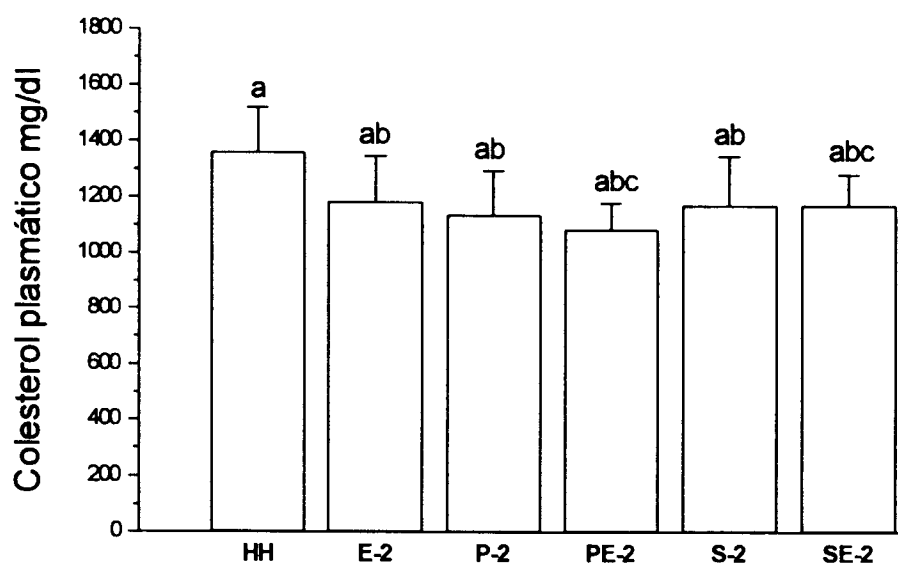


Figura 3 Colesterol total plasmático (média $\pm$ desvio padrão) dos grupos hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Simvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE) e vitamina E+Simvastatina (SE) durante 2 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença entre grupos ($p < 0,05$).

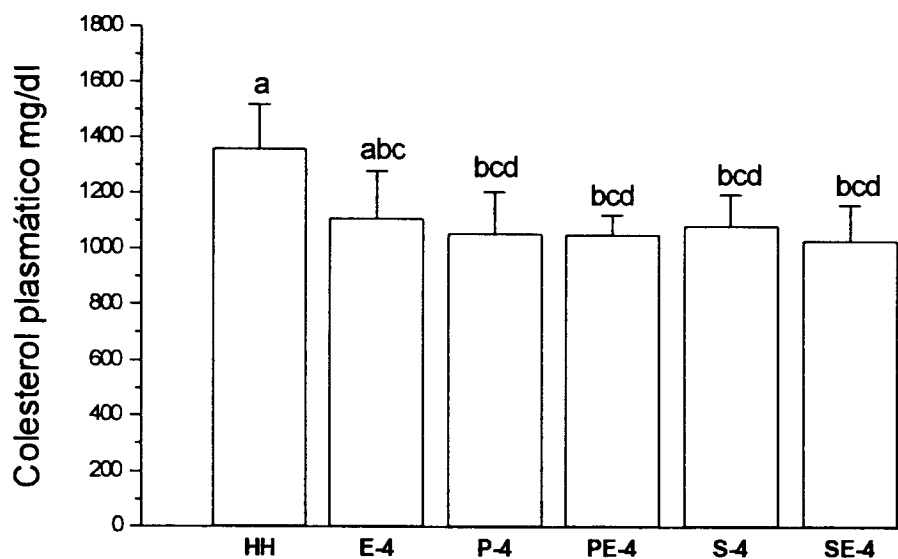


Figura 4 Colesterol total plasmático (média $\pm$ desvio padrão) dos grupos hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Simvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE) e vitamina E+Simvastatina (SE) durante 4 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença entre grupos ($p < 0,05$).

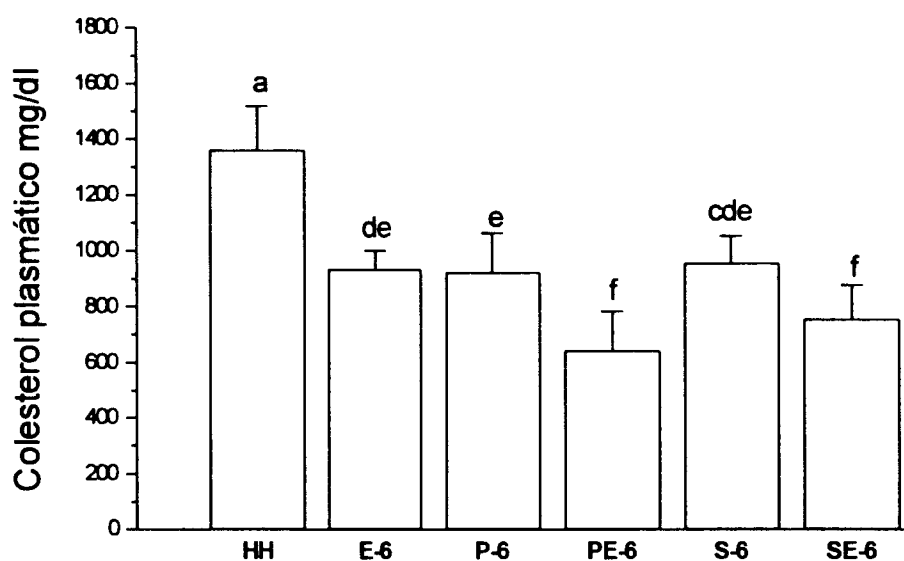


Figura 5 Colesterol total plasmático (média $\pm$ desvio padrão) dos grupos hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE) e vitamina E+Sinvastatina (SE) durante 6 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença entre grupos ($p < 0,05$).

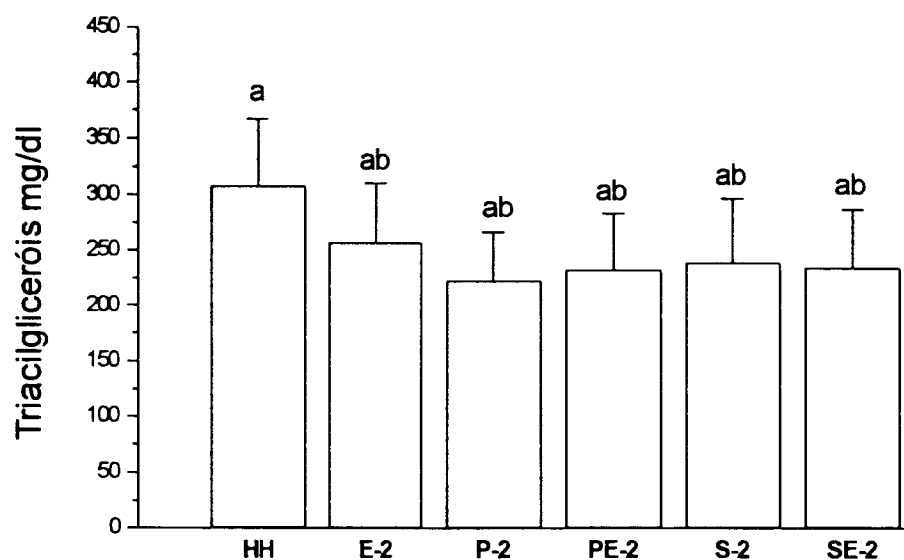


Figura 6. Concentrações de triacilgliceróis plasmáticos (média $\pm$ desvio padrão) dos grupos hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE) e vitamina E+Sinvastatina (SE) durante 2 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença entre grupos ($p < 0,05$).

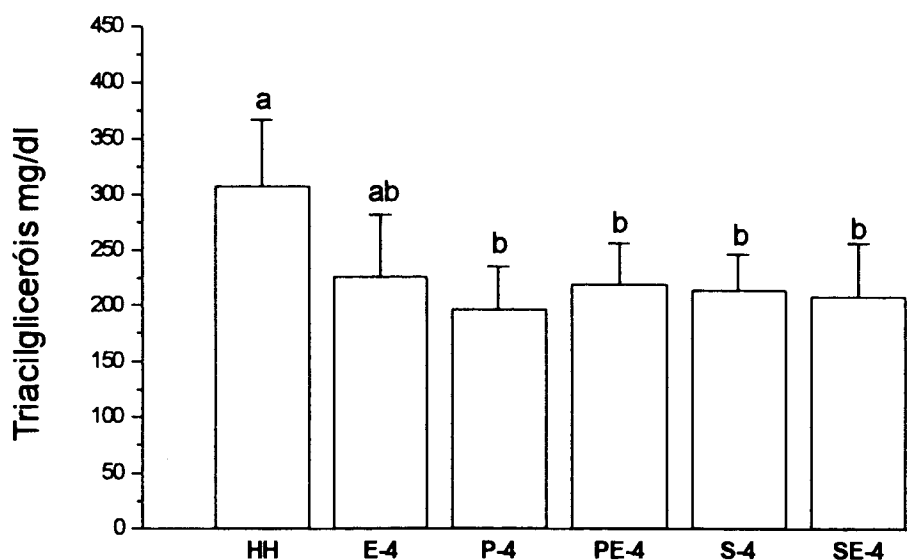


Figura 7 Concentrações de triacilgliceróis plasmáticos (média $\pm$ desvio padrão) dos grupos hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE) e vitamina E+Sinvastatina (SE) durante 4 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença entre grupos ($p < 0,05$).

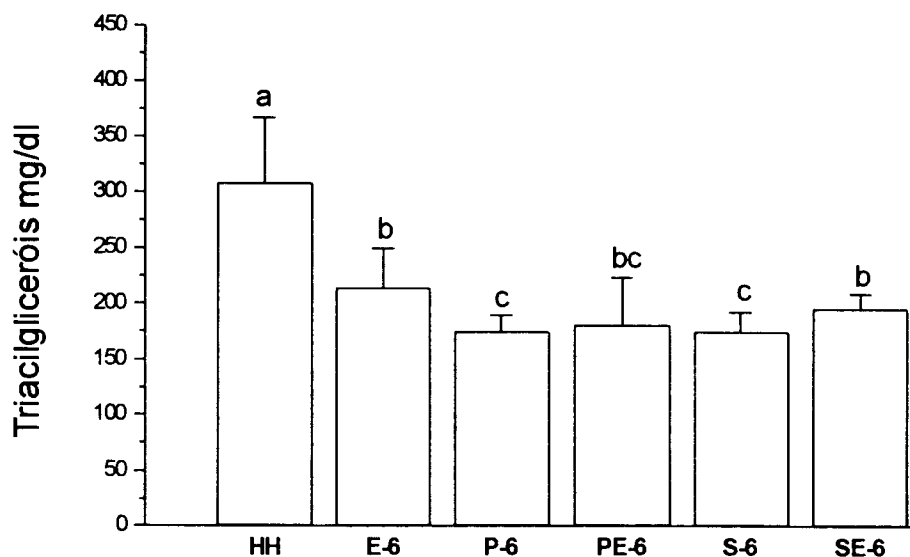


Figura 8 Concentrações de triacilgliceróis plasmáticos (média $\pm$ desvio padrão) dos grupos hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE) e vitamina E+Sinvastatina (SE) durante 6 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença entre grupos ($p < 0,05$).

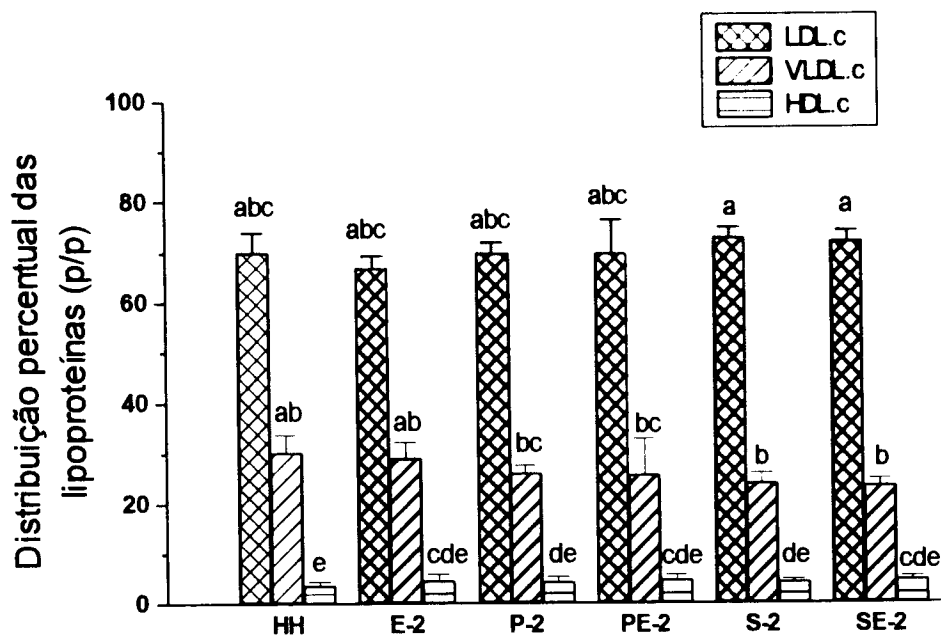


Figura 9 Média $\pm$ desvio padrão da distribuição percentual do colesterol nas lipoproteínas plasmáticas LDL-c, VLDL-c e HDL-c, dos grupos hipercolesterolêmico (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE) e vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 2 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

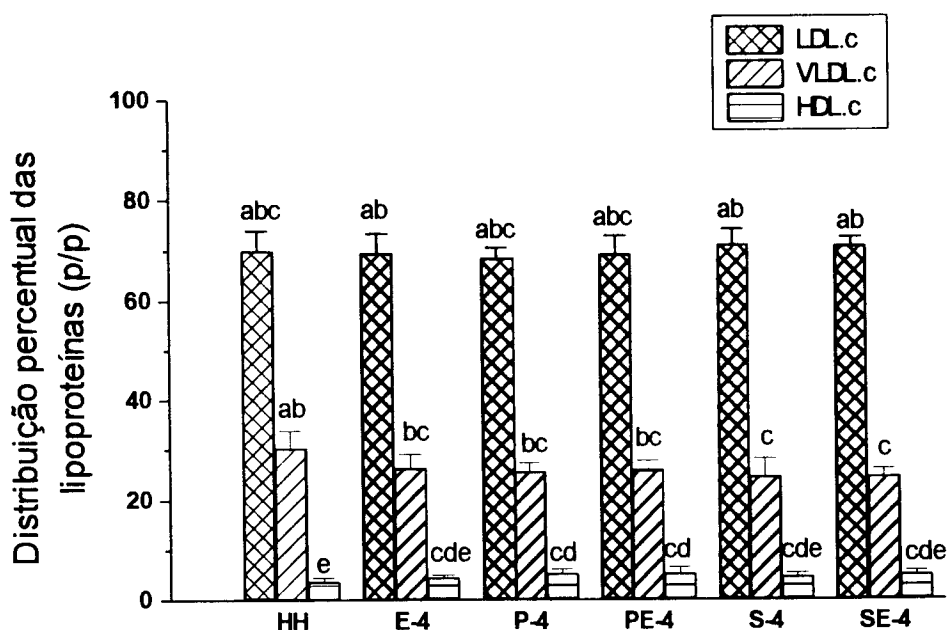


Figura 10 Média $\pm$ desvio padrão da distribuição percentual do colesterol nas lipoproteínas plasmáticas LDL-c, VLDL-c e HDL-c, dos grupos hipercolesterolêmico (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE) e vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 4 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

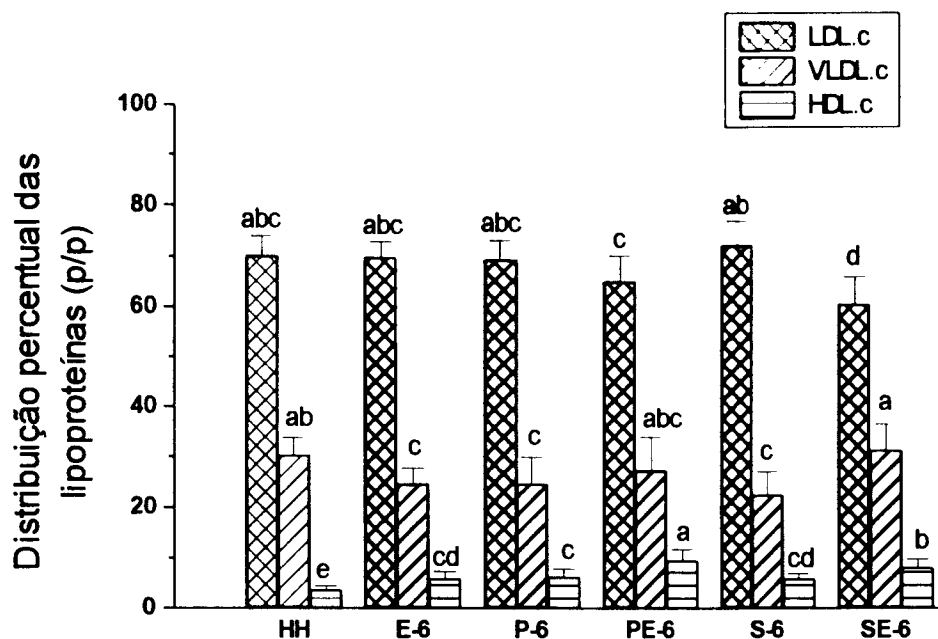


Figura 11 Média $\pm$ desvio padrão da distribuição percentual do colesterol nas lipoproteínas plasmáticas LDL-c, VLDL-c e HDL-c, dos grupos hipercolesterolêmico (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE) e vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 6 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

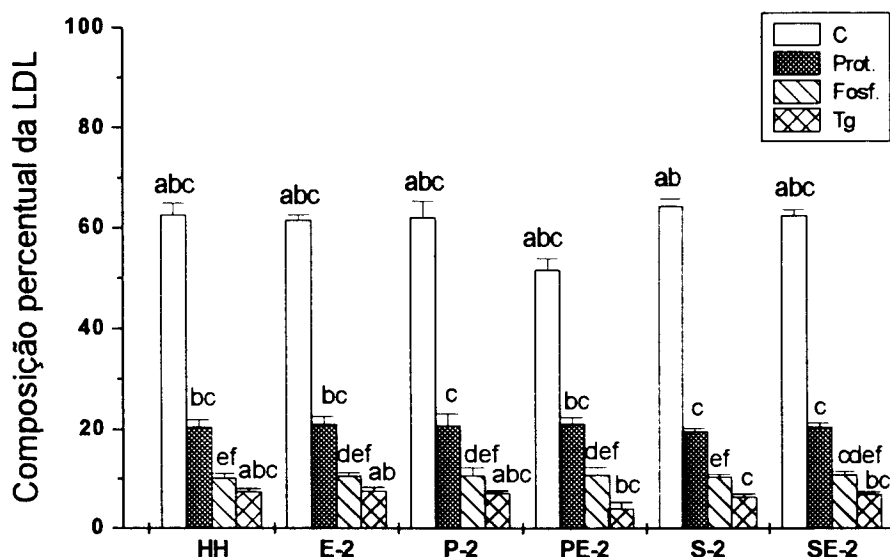


Figura 12. Média $\pm$ desvio padrão da composição percentual da LDL (p/p) dos grupos: hipercolesterolêmico (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE) e vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 2 dias, antes do 30º dia de experimentação. Colesterol total (C), proteínas (Prot), fosfolipídios (Fosf) e triacilgliceróis (Tg) da LDL. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

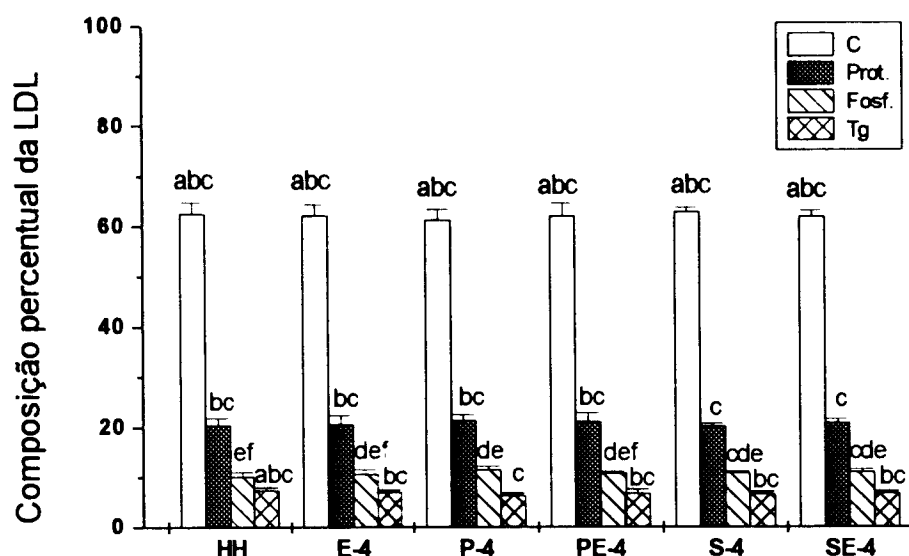


Figura 13. Média $\pm$ desvio padrão da composição percentual da LDL (p/p) dos grupos: hipercolesterolêmico (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE) e vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 4 dias, antes do 30º dia de experimentação. Colesterol total (C), proteínas (Prot), fosfolípidios (Fosf) e triacilgliceróis (Tg) da LDL. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

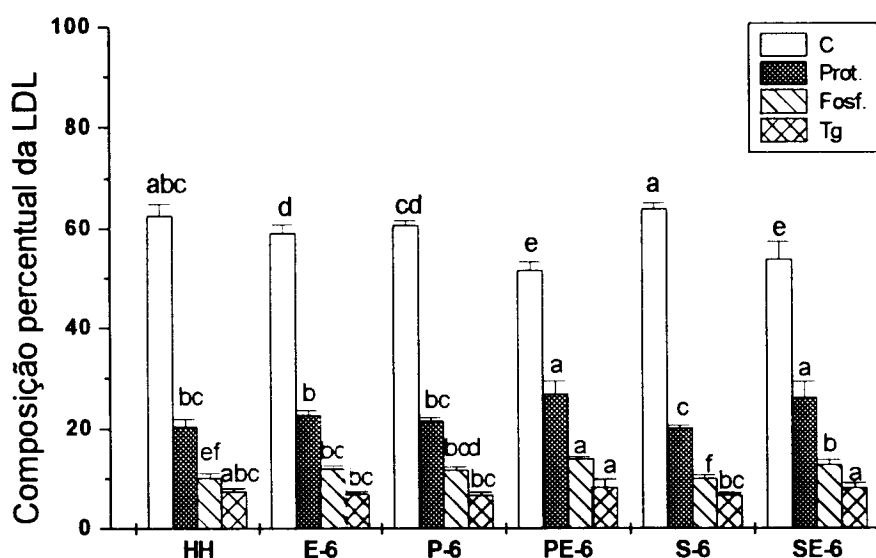


Figura 14. Média $\pm$ desvio padrão da composição percentual da LDL (p/p) dos grupos: hipercolesterolêmico (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE) e vitamina E+Sinvastatina (SE), durante 6 dias, antes do 30º dia de experimentação. Colesterol total (C), proteínas (Prot), fosfolípidios (Fosf) e triacilgliceróis (Tg) da LDL. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

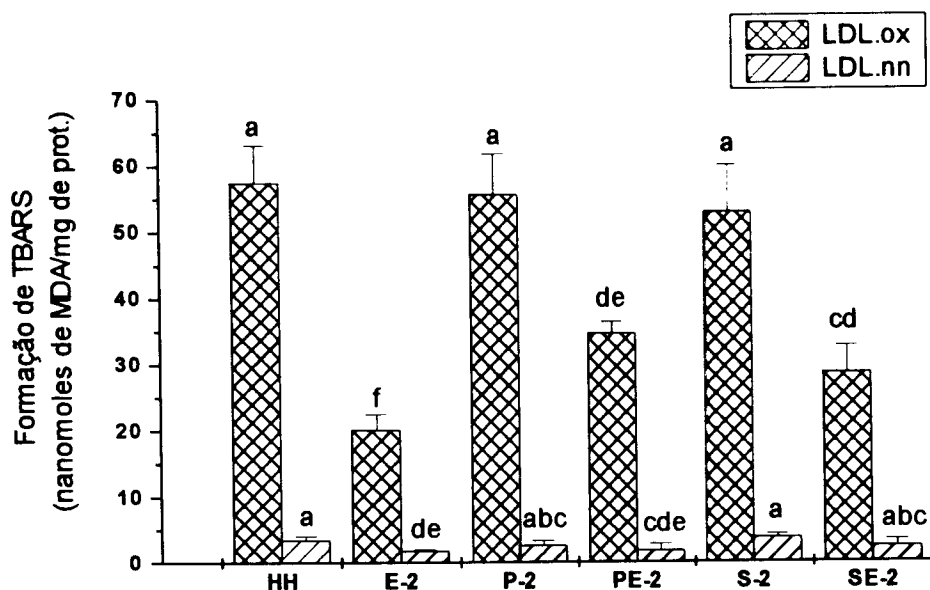


Figura 15 Média $\pm$ desvio padrão da peroxidação da LDL nativa (LDL-nn) e LDL oxidada (LDL-ox) expressa em nanomoles de dialdeído malônico (MDA)/mg de proteína. Grupos hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE) vitamina E+Sinvastatina (SE) durante 2 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença entre os grupos ($p < 0,05$)

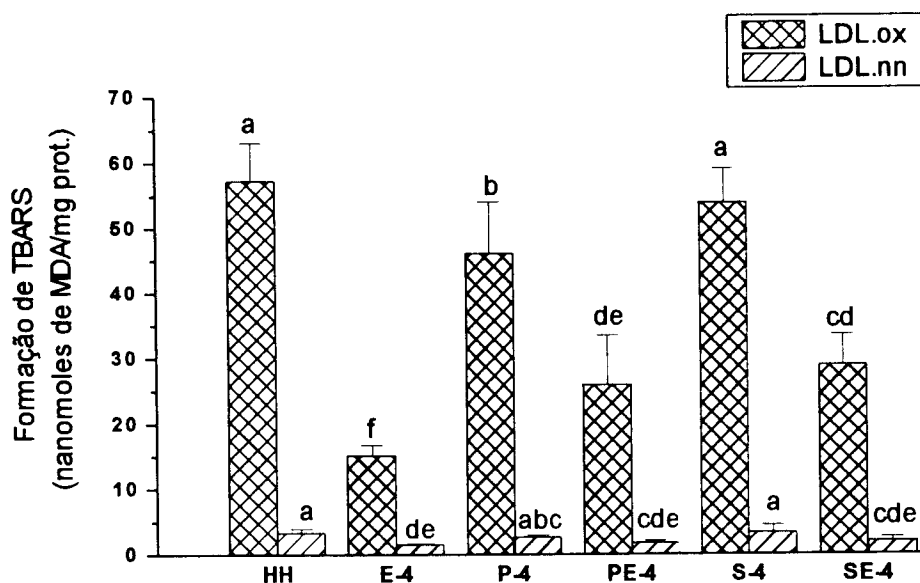


Figura 16 Média $\pm$ desvio padrão da peroxidação da LDL nativa (LDL-nn) e LDL oxidada (LDL-ox) expressa em nanomoles de dialdeído malônico (MDA)/mg de proteína. Grupos hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE) vitamina E+sinvastatina (SE) durante 4 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença entre os grupos ($p < 0,05$)

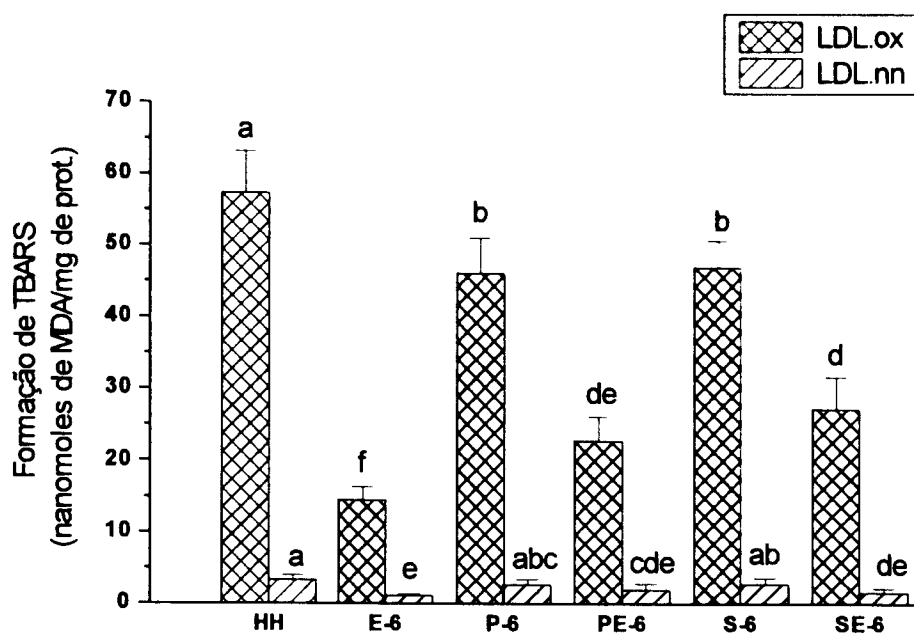


Figura 17 Média $\pm$ desvio padrão da peroxidação da LDL nativa (LDL-nn) e LDL oxidada (LDL-ox) expressa em nanomoles de dialdeído malônico (MDA)/mg de proteína. Grupos hipercolesterolêmicos (HH), tratados com vitamina E (E), Pravastatina (P), Sinvastatina (S), vitamina E+Pravastatina (PE) vitamina E+Sinvastatina (SE) durante 6 dias, antes do 30º dia de experimentação. Letras distintas indicam diferença entre os grupos ($p < 0,05$)

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, a hipercolesterolemia induzida em coelhos, pela dieta enriquecida com 0,5% de colesterol resultou em um aumento de 23 vezes do colesterol plasmático em relação ao grupo normocolesterolêmico. Achados similares foram encontrados pelos pesquisadores TOMIKAWA et al. (1982), ROTH et al. (1983), WILLIAMS et al. (1992), MANTHA et al. (1993) e NENSESTER et al. (1994). Na hipercolesterolemia induzida pela dieta, também foi encontrado um aumento de 46 vezes dos níveis da VLDL-colesterol em relação ao grupo normocolesterolêmico, fato que concorda com o relatado por vários autores (MANTHA et al., 1993; NENSETER et al., 1994, WILLIAMS et al., 1992). A VLDL rica em colesterol, denominada também β -VLDL, é característica da hipercolesterolemia induzida. Estas partículas de VLDL são grandes, muito turvas em solução e quando separadas por eletroforese em agarose, migram no lugar das β -lipoproteínas.

Os níveis plasmáticos de LDL-colesterol e HDL-colesterol, no grupo hipercolesterolêmico, foram aumentados em 49 e 1,5 vezes, respectivamente, em relação ao grupo normocolesterolêmico. Achados similares foram observados por KUSHWAHA et al. (1978) e TOMIKAWA et al. (1992). Também foram observadas que as relações lipídicas de CT/HDL-c e LDL-c/HDL-c aumentaram 15 e 32 vezes, respectivamente, quando comparadas com as do grupo normocolesterolêmico, o que reflete o aumento de colesterol nas lipoproteínas, causada pela dieta.

A composição da LDL isolada do grupo hipercolesterolêmico, em termos de seu conteúdo de colesterol total (62%), triacilgliceróis (7%), proteínas (20%) e fosfolipídios (10%), apresentou resultados semelhantes com o relatado nos trabalhos de ROTH et al. (1983), NENSETER et al. (1992) e NENSETER et al. (1994).

Assim, a hipercolesterolemia induzida pela dieta provocou um aumento da VLDL-c e da LDL-c na circulação e, conseqüentemente, o número de receptores

hepáticos para estas lipoproteínas foram reduzidos, prolongando seu tempo de residência na circulação (GOLDSTEIN et al. 1979).

A mudança do perfil lipídico nos animais hipercolesterolêmicos que receberam 50 U.I. de vitamina E ocorreu no sexto dia de tratamento. Observou-se redução dos níveis de colesterol total (31%), LDL-c (27%), VLDL-c (44%) e triacilgliceróis (34%) em relação aos do grupo hipercolesterolêmico. Os níveis de HDL-c não sofreram modificações. Estes resultados estão de acordo com o relatado no trabalho de WOJCICKI et al. (1991), onde a administração de 38,5 U.I. de vitamina E reduziu os níveis plasmáticos do colesterol total (24%), triacilgliceróis (24%) e das LDL-c+VLDL-c (37%) em coelhos com hipercolesterolemia induzida pela dieta suplementada com 1,7% de colesterol. No entanto, esta resposta foi alcançada após três meses de tratamento.

Achados similares foram relatados por WILLINGHAM et al. (1993), embora, os animais de experimentação foram tratados por um período de 9 meses. Estes autores administraram uma dieta suplementada com 0,2 % (p/p) de vitamina E a coelhos Watanabe (deficientes do receptor hepático para LDL, e portanto, desenvolvem hipercolesterolemia com dieta normal), encontrando redução do colesterol (19 %), LDL-c (25%), triacilgliceróis plasmáticos (33%) e uma diminuição significativa da área da lesão na aorta (32%).

WILLIAMS et al. (1992) relataram que a suplementação de 0,5% de vitamina E na dieta de coelhos Watanabe reduziu o colesterol (13%) e triacilgliceróis plasmáticos (19%), após 7 dias de tratamento e quando este tratamento foi prolongado durante 12 semanas, os níveis de colesterol total e triacilgliceróis foram reduzidos a 53 e 58%, respectivamente.

Os estudos de WESTROPE et al. (1982) e WILSON et al. (1978) sobre o efeito da vitamina E, em hipercolesterolemia induzida em coelhos, têm demonstrado a diminuição dos níveis de colesterol plasmático e da área da lesão aterosclerótica em animais que consumiram 0,5 ou 1% de vitamina E na dieta.

KEANEY et al. (1994) relataram que a administração de 100 U.I. de vitamina E a coelhos com dieta enriquecida com 1 % de colesterol não alteraram o perfil lipídico. Porém, o relaxamento dependente do endotélio da aorta

abdominal foi preservado, enquanto que a administração de uma dose alta de vitamina E (1.000 U.I.), diminuiu o relaxamento. Sabe-se que, na hipercolesterolemia, o relaxamento dependente do endotélio está comprometido, tendo participação na aterogênese (CHIN et al., 1992).

KLEINVELD et al. (1994) demonstraram que uma dose ideal de vitamina E na dieta está ao redor de 0,025% (p/p). Com esta dose, observaram um intenso efeito antioxidante da vitamina E e uma maior redução da lesão aterosclerótica na aorta de coelhos Watanabe, sem reduzir os níveis de colesterol plasmático.

WISWANATHAM et al. (1979) verificaram que os níveis de colesterol e triacilgliceróis plasmáticos foram diminuídos em coelhos que consumiram dieta com 1% de colesterol e 110 U.I. de vitamina E, quando comparados com aqueles que receberam dieta somente com colesterol. KOMARATAT et al. (1985) observaram diminuição do colesterol total, LDL-c e VLDL-c e um aumento da HDL-c nos coelhos suplementados com 1% de vitamina E. Em nossos resultados observamos uma diminuição dos níveis de colesterol, triacilgliceróis, LDL-c e VLDL-c nos coelhos que receberam 50 U.I. de vitamina E durante 6 dias, embora a dieta suplementada com colesterol foi menor (0.5%). Este efeito rápido da vitamina E não tem sido, ainda, reportados.

QIAO et al. (1993) relataram que a administração de vitamina E durante um mês a cobaias alimentadas com dieta enriquecida com colesterol, reduziu em 12,2% os níveis de colesterol plasmático. Além disso, a área de células espumosas na íntima arterial foram reduzidas. Por outro lado, Morel et al. (1994), Prasad & Kalra (1993) e Mantha et al. (1993) não encontraram influência da vitamina E sobre os níveis do colesterol plasmático em coelhos hipercolesterolêmicos.

Diversos estudos sobre o efeito da vitamina E sobre os níveis lipídicos têm sido também realizados em humanos. Assim, os estudos de HERMANN et al. (1979) e HERMANN (1982) relataram que a ingestão de 600 U.I. de vitamina E por pessoas com baixos níveis de HDL-c produziu uma redistribuição do colesterol, aumentando os níveis da HDL-c, com a diminuição da VLDL-c e dos triacilgliceróis plasmáticos. BARBORIAK et al. (1982) verificaram que a

suplementação da vitamina E a sujeitos normais aumentou as concentrações plasmáticas de HDL-c, particularmente naqueles sujeitos que iniciaram o tratamento com níveis baixos.

Por outro lado, STAMPFER et al. (1983) e JIALAL & GRUNDY (1992) mostraram que a administração de 800 U.I. de vitamina E a sujeitos normais não alterou os lipídios plasmáticos. Da mesma forma, JIALAL et al. (1995) relataram que a vitamina E, em doses de 200 a 1.200 U.I, não alterou as concentrações plasmáticas de lipídios em homens normais.

Neste estudo foi observada uma mudança da distribuição do colesterol plasmático no grupo de coelhos que recebeu vitamina E, durante 6 dias, através da diminuição do percentual da VLDL-c em 24,6% e do aumento do percentual da HDL-c em 5,8%. No entanto, o percentual da LDL-c não mudou em relação ao grupo hipercolesterolêmico. Estes resultados estão de acordo com o relatado no estudo de PAUL et al. (1989), onde a suplementação de vitamina E (150 mg) provocou mudança da distribuição do colesterol em ratos alimentados com dieta enriquecida com colesterol.

As modificações na composição da LDL, nos coelhos que receberam vitamina E ocorreram no sexto dia de tratamento, quando houve a diminuição do conteúdo de colesterol e de fosfolipídios na LDL em relação aos coelhos hipercolesterolêmicos. Observou-se, também, que as relações lipídicas CT/HDL-c e LDL-c/HDL-c foram diminuídas por causa deste tratamento, indicando uma mudança favorável e, conseqüentemente, diminuição do risco da doença aterosclerótica.

O efeito hipocolesterolêmico da vitamina E pode ser atribuído a vários mecanismos de ação, como por exemplo, o aumento do catabolismo do colesterol, via formação de ácidos biliares, sustentado pelos estudos de KOMARATAT et al. (1985). Estes autores relataram que a atividade da colesterol 7 α -hidroxilase, enzima hepática limitante da velocidade de conversão do colesterol a ácido biliar, ficou aumentada em coelhos hipercolesterolêmicos que receberam suplementação de vitamina E. Por outro lado, tem sido

observado que a deficiência da vitamina E, em coelhos, produz um aumento dos níveis de colesterol plasmático, principalmente na LDL, e diminuição da atividade da 7- α -hidroxilase e dos níveis hepáticos do citocromo P450, envolvido na hidroxilação do colesterol na conversão para ácidos biliares (CHUPUKCHAROEN et al., 1985).

Outra possível explicação do efeito hipocolesterolêmico da vitamina E pode estar sustentada na mudança da composição da LDL. BERGLUND et al. (1989) relataram que a mudança da composição da LDL, diminuindo o colesterol livre e aumentando os triacilgliceróis, afeta a interação da partícula com seu receptor hepático, aumentando a velocidade de captura.

A similaridade de estrutura dos tocoferóis e tocotrienóis, ambos membros da família da vitamina E, leva a pensar que o efeito da vitamina E sobre a diminuição do colesterol plasmático, pode ser, também, atribuído à inibição da síntese hepática do colesterol. Os estudos de QURESHI et al. (1986) demonstraram que os tocotrienóis, foram capazes de inibir a atividade da HMG-CoA redutase em cultura de hepatócitos.

Estudos em humanos normo e hipercolesterolêmicos e em animais de experimentação, principalmente coelhos, mostraram que a suplementação com vitamina E tem resultados conflitantes sobre a habilidade deste composto de mudar o perfil lipídico e de inibir a formação da lesão aterosclerótica, ou seja, sobre a sua eficácia hipocolesterolêmica. Parece que estas discrepâncias estão aparentemente relacionadas com a dose de vitamina E, o tempo de tratamento, as condições de experimentação, o modelo experimental usado, a dieta recebida e os métodos de medida das lipoproteínas.

O uso de drogas para reduzir os níveis de colesterol plasmático apresentam diferentes mecanismos de ação sobre o metabolismo das lipoproteínas plasmáticas. Assim, as drogas inibidoras 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 dos níveis de colesterol e LDL-colesterol.

Neste estudo, as doses utilizadas de pravastatina e sinvastatina provêm uma ampla segurança, se consideramos a dose mínima necessária para produzir toxicidade em uma variedade de tecidos (GERMERSHAUEN et al., 1989). As doses de 15 e 10 mg de pravastatina e sinvastatina, respectivamente, são equivalentes na redução similar do colesterol plasmático (RIBEIRO JORGE et al., 1994). Estes autores verificaram que a administração de pravastatina e sinvastatina durante 15 dias diminuíram os níveis do colesterol plasmático e da LDL-colesterol em 58 e 64%, respectivamente.

No presente trabalho, verificou-se que a administração de pravastatina, durante 6 dias, reduziu os níveis de colesterol total (33%), LDL-c (30%), VLDL-c (44%) e triacilgliceróis plasmáticos (43%) em relação ao grupo hipercolesterolêmico. Entretanto, os níveis da HDL-c foram aumentados sem alcançar significância estatística. O efeito da pravastatina foi observado no quarto dia de tratamento, através da diminuição significativa do colesterol total, da VLDL-c e das relações lipídicas CT/HDL-c e LDL-c/HDL-c

Resultados similares foram obtidos por FUJIOKA et al. (1995) que administraram 100 mg de pravastatina a coelhos durante 14 dias. Estes autores observaram uma diminuição do colesterol total (40%), LDL-c (57%), VLDL-c (72%), triacilgliceróis plasmáticos (22%) e um aumento da atividade do receptor hepático da LDL (14%) e da colesterol 7 α -hidroxilase (17%). ROACH et al. (1993) relataram que a dose de 44 mg de pravastatina administrada a coelhos com hipercolesterolemia induzida por dieta, durante 3 semanas, reduziu o colesterol plasmático (55%), colesterol hepático (80%) e aumentou a atividade do receptor hepático da LDL (120%).

AMOROSA et al. (1992) observaram que a administração de uma dose única de pravastatina de 25 mg/kg de peso a coelhos Watanabe diminuiu a síntese do colesterol hepático, sendo que o efeito máximo foi alcançado a 48 horas após administração.

Diversos estudos (FRANCESCHINI et al., 1994; HUNNINGHAKE et al., 1990 e REIHNÉR et al., 1990) sobre a administração da pravastatina a sujeitos

com níveis altos de colesterol e valores normais de triacilgliceróis têm demonstrado uma diminuição do colesterol plasmático (21 - 57%), LDL-c (32%), triacilgliceróis (45%) e um aumento da HDL-c (6%) e a atividade do receptor hepático da LDL (180%). Não obstante, FRANCESCHINI et al. (1994) relataram que a pravastatina não provoca a mudança da composição da LDL, enquanto que HUNNIGHAKE et al. (1990) observaram uma mudança na composição, sendo que ambos os autores administraram 40 mg de pravastatina durante 8 semanas a sujeitos com hipercolesterolemia.

Neste estudo, a administração de sinvastatina por seis dias provocou uma redução de 30, 20, 47 e 36% dos níveis de colesterol total, LDL-c, VLDL-c e triacilgliceróis, respectivamente. Não foi observada mudança nos níveis de HDL-c.

O efeito inicial da sinvastatina foi observado no quarto dia de tratamento com a diminuição de colesterol total, VLDL-c e triacilgliceróis plasmáticos. As mudanças das relações lipídicas CT/HDL-c e LDL-c/HDL-c ocorreram no sexto dia de tratamento, enquanto que a composição da LDL não foi alterada.

THIERY et al. (1991) observaram que as alterações do perfil lipídico e a extensão da aterogênese, em coelhos alimentados com dieta rica em colesterol, foram normalizadas quando administrou-se sinvastatina, pravastatina ou lovastatina. Estes autores encontraram diminuição do colesterol total, principalmente na fração da VLDL-c.

A administração de sinvastatina em doses de 5-10 mg/dia a sujeitos hipercolesterolêmicos tem demonstrado redução do colesterol total (17-22%), VLDL-c (34%), LDL-c (15-39%), triacilgliceróis (15%) e aumento da HDL em torno de 8 a 15% (NAKASHIMA et al., 1996; BREDIE et al., 1995; HOMMA et al., 1995; GAW et al., 1993). A mudança da composição da LDL pela administração de sinvastatina tem sido relatada por HOMMA et al. (1995). Não obstante, os estudos de NAKANDAKARE et al. (1990) relataram que a sinvastatina não interfere na composição nem na relação lipídio/proteína da LDL.

O estudo em grupo do "THE SCANDINAVIAN SIMVASTATIN SURVIVAL STUDY GROUP" (1994), que atingiu diversas populações europeias, sobre a sobrevivência de pacientes com doença coronária, revelou que a sinvastatina diminuiu 25% do colesterol plasmático e aumentou 8 % os níveis de HDL-c.

No presente trabalho, foi observado que o efeito das drogas, ao longo do tempo, apresentou uma diferença inicial, sendo que a pravastatina teve um efeito mais rápido na diminuição dos níveis da LDL-c e das relações lipídicas CT/HDL-c e LDL-c/HDL-c, quando comparada com a sinvastatina. Esta resposta imediata da pravastatina diferente à resposta inicial da sinvastatina é explicada pelo fato de sinvastatina ser uma prodroga, na forma de lactona hidrofóbica, a qual precisa ser hidrolisada enzimaticamente pelo organismo para ser convertida para forma ativa.

A sinvastatina e a pravastatina produzem uma rápida diminuição da VLDL-c e da LDL-c, em decorrência do aumento de receptores hepáticos apo (B/E) que reconhecem a apoproteína E e, portanto, promovem a rápida remoção da VLDL e de seu produto direto, a LDL. Esta captura rápida da VLDL, provavelmente é consequência do maior conteúdo de apolipoproteína E na partícula, que na hipercolesterolemia a síntese de apo E é maior. Assim, a VLDL tem maior afinidade pelos receptores hepáticos, específicos. De outro lado, a inibição da síntese hepática do colesterol promove a remoção de maior partículas de LDL.

A administração da pravastatina ou sinvastatina, associada à vitamina E em coelhos hipercolesterolêmicos, apresentou uma mudança mais favorável e rápida do perfil lipídico do que a administração das drogas isoladamente. Isto leva a pensar que as drogas teriam melhores condições de exercer seu efeito hipocolesterolêmico na presença da vitamina E ou que esta última potencializa o efeito das drogas. O tratamento de vitamina E + pravastatina mostrou diminuição dos níveis da LDL-colesterol e VLDL-colesterol no segundo dia de tratamento, enquanto que os níveis de colesterol total, triacilgliceróis e as

relações lipídicas de CT/HDL-c e LDL-c/HDL-c começaram a diminuir no quarto dia de tratamento.

Os tratamentos com vitamina E + sinvastatina mostraram repostas semelhantes, com o decorrer do tempo, com a exceção de que os níveis da LDL-c foram diminuídos no quarto dia de tratamento e as relações lipídicas CT/HDL-c e LDL-c/HDL-c diminuíram no sexto dia de tratamento. A diminuição dos níveis da HDL-c e a alteração da composição foram significativas no sexto dia para ambas associações de tratamento. Observou-se diferença significativa dos níveis da VLDL-c no sexto dia de tratamento, sendo que o grupo PE-6 apresentou uma diminuição mais acentuada em relação ao grupo SE-6.

Em todos os tratamentos, observou-se que o efeito rápido atinge, primeiramente, os níveis de VLDL-c e, em seguida, os níveis de LDL-c e o colesterol total.

As mudanças nas percentagens das lipoproteínas foram evidentes no sexto dia de tratamento, quando a percentagem da HDL-colesterol apresentou-se aumentada em contraposição à diminuição da VLDL-c e LDL-c, o que levou a sugerir que o transporte reverso do colesterol, através da HDL, começou a reiniciar suas funções neste período de tempo.

Desde que o transporte de colesterol a tecidos extrahepáticos é primariamente realizado pela LDL, enquanto que HDL transporta o colesterol em sentido reverso para sua ulterior excreção, as relações lipídicas são importantes.

Os índices de risco de padecimento da doença cardiocoronária, CT/HDL-c e LDL-c /HDL-c foram diminuídos nos grupos que receberam os tratamentos durante seis dias, resultado que é consequência da diminuição do colesterol total, LDL-c e o aumento discreto da HDL-c. Assim, os menores valores destas relações correspondem ao menor risco da doença, sendo que os grupos PE-6 e SE-6 apresentaram os menores valores.

Cabe ressaltar que as drogas pravastatina e sinvastatina alcançam um pico de incorporação no fígado duas horas após sua administração

(GERMERSHAUN et al., 1989), enquanto que a vitamina E alcança um pico de incorporação na VLDL após 4 horas e na LDL após 24 horas de sua administração (TRABER & KAYDEN, 1989).

A associação de vitamina E com drogas redutoras dos níveis do colesterol plasmáticos não tem sido relatada na literatura, com exceção do trabalho de ANDERSON et al. (1995), que associaram lovastatina, outra droga inibidora da HMG-CoA redutase, com probucol, agente antioxidante, para o tratamento de pacientes com doença coronária. Estes autores encontraram melhores resultados com a combinação de tratamento na diminuição da LDL-c, na resistência a sua oxidação e no restabelecimento da função endotelial, do que o uso isolado de drogas redutoras de colesterol, indicando que a combinação de agentes antioxidantes com redutores de colesterol é uma boa estratégia para prevenir a aterosclerose.

GOLDSTEIN et al. (1979) foram os primeiros a propor que a LDL modificada quimicamente de modo artificial (por exemplo, a acetilação), aumenta sua captação por macrófagos e provoca maior acúmulo de colesterol em experimentos *in vitro*. Nos sistemas biológicos, a LDL é modificada oxidativamente e ocorre em diversas desordens metabólicas, como na hipercolesterolemia, na hiperlipidemia combinada (STEINBERG et al., 1989) e na diabetes mellitus (DEJAGER et al., 1993). A LDL oxidada tem a capacidade de interagir com receptores "scavenger" das células fagocitárias, os quais não são regulados pelo conteúdo de colesterol intracelular, resultando na formação das células espumosas que são características da lesão aterosclerótica inicial, desencadeando várias alterações do metabolismo das células da parede arterial.

A oxidação da LDL acontece quando é submetida ao "stress", ou seja, quando existe o predomínio de espécies oxidantes (radicais livres) que reagem com os lipídios da LDL (HALLIWELL, 1995; GRUNDY, 1993; STEINBERG et al., 1989; PARTHASARATHY et al., 1986). A lesão provocada pelo "stress" oxidativo pode ser descrita como consequência do potencial antioxidante insuficiente do

organismo e/ou da exacerbação de processos que induzam a produção de espécies oxidantes.

Estudos epidemiológicos mostram a relação inversa entre antioxidantes plasmáticos tais como tocoferol, caroteno e ascorbato e a incidência de doenças cardiovasculares (RIMM et al., 1993; RIEMERSMA et al., 1991; GEY et al., 1991). A necessidade desses antioxidantes é, provavelmente, aumentada quando a quantidade de lipídios plasmáticos é alta, como acontece na hipercolesterolemia. O defeito no catabolismo da LDL e de outras lipoproteínas que ocorre nas hipercolesterolemia resulta no aumento da meia-vida dessas partículas no plasma, que apresentam maior taxa de infiltração para o interstício arterial, aumentando, assim, a probabilidade de interagirem com espécies oxidantes geradas pelas células.

No presente trabalho, foi demonstrado que o alfa-tocoferol (após sua incorporação *in vivo*) aumenta a resistência da LDL à oxidação. O alfa-tocoferol reduziu a peroxidação da LDL nativa e da LDL submetida ao estresse oxidativo *in vitro*, diminuindo, assim, sua susceptibilidade para a oxidação. O alfa-tocoferol é um antioxidante altamente específico, rompe a cadeia de reações causada pelas espécies oxidativas, evitando a peroxidação de lipídios nas membranas celulares, e protegendo os ácidos graxos polinsaturados dos ataques dos radicais livres (HALLIWELL & CHIRICO, 1993). A suplementação oral de alfa-tocoferol garante sua distribuição homogênea na partícula de LDL e sua proteção contra a oxidação.

TRABER & KAYDEN (1989) relataram que 30% do alfa-tocoferol administrado a sujeitos normais, incorpora-se no plasma após 24 horas da sua ingestão. Estes autores demonstraram que o conteúdo de alfa-tocoferol na fração dos quilomícrons e VLDL, alcançam um pico 4 horas após a administração oral, enquanto que as frações de LDL e HDL alcançam um pico em 24 horas.

Em outro estudo, TRABER et al., 1990, observaram que o alfa-tocoferol nos quilomícrons plasmáticos apresentaram concentrações máximas entre 6 e 12 horas, após a ingestão oral de alfa-tocoferol por sujeitos normais. Este tempo é consistente com o tempo de residência da apo B-48 dos quilomícrons, que é

aproximadamente 5 horas. No plasma os quilomícrons são catabolisados pela lipoproteína lipase, enzima localizada na superfície endotelial. Os quilomícrons remanescentes são removidos pelo fígado e seus lipídios são usados para a formação da VLDL, processo que é acompanhado pela incorporação específica de alfa-tocoferol (KAYDEN & TRABER, 1993). Na circulação a VLDL é convertida em LDL, que fica enriquecida com alfa-tocoferol. A hidrólise da VLDL permite, também, a transferência de alfa-tocoferol para a HDL e desta maneira o alfa-tocoferol está em constante fluxo entre as lipoproteínas.

KAYDEN & TRABER, 1993, observaram que o plasma de indivíduos normais, submetidos a uma dose de 400 U.I. de α -tocoferil acetato, apresentou concentrações máximas de alfa-tocoferol nos quilomícrons, após 4 horas da ingestão, enquanto que as frações de VLDL e LDL apresentaram uma concentração máxima, após 24 horas de ingestão.

Os efeitos do alfa-tocoferol, em períodos de curto tempo, o "*time course*", não têm sido descritos na literatura, não obstante, os estudos acima descritos indicam que a incorporação de alfa-tocoferol nas partículas de LDL ocorre após 24 horas da ingestão oral. No presente estudo, observou-se um efeito rápido da vitamina E quando foi administrado 50 U.I. de alfa-tocoferol durante 2 dias. Este tempo foi suficiente para sua incorporação nas lipoproteínas, especialmente na LDL, cuja concentração estava aumentada na hipercolesterolemia experimental. Estes achados poderiam ser atribuídos à ação da vitamina E como seqüestrante de radicais livres e parecem ser interpretados como um indicador de que a dose usada de vitamina E é suficiente para inibir 50% da oxidação da LDL nativa e 65% da LDL induzida à oxidação. A suplementação da vitamina E, por seis dias, resultou na inibição de 65 e 70% para LDL nativa e LDL oxidada respectivamente.

KLEINVELD et al. (1994) relataram que uma dose baixa de alfa-tocoferol de 10 mg/kg de peso corporal fornecida a coelhos Watanabe, foi suficiente para aumentar os níveis plasmáticos em 4 vezes, após a ingestão diária, durante um mês. A maior quantidade de alfa-tocoferol tornou-se saturável. A LDL isolada

mostrou redução da velocidade máxima da oxidação *in vitro* (60%), quantificada através da formação de conjugados dienos.

PRASAD & KARLRA (1993) relataram que a administração de uma dose de vitamina E, equivalente a 14 U.I. de alfa-tocoferol reduziu os níveis de MDA plasmático (43%) de coelhos alimentados com dieta enriquecida de colesterol, no primeiro mês de tratamento. WOJCICKI et al. (1991) verificaram, também, uma diminuição dos níveis de MDA plasmático em coelhos hipercolesterolêmicos, após receberem 30 U.I. de alfa-tocoferol, durante 3 meses. WILLIAMS et al. (1992) administraram 500 U.I. de alfa-tocoferol a coelhos Watanabe, durante um mês. Estes autores observaram uma redução de 49% na oxidação *in vitro* da LDL.

Estudos em humanos têm relatado que doses de 1.200 U.I. de alfa-tocoferol, durante 7 dias, reduziram 29% da oxidação *in vitro* da LDL isolada de pacientes hipercolesterolêmicos, após o tratamento (DUJOVNE et al., 1994). PRINCEN et al. (1992) observaram um aumento da resistência à oxidação da LDL (41%) determinada pela *fase lag* (o tempo que precede à oxidação *in vitro* da LDL), em sujeitos normais que receberam 1000 U.I. de alfa-tocoferol durante 7 dias.

As altas concentrações da LDL e o maior tempo de permanência na circulação, no caso da hipercolesterolemia, permitem a maior passagem das LDL para as células endoteliais, onde podem sofrer oxidação pelos radicais livres, que se formam normalmente nas células, como consequência das reações metabólicas, como por exemplo, a degradação do ácido nítrico (CHIN et al., 1992). Um grande número de radicais livres (hidroxilo, peróxido, superóxido) estão envolvidos no processo da modificação da LDL. Não obstante, a oxidação da LDL também depende das suas características físicas e composição química (CROFT et al., 1995).

O aumento da resistência à oxidação da LDL tem implicações importantes. A oxidação da LDL ocorre, principalmente, no compartimento

extravascular e em microambientes protegidos dos antioxidantes naturais presentes no plasma. Sendo a LDL-oxidada citotóxica, causa a perda de células endoteliais que recobrem as estrias gordurosas e, a partir daí, desencadeia-se a agregação plaquetária, liberação de fatores de crescimento e proliferação celular, além de promover o recrutamento e retenção de macrófagos na íntima arterial. Portanto, a suplementação de alfa-tocoferol limita a oxidação da LDL e os eventos produzidos por esta partícula.

O efeito protetor da vitamina E contra a aterosclerose pode ser decorrente, principalmente, de sua atividade antioxidante e, parcialmente, das mudanças sobre as atividades das enzimas antioxidantes e sua ação sobre a redução da agregação, adesão de plaquetas, inibição da proliferação celular, propriedades que poderiam estar envolvidas no seu efeito antiaterogênico (MANTHA et al., 1993; BURTON & INGOLD, 1989).

Quando se avaliou a atividade antioxidante de pravastatina e sinvastatina, foi observado que a administração de pravastatina reduziu a oxidação *in vitro* da LDL no quarto dia de tratamento, enquanto que a atividade antioxidante de sinvastatina foi observada após 6 dias de tratamento. Neste período de tempo, a pravastatina e a sinvastatina reduziram os níveis de MDA 19 e 18%, respectivamente, valores significativamente menores que quando estas drogas foram associadas com vitamina E. Ambas as drogas não apresentaram atividade antioxidante na LDL nativa durante este período de tempo.

BREDIE et al. (1995) relataram que a sinvastatina foi capaz de reduzir a velocidade de oxidação da LDL isolada após o tratamento com 20 mg durante 20 semanas. AVIRAM et al. (1992) observaram que LDL oxidada na presença de lovastatina (outra droga inibidora da HMG-CoA redutase) reduziu a formação de MDA (24%). GIROUX et al. (1993) verificaram que macrófagos, em cultura tratados com sinvastatina, reduziram a formação de íons superóxidos e a oxidação da LDL, sugerindo que a sinvastatina poderia inibir a atividade da NADPH oxidase na produção dos íons superóxidos.

HOFFMAN et al. (1992) demonstraram que a pravastatina diminuiu o conteúdo de MDA (22%) na oxidação da LDL isolada de pacientes que receberam 20 mg durante 6 semanas.

A atividade antioxidante da pravastatina e da sinvastatina encontrada nos experimentos realizados, provavelmente não está relacionada a seu efeito redutor dos níveis de colesterol e de suas frações, não estando claro o seu mecanismo. Pode-se supor que a mudança da composição da LDL altere suas características, fazendo com que a partícula seja menos oxidada. A redução do conteúdo de fosfolipídios na LDL e, portanto, a menor exposição de ácidos graxos na superfície diminuem a susceptibilidade para a oxidação. Outra possível explicação para a redução da oxidação da LDL é a de que as populações da LDL foram diferentes após tratamento. A remoção destas partículas por estas drogas induzem o enriquecimento de novas formas de lipoproteínas, como resultado à resposta hepática. Por outro lado, estas drogas podem atuar como seqüestrantes dos radicais livres, através de seus hidrogênios ativos na estrutura molecular.

Quando se avaliou o efeito da vitamina E associada à pravastatina ou sinvastatina, foi observada atividade antioxidante a partir do segundo dia de tratamento. As concentrações de MDA diminuíram a 42 e 51% para a LDL nativa e 60 e 53% para LDL oxidada nos grupos com vitamina E + pravastatina e vitamina E + sinvastatina, respectivamente, após o tratamento de 6 dias.

Estes resultados indicam que o efeito antioxidante da vitamina E foi maior do que a associação com as drogas hipocolesterolêmicas, o que poderia ser explicado por uma interação inicial entre as drogas e a vitamina E, possivelmente implicada nos mecanismos de óxido-redução.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a vitamina E administrada isoladamente ou associada a drogas inibidoras da HMG-CoA redutase, melhora o perfil lipídico, reduzem a peroxidação das lipoproteínas plasmáticas (LDL), representando assim uma nova estratégia na prevenção da aterosclerose.

6 CONCLUSÕES

Através da hipercolesterolemia experimental induzida em coelhos pôde-se inferir que:

- 1) A vitamina E tem um potente e rápido efeito protetor que reduziu a oxidação da LDL nativa e da LDL submetida ao estresse oxidativo *in vitro*, diminuindo a formação do dialdeído malônico.
- 2) A vitamina E associada à pravastatina ou sinvastatina alterou rapidamente o perfil lipídico da aterogênese, diminuindo os níveis plasmáticos de colesterol total, LDL-colesterol, VLDL-colesterol, triacilgliceróis, e aumentou a HDL-colesterol.
- 3) A suplementação com vitamina E provocou diminuição do colesterol total, LDL-colesterol, VLDL-colesterol e triacilgliceróis plasmáticos, com tendência a normalizar o perfil lipídico na hipercolesterolemia.
- 4) A pravastatina, a sinvastatina isoladas ou quando associadas com vitamina E modificaram a composição da LDL, alterando sua relação lipídio/ proteína.
- 5) A pravastatina e a sinvastatina reduzem a susceptibilidade da LDL a sofrer peroxidação lipídica *in vitro*, por mecanismos independentes de seu efeito hipocolesterolêmico.
- 6) As drogas hipocolesterolêmicas associadas à vitamina E demonstraram um efeito mais rápido que quando administradas isoladamente, indicando um efeito sinérgico, que pode representar uma nova estratégia para reduzir ou retardar o processo aterosclerótico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AMOROSA, L.F.; ROZOVSKI, S.J; ANANTHAKRISHNAN, R.; COLY, E.; ALHINAI, A.; MARTUCCI, C.; SCHNEIDER, S.H.; SHIMAMURA, T.; KHACHADURIAN, A.K.. Effects of pravastatin on cholesterol metabolism in watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Japan Heart Journal*, Tokyo, v. 33, n.4, p. 451-463, July 1992.
- 2 ANDERSON, T.; MEREDITH, I.A.; YEUNG, A.C.; FREI, B.; SELWYN, A.P.;GANZ, P. The effects of cholesterol lowering and antioxidant therapy on endothelium dependent coronary vasomotion. *The New England Journal of Medicine*, Boston, v.332, n. 8, p. 488-493, Feb. 1995.
- 3 A. O. A. C. - *Official Methods of Analysis*. Association of Official Agricultural Chemists, 13 ed. Washington, D.C., 1980
- 4 AVIRAM, M. Modified forms of low density lipoproteins and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, Shannon, v. 98, n.1, p.1-9, Jan. 1993.
- 5 AVIRAM, M; DANKNER, G.; COGAN, V.; HOCHGRAF, E.; BROOK, J.G. Lovastatin inhibits low density lipoprotein oxidation and alters its fluidity and uptake by macrophage: in vivo and in vitro studies. *Metabolism Clinical and Experimental*, Philadelphia, v. 41, n. 3, p. 229-235, Mar. 1992.
- 6 AVOGARRO, P.; BON, G.B.; GAZZOLATO, G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis*, Dallas, v. 8, n. 1, p.79-87, Jan./Feb. 1988.
- 7 BARBORIAK, J.; SHETTY, K.; EL-GHATIT, A.; KALBFLEISCH, J. Plasma High-density Lipoprotein cholesterol and vitamin E supplements. *Annals of the New York Academy of Science*, New York, v. 393, p. 174, 1982.
- 8 BAST, A.; HAENEN, G.; DOLLMAN, C. Oxidants and antioxidants: State of the art. *The American Journal of Medicine*, Denver, v. 91, (suppl 3c), p.3c - 2s - 3c-13s, Sept. 1991.
- 9 BERGLUND, L.; SHARKEY, M.; ELAM, R. ; WITZTUM, J. Effects of lovastatin therapy on guinea pig low density lipoprotein composition and

- metabolism. *Journal of Lipid Research*, Bethesda, v. 30, n. 10, p.1591-1600, Oct. 1989.
- 10 BREDIE, S.; DE-BRUIN, T.; DEMACKER, P.; KASLETEIN, J.; STALENHOF, A. Comparison of gemfibrozil versus simvastatin in familial combined Hyperlipidemia and effects on apolipoprotein B-containing lipoproteins, LDL subfraction, profile and low-density lipoprotein oxidizability. *The American Journal of Cardiology*, New York, v.75, n. 15, p.348-353, Feb. 1995.
 - 11 BREWER, H.B.; GREGG, R.E.; HOEG, J.M. ; FOJO, S. Apolipoproteins and lipoproteins in human plasma. An overview. *Clinical Chemistry*, Washington, v.34, n. 8B, p.B4-B8, Aug. 1988.
 - 12 BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, Washington, v.232, N. 4746, P. 34-47, Apr. 1986.
 - 13 BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Lipoproteins metabolism in the macrophage implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry*, Palo Alto, v.52, p. 223-261, 1983.
 - 14 BROWN, M.S.; KOVANEN, P.T.; GOLDSTEIN, J.L. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science*, Washington, v. 212, n. 4495, p.628-635, May 1981.
 - 15 BURTON, G. ; INGOLD, K. Vitamin E as an in vitro in vivo antioxidant. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v.570, p.7-21, 1989.
 - 16 BYERS, T. Vitamin E supplements and coronary heart disease. *Nutrition Review*, Boston, v. 51, n.11, p. 333-345, Nov. 1993.
 - 17 CARLSON, L.A.; BÖTTINGER, L.E. Risk factors for ischemic heart disease in men and women. *Acta medica Scandinavica*, Stockholm, v. 218, n. 2, p. 207-211, Aug. 1985.
 - 18 CHIN, J.H.; AZHAR, S. e HOFFMAN, B.B. Inactivation of endothelium dependent arterial relaxing factor by oxidized lipoproteins. *Journal of Clinical Investigation*, San Diego, v.89, n. 1, p.10, Jan. 1992.
 - 19 CHOW, C.K. Vitamin E and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, New York, v. 11, n. 2, p. 215-232, Feb. 1991.

- 20 CHUPUKCHAROEN, N.; KOMARATAT, P. ; WILAIRAT, P. Effects of vitamin E deficiency on the distribution of cholesterol 7 α -hydroxylase in rabbit liver. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 115, n.4, p.468-472, Apr. 1985.
- 21 COBBE, S. ; SHEPHERD, J. Cholesterol reduction in the prevention of coronary heart disease: Therapeutic rationale and guidelines. *British Heart Journal*, London, v. 69, n. 1. p. s63-s69, Jan. 1993.
- 22 CROFT, K.; WILLIAMS, P.; DIMMIT, S.; ABU-AMSHA, R. ; BEILIN, L. Oxidation of low density lipoproteins: effect of antioxidant content, fatty acid composition and intrinsic phospholipase activity on susceptibility to metal ion induced oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1254, n. 2, p. 250-256, Feb. 1995.
- 23 DAVIDSON, M. Implications for the present and direction for the future. *The American Journal of Cardiology*, New York, , v. 71, n. 6, p. 32b-36b, Feb. 1993.
- 24 DAVIES, M.J. ; WOOLF, N. Atherosclerosis: What is it and why does it occur?. *The British Heart Journal*, London, v.69, n.1, supplement, p. S-3 - S-11, Jan. 1993
- 25 DE GRAAF, H. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subject. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, Dallas, v.11, n. 2, p. 298-306, Mar./Apr. 1991.
- 26 DEJAGER, S.; BRUCKERT, E.; CHAPMAN, M.J. Dense low density subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidemia. *Journal of Lipid Research*, Bethesda, v.34, n. 2, p. 295-308, Feb. 1993.
- 27 DIEBER-ROTHENEDER, M.; PUHL, H.; WALG, G.; STRIEGL, G. e ESTERBAUER, H. Effect of oral supplementation with D-alpha tocopherol of the vitamin E content of human low density lipoprotein and resistance to oxidation. *Journal of Lipid Research*, Bethesda, v.32, n.8, p. 1325-1332, Aug. 1991.

- 28 DIPLOCK, A. Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda. v. 53, n.1,(suppl), Jan. 1991.
- 29 DRISCOLLI, D.M.; GETZ, G.S. Extrahepatic synthesis of lipoprotein E. *Journal of Lipid Research*, Bethesda, v. 25, n. 12, p. 1368-1379, Dec. 1984.
- 30 DUELL, P.B. Prevention of atherosclerosis with dietary antioxidants: fact or fiction. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 126, n. 4S, p.1067S-1071S, Apr. 1996.
- 31 DUJOVNE, C. ; HARRIS, W.; GERROND, L.; FAN, J. ; MUZIO, F. Comparison of effects of probucol versus vitamin E on ex vivo oxidation susceptibility of lipoprotein in hyperlipoproteinemia. *The American Journal of Cardiology*, New York, v. 74, n. 1, p.34-42, July 1994.
- 32 EISENBERG, S. GAVISH, D. OSCHRY, Y., FAINARU, M.; DECKELBAUM, R.J. Abnormalities in very low, low and high density lipoproteins in hypertriglyceridemia. *Journal of Clinical Investigation*, San Diego, v.74, n. 2, p.470-482, Aug. 1984.
- 33 ESTERBAUER H; PUHL, DEEBER-ROTHENEDER, M; WALG G ; RABL, H. Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. *Annals of Medicine* , Helsinke, v. 23, n. 5, p. 573-581, Set. 1991.
- 34 ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxixity of lipid oxidation products. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.57, n. 5., p. 779S-785S, May 1993.
- 35 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, v. 28, n.5, p.495-509, May. 1987.
- 36 ESTERBAUER, H.; STRIEGL, G.; PUHL, H.; OBERREITHER, S.; ROTHENEDER, M.; EL-SAADANI, M. ; JURGENS, G. The role of vitamin E and carotenoids in preventing the oxidation of low density lipoprotein. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v. 570, p.254-267, 1989.

- 37 FARUQI, R. ; DiCORLETO, P. Mechanisms of monocyte recruitment and accumulation. *British Heart Journal*, London, v. 69, n.1, (suppl), p.S19-S29, Jan. 1993.
- 38 FRANCESCHINI, G.; CASSINATTI, M; VECCHIO, G.; GIANFRANCESCHI, G.; PAZZUCIONA, F.; MIRAKANI,T.; SERTORI, M. D'ACQUARICA, A ; SERTORI, C. Pravastatin effectively lowers LDL cholesterol in familial combined hyperlipidemia without changing LDL subclass pattern. *Arteriosclerosis and Trombosis*, Dallas, v.14, n.10, p. 1569-1575, Oct. 1994.
- 39 FREI, B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low density lipoprotein against oxidative damage. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.54, n.6, (suppl), p. 1113S-1118S, Dec. 1991.
- 40 FREI, B. Cardiovascular disease and nutrient antioxidants: Role of low density lipoprotein oxidation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v. 35, n. 1;2, p. 83-98, Mar. 1995.
- 41 FREI,B. ; GAZIANO, T.M. Content of antioxidants preformed lipid hydroperoxides and cholesterol as predictors of the susceptibility of human LDL to metal ion-dependent and independent oxidation. *Journal of Lipid Research*, Bethesda, v.34, n. 12, p.2135-2145, Dec. 1993.
- 42 FUJIOKA, T.; NARA, F.; TSUJITA, Y.; FUKUSHIGE, J.; FUKAMI, M. ; FURODA, M. The mechanism of lack of hypercholesterolemic effects of pravastatin sodium, a 3 hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor in rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1254, n. 1, p.7-12, Jan. 1995.
- 43 GAW, A.; PACKARD, C.; MURRAY, E.; LINDSAY, G.; GRIFFIN, B.; CASLAKE, M. WALLANCE, B.; LORIMER, R. ; SHEPHERD, J. Effects of simvastatin on Apo B metabolism and LDL subfraction distribution. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, Dallas, v.13, n. 2, p.170-189, Feb. 1993.
- 44 GERMERSHAUEN, J.; HUNT,V.; BOSTEDOR, R. BAILEY, P.; KARKAS, J.; ALBERTS, A. Tissue selectivity of cholesterol-lowering agents lovastatin, simvastatin and pravastatin in rats in vivo. *Biochemical and Biophysycal*

- Research Communications*, New York, v.158, n. 36, p. 667-675, Feb. 1989.
- 45 GEY , K.F. ; PUSKA, P. Plasma vitamins E and A inversely correlated to mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Annals of the New York Academy Science*, New York, v. 570, p. 268-282, 1989.
- 46 GEY, K.F.; PUSKA, P.; JORDAN, P. ; MORER, O. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.53, n. 1, p. 326A-324S, Jan. 1991.
- 47 GIROUX, L.M.; DAVIGNON, J. ; NARUSZEWICZ. Simvastatin inhibits the oxidation of low density lipoproteins by activated human monocytes-derived macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1165, n.3, p.335-338, Jan. 1993.
- 48 GOLDSTEIN, J.; HO, Y.; BASU, K. ; BROWN, M. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceeding National academy Science USA*, Washington, v.76, n.1, pp.333-337, Jan. 1979.
- 49 GORDON, J.I.; SMITH, D.P.; ANDY, R.; ALPERS, D.H.; SCHONFELD, G.; STRAUSS, A.W. The primary translation product of rat intestinal apolipoprotein A-I mRNA is an unusual pre-protein. *The Journal Biological of Chemistry*, Baltimore, v. 257, n. 2, p.971-978, Jan. 1982.
- 50 GOTTO, A. New Comprehensive biochemistry. Plasma lipoproteins. Amsterdam, Elsevier Science Publishing Company, 1987, 405 p., ISBN-0-444-80855-8.
- 51 GOTTO, A. ; POWNALL, H.; HAVEL, R. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods in Enzymology*, New York. v.128, p.3-41. 1986.
- 52 GREENSPAN, P.; RYU, B.H.; 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, v. 1257. n. 3, p.257-264, July 1995.
- 53 GRUNDY, S. HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. *The New England Journal of Medicine*, London, v.319, n.1, p.24-33, July 1988.
 - 54 GRUNDY, S. M. ; DENKE, A.M. Dietary influences on serum lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, Bethesda, v.31, n. 7, p. 1149-1172, July 1990.
 - 55 GRUNDY, S.M. Oxidized LDL and atherogenesis: Relation to risk factors for coronary heart disease. *Clinical Cardiology*, Easton, v.16, n. 4, (suppl), p. I-3- I-5, April 1993.
 - 56 HALLIWELL, B. e CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism measurement and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 57, n. 5, (suppl), p. 715S-724S, May 1993.
 - 57 HALLIWELL, B. Oxidation of low-density lipoproteins: questions of initiation, propagation, and the effect of antioxidants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 61, n.3 (suppl), p. 670S-677S, March 1995.
 - 58 HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, Denver, v.91, (suppl 3c), p. 3c-14s - 3c22s, Sept. 1991.
 - 59 HANSSON, G. Immune and inflammatory mechanism in the development of atherosclerosis. *British Heart Journal*, London, v.69, n.1, (suppl), p.S38-S41, Jan. 1993.
 - 60 HAVEL, R.J. Functional activities of hepatic lipoprotein receptors. *Annual Review Physiology*, Palo Alto, v.48, p. 119-123, 1986.
 - 61 HAVEL, R.J.; EDER, H.A e BRAGDON, J.H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *Journal of clinical Investigation*, San Diego, v. 34, p.1345-1353, July/Dec. 1955.
 - 62 HAVEL, R.J.; HAMILTON, R.L. Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. *Hepatology*, Baltimore, v. 8, n. 6, p. 1689-1704, Nov./Dec. 1988.

- 63 HENNEKENS, C. e GAZIANO, J.M. Antioxidants and heart disease: Epidemiology and clinical evidence. *Clinical Cardiology*, Easton, v.16, (Suppl), n.4, p.1-10 - 1-15, Apr. 1993.
- 64 HERMANN, W. The effect of vitamin E on lipoprotein cholesterol distribution. *Annals of the New York Academy of Science*, New York, v.393, p.467-472, 1982.
- 65 HERMANN, W.; WARD, K. ; FAUCETT, J. The effect of tocopherol on High-density Lipoprotein cholesterol. *The American Journal of Clinical Pathology*, Philadelphia, v. 72, n.5, p.848-852, Nov. 1979.
- 66 HIGUCHI, K.; HOSPATTANKAR, A.U.; LAW, S.C.; MCGLIN, N.; CORTRIGH, J.; BREWER, H.B. Jr. Human apolipoprotein B (apo B) mRNA: Identification of two distinct apo B mRNAs, an mRNA with the apo B-100 sequence and an apo B mRNA containing a premature inframe translational stop codon, in both liver and intestine. *Proceeding National academy Science USA*, Washington, v. 85, n. 6, pp. 1772-1776, Mar. 1979.
- 67 HODIS, H.; KRANSCH, D.; AVOGARO, P.; BITTOLO-BON, G.; GAZZOLATO, G.; HWANG, J.; SEVANIAM, A. Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL). *Journal of Lipid Research*, Bethesda, v. 35 n. 4, p. 669-677, Apr. 1994.
- 68 HOFFMAN, R. ; BROOK, G. ; AVIRAM, M. Hypolipidemic drugs reduce lipoprotein susceptibility to undergo lipid peroxidation in vitro and ex vivo studies. *Atherosclerosis* , Shannon, v. 93, n. 1/2. p. 105-113, Mar. 1992.
- 69 HOMMA,Y.; OZAWA,H. KOBAYASHI, T.; YAMAGUCHI, H.; SAKANA, H.; NAKAMURA, H. Effects of simvastatin on plasma lipoprotein subfractions, cholesterol esterification rate and cholesteryl ester transfer protein in type II hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis*, Shannon, v. 114, n. 2, p. 223-234, Apr. 1995.
- 70 HUNNINGHAKE, D.; MELLIES, M.; GOLDBERG, A.; KUO, P.; KOSTES, J.; SCHROTT, H.; INSULL, W ; PAN, H. Efficacy and safety of pravastatin in patients with primary hypercholesterolemia. II. Once-daily versus Twice-

- daily dosing. *Atherosclerosis*, Shannon, v. 85, n. 2/3, p. 219-227, Dec. 1990.
- 71 ILLINGWORTH, D.R. Drug therapy of hypocholesterolemia. *Clinical Chemistry*, Washington, v. 34, n.8, (suppl), p. B123-B132, Aug. 1988.
 - 72 JIALAL, I.; FULLER, C.T. Oxidized LDL and antioxidants. *Clinical Cardiology*, Easton, v. 16, n. 4, (suppl), p. I-6 - I-9, Apr. 1993
 - 73 JIALAL, I.; GRUNDY, S. Effect of combined supplementation with tocoferol, ascorbato, e beta carotene on low density lipoprotein oxidation. *Circulation*, Dallas, v. 88, n. 6, p.2780-2786, Dec. 1993.
 - 74 JIALAL, I.; GRUNDY, S. Effect of dietary supplementation with alpha tocopherol on the oxidative modification of low density lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, Bethesda, v. 33, n. 6, p.899-906, Jun. 1992.
 - 75 JIALAL, I.; FULLER, C.; HUET, B. The effect of α -tocopherol supplementation on LDL oxidation. Dose-response study. *Arteriosclerosis Thrombosis vascular Biology*, Dallas, v.15, n.2, p. 190-198, Feb. 1995.
 - 76 KANE, J.P. Apolipoprotein B: structural and metabolic heterogeneity. *Annual Review of Physiology*, Palo Alto, v. 45, p.637-650, 1983.
 - 77 KANNEL, E.B.; CASTELLI, W.R. ; GORDON, T. Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease; new perspectives based on the Framingham study. *Annals of Internal Medicine*. Philadelphia. v. 90, n. 1, p. 85-89, Jan. 1979.
 - 78 KAYDEN, H.; TRABER, M. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *Journal of Lipid Research*, Bethesda, v. 34, n. 1, p. 343-358, Mar. 1993.
 - 79 KEANEY, J.; GAZIANO, M.; XU, A.; FREI, B.; CURRAN-CALENTANO, J.; SHWAENY, G.; LOSCALZO, J. ; VITA, J. Low dose alfa-tocopherol improves and high dose alfa-tocopherol worsens endothelial vasodilator function in cholesterol fed rabbits. *The Journal Clinical Investigation*, New York, v. 93, n. 2, p. 844-851, Feb. 1994.
 - 80 KILLION, S.; HUNTER, G.; ESKELSON, C.; DUBICK, C.; Mc INTYRE, K. Vitamin E levels in human atherosclerotic plaque. The influence of risk factors. *Atherosclerosis*, Shannon, v. 126, n. 2, p.289-297, Oct. 1996.

- 81 KLEINVELD, H.; DEMACKER, P.; STALENHOF, A. 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. *Atherosclerosis and Thrombosis*, Dallas, v. 14; n. 8, p. 1386-1391, Aug. 1994.
- 82 KOMARATAT, P.; CHUPUKCHAROEN, N.; WILAIRAT, P. Effect of vitamin E on cholesterol plasma lipoprotein distribution and metabolism in rabbit. *Journal for Vitamin and Nutrition Research*, v. 55, n. 2, p. 167-171, Feb. 1985.
- 83 KOSTNER, G.M.; KNIPPING, G.; GROENER, J.E.; 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, v.210, p.79-86, 1987.
- 84 KUSHWAHA, R. ; HAZZARD, W. Catabolism of very low density lipoproteins in the rabbit effect of changing composition and pool size. *Biochimica et Biophysica Acta* , Amsterdam, v.528, n.2, p.176-189, Feb. 1978.
- 85 LIU, S.Y.; CHOY, S.; DEMBINSKI, T.G.; HATCH, G.M.; MYMIN, D.; SHEN, X.; ANGEL, A.; CHOY, P.C. ; MAN, R. Alteration of lysophosphatidylcholine content in low density lipoprotein after oxidative modification: Relationship to endothelium dependent relaxation. *Cardiovascular Research*, London, v. 28, n.10, p. 1476-1481, Oct. 1994.
- 86 LOPEZ-VIRELLA, M.; STONE, P.; ELLIS, S.; COLWELL, J. Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clinical Chemistry*, Washington, v. 23, n. 5, p. 882-884, May 1977.
- 87 LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J. FARR, A.L.; RANDALL, A. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *The Journal Biological of Chemistry*, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.
- 88 LUC, G. ; FRUCHART, J.C. Oxidation of lipoproteins and atherosclerosis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 53, n. 1, (suppl), p206S-209S, Jan. 1991.

- 89 MACHLIN, L.J. ; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients: *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, Bethesda, v.1, n.6, p.441-445, Dec. 1987.
- 90 MANTHA, S.; PRASAD, M.; KALRA, J. ; PRASAD, K. Antioxidant in hypercholesterolemia and effects of vitamin E in rabbits. *Atherosclerosis*, Shannon, v. 101, n. 2, p. 136-144. July, 1993.
- 91 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, v. 68, n. 9, p. 863-867, Oct. 1991.
- 92 MILLS, G.L.; LANE, P.A. A guidebook to lipoprotein technique, 1a, ed. Amsterdam, Elseviers, 1984, p. 512, il.20 cm, ISBN 0444805745.
- 93 MOREL, D.; LLERA-MOYA, M ; FRIDAY, K. Treatment of cholesterol-fed rabbits with dietary vitamins E and C inhibits lipoprotein oxidation but not development of atherosclerosis. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 124, n. 11 p. 2123-2130, Nov.1994.
- 94 MYANT, N.T. Cholesterol metabolism, LDL and the LDL receptor. 1a. ed., San Diego, Academic Press, 1990. 465 p.
- 95 NAKANDAKARE, E.; GARCIA, R.; ROCHA, J.; SPERATTO, G.; OLIVEIRA, H.; QUINTÃO E. Effects of simvastatin, bezafibrate and gemfibrozil on the quantity and composition of plasma lipoproteins. *Atherosclerosis*, Shannon, v.85, n. 2/3, p.211-217, Dec. 1990.
- 96 NAKASHIMA, Y.; TOYOKAWA, Y.; TANAKA, S.; YAMASHITA, K.; YASHIRO, A.; TASAKI, H.; KUROIWA, A. Simvastatin increases plasma NO_2^- and NO_3^- levels in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, Shannon, v. 127, n. 1, p.43-47, Nov. 1996.
- 97 NENSETER M. ;GUDMUNDSEN, O. ;ROSS, M.; MALLANDSNO, G.; DREVON, C.A. ; BERG, T. Role of liver endothelial and kupffer cells in clearing low density lipoprotein from blood in hypercholesterolemic rabbits. *Journal of Lipid Research*, Bethesda, v.33, n.6, p. 867-877, Jun. 1992.

- 98 NENSETER, M.; GUDMUNDSEN, O.; MALTERUD, K.; BERG, T. ; DREVON, C. Effect of cholesterol feeding on the susceptibility of lipoproteins to oxidative modification. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1213, n. 2, p.207-214, July 1994.
- 99 NEWMAN, H.; ZILVERSMIT, J. Quantitative aspects of cholesterol flux in rabbit atheromatous lesions. *The Journal of Biological chemistry*, Baltimore, v. 227, n. 7, p.2078-2084, July 1962.
- 100 NIKI, E. ; YAMAMOTO, Y.; TAKAHASHI, M.; KOMURO, E. ; MIYAMA, Y. Inhibition of oxidation of biomembranes by tocopherol. *Annals of the New York Academy of Sciences*. New York, v. 570, p.23-32, 1989.
- 101 PACKER, L. Nutrition and Biochemistry of the lipophilic antioxidants vitamin E and carotenoids. In *Nutrition Lipids Health and disease*. Ed. A.Ong; E. Niki; L. Packer. AOCS-press, Champaign, Illinois, cap.2,p.9-24. 1995.
- 102 PARTHASARATHY, S. ; KHOO, J.C.; 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, v.87, n.8, p. 3894-3898, May 1990.
- 103 PARTHASARATHY, S.; PRINTZ, D.J.; BOYD, D.; JOY, L.; STEINBERG, D. Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, Dallas, v. 6, n. 4, p. 505-510, July/Aug. 1986.
- 104 PARTHASARATHY, S.; STEINBRECHER, U.P.; 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, v. 82, n. 9, p. 3000-3004, May 1985.
- 105 PAUL, J.; BAI, N.J; DEVI, G.L. The effect of vitamin E on lipid components of atherogenic rats. *International Journal of Vitamin and Nutrient Research*, Switzerland, v. 59, n.1, p.35-39, 1989.

- 106 PRASAD, K. ; KALRA, J. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis. Effect of vitamin E. *American Heart Journal*, New York, v.125, n. 4, p. 958-973, Apr. 1993.
- 107 PRINCEN, H.; VAN POPPEL, G.; VOGELEZANG, C. ; BUYTENHEK, R.; e KOF, F.J. Supplementation with vitamin E but no β -caroteno in vivo protects low vitamin density lipoprotein from lipid peroxidation in vitro: Effect of cigarette smoking. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, Dallas, v. 12, n. 5, p. 554-562, May, 1992.
- 108 QIAO, Y.; YOOKOYAMA, M.; KAMEYAMA, K. ; ASANO, G. Effect of vitamin E on vascular integrity in cholesterol-fed guinea pigs. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, Dallas, v.13, n.12, p. 1885- 1992, Dec. 1993.
- 109 QUINTÃO, E.C.R. Colesterol e Aterosclerose. 1a. ed. Rio de Janeiro: Qualitmark, 1992. 275 p. il. 20 cm. ISBN 85-85360-19-4.
- 110 QUINTÃO, E.C.R. Estatinas no tratamento de hipercolesterolemia. *Revista da Associação Médica Brasileira*, São Paulo, v. 40, n. 1, p.50-58, Jan/Mar. 1994.
- 111 QURESHI, A. BURGER, W. PETERSON, D. ; ELSON, CH. The structure of an inhibitor of cholesterol biosynthesis isolated from barley. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v.261, n.23, p.1054-10550, Aug. 1986.
- 112 RAINES, E. ; ROSS, R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis: *British Heart Journal*. London, v. 69, n.1, p. S30-S37, Jan. 1993.
- 113 REIHNERT, E.; RUDLING, M.; STAHLBERG, D. BERGLUND, L.; EWERTH, S.; BJORKHEM, I.; EINARSSON, K. ; ANGELIN, B. Influence of pravastatin a specific inhibitor of HMGCoA reductase on hepatic metabolism of cholesterol. *The New England Journal of Medical*, London, v. 323, n. 4, p. 224-228, July 1990.
- 114 RIBEIRO, J.P.A; OZAKI, M.R.; METZE, K. Effects of simvastatin and pravastatin on endothelium dependent relaxation in hypercholesterolemic rabbits. *Experimental Toxicology Pathological*. Verlag v.46, n.6, p.465-469, Dec. 1994.

- 115 RIEMERSMA, R.A.; WOOD, D.A.; MACINTYRE, C.; ELTON, R.A.; GEY, K.F.; OLIVER, M.F. Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamin A, C and E and carotene. *The Lancet*, London, v. 337, n. 8732, p. 1-5, Jan. 1991.
- 116 RIMM, E.; STAMPFER, M.; ASCHENO, A.; GIOVANNUCCI, E.; GOLDITZ, G.; WILETT, N. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *The New England Journal of Medicine*, London, v. 328, n.20, p. 1450-1456, May 1993.
- 117 ROACH, P.D.; KERRY, N.L.; WHITING, M.J.; NESTERL, P.J. Coordinate changes in the low density lipoprotein receptor activity of liver and mononuclear cells in the rabbit. *Atherosclerosis*. Shannon, v. 102, n. 2, p. 157-164, July 1993.
- 118 ROTH, R.; GAUBATZ, J.; GOTTO, A. ; PATSCH, J. Effect of cholesterol feeding on the distribution of plasma lipoproteins and on the metabolism of apolipoproteinE in the rabbit. *Journal of Lipid Research*, Bethesda, v. 24, n. 1, p. 1-11, Jan. 1983.
- 119 SALONEN, J.; YIA-HERTUALA, S. YAMAMOTO, R. BUTLER, S.; KORPELER, H.; SALONEN, R.; NYSSONEN, K.; PALINSKI, W., WITZUM, J. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*, London, v. 339. p.883-887, n. 8798, Apr. 1992.
- 120 SAS (Statistical Analysis System) SAS/TAT. User's Guide. Ver. 6, Fourth edition, v. 1, 1990.
- 121 SCHAEFFER, E.J.; ORDOVAS, J.M.; LAN, S.M.; GHISELLI, G.; KASHYAP, M.L.; SRIVASTAVA, L.S.; HEATON, W. H.; ALBERS, J.J.; CONNOR, W.E.; LINDGREN, F.T.; LIMESHEV, Y., SEGREST, J.P.; BREWER, H.B. Familial apolipoprotein A-I and C-III deficiency. variant II. *Journal of Lipid Research*, Bethesda, v. 26, n. 9, p.1089-1101, Sep. 1985.
- 122 SCHWARTZ,C.J.; VALENTE, A.J. ; SPRAGUE. E.A. A modern view of atherogenesis. *The American Journal of Cardiology*, New York, v.71, n.6. (suppl), p. 9B-14B, Feb. 1993.

- 123 SCOW, R.O.; BLANCHETTE-MACKIE, E.J.; SMITH, L.C. Transport of lipid across capilar endothelium. *Federation Proceedings*, Bethesda, v.39, p. 2610-2617, 1980.
- 124 SHIREMAN, R. Formation, metabolism and physiologic effects of oxidatively modified low density lipoprotein. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 126, n.4S, p.1049S-1052S, Apr. 1996.
- 125 STAMPFER, M.; WILLETT, W.; CASTELLI, W.; TAYLOR, J.; FEVE, J.; HENNECKENS, C. Effect of vitamin E on lipids. *The American Journal of Clinical Pathology*, Philadelphia, v. 79, n.6, p.714-716, Jan. 1983.
- 126 STEINBERG, D. PARTHASARATHY, S.; CAREW,T.E.; KHOO, J.C ; WITZTUM, J.L. Beyond cholesterol: modification of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *The New England. Journal of Medical*, London, v.320, n. 14, p.915-924, Apr. 1989.
- 127 STEINBRECHER, U.P.; PARTHASARATHY, S. LEAKE, D.; WITZUM, J. ; STEINBERG, D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proceeding National Academy Science USA*, Washington D.C. , v.81, n. 12, p.3883-3887, Jun. 1984.
- 128 STEINBRECHER, U.P.; WITZTUM, J.L.; PARTHASARATHY, S.; STEINBER, G. Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. *Arteriosclerosis and Trombosis*, Dallas, v.7, n. 1, p. 135-143, Jan. 1987.
- 129 STRINGER, M. GOROG, P.; FREEMAN, A. KAKKAR, V. Lipid peroxides and atherosclerosis. *British Medical Journal*, London, v. 298, n. 6669, p. 281-284, Feb. 1989.
- 130 THE SCANDINAN SIMVASTATIN SURVIVAL STUDY GROUP. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. The Scandinavian simvastatin survival study. (4S) *The Lancet*, London, v.344, n.8934, p.1383-1389, Nov. 1994.
- 131 THIERY, J.; NEBENDAHL, K.; WALLI, K.; SEIDEL, D. Effects of three different HMG-CoA reductase inhibitors on hypercholesterolemia and

- atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, Dallas v. 11, n. 5, p. 1468a, Sep./Oct. 1991.
- 132 THOMAS, M. The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v.35, n. 1-2, p.21-39, 1995.
- 133 TOMIKAWA, M.; NAKAYASAU, T.; TAWARA, K., KAMEDA, K.Y.; ABIKO, Y. Effect of pantethine on lipoprotein profiles and HDL subfractions in experimental hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*, Shannon, v.41, n.2/3, p.267-277, Feb. 1982.
- 134 TRABER, M.; BURTON, G.; INGOLD, K.; KAYDEN, H. RRR- and SRR- α -tocopherols are secreted without discrimination in human chylomicrons, but RRR- α -tocopherol is preferentially secreted in very low density lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, Bethesda, v. 31, n. 5, p. 675-685, May 1990.
- 135 TRABER, M. ; KAYDEN, H. Alfa-tocopherol as compared with gamma-tocopherol is preferentially secreted in human lipoproteins. *Annals of the New York Academy Science*, New York, v. 570, p.95-107, 1989.
- 136 TRIBBLE, D. Lipoprotein oxidation in dyslipidemia insights into general mechanism affecting lipoprotein oxidative behavior. *Current Opinion in Lipidology*, Philadelphia, v.6, n. 4 p.196-208, Aug. 1995.
- 137 WARNICK, R. Enzymatic Methods for Quantification of Lipoprotein Lipids. *Methods in Enzymology*, New York, v. 129, p.101-123, 1986.
- 138 WESTROPE, K.L.; MILLER, R., A. ; WILSON, R. B. Vitamin E in a rabbit model of endogenous hypercholesterolemia and atherosclerosis *Nutrition Reports International*, Los Altos, v. 25, n. 1, p. 83-88, Jan. 1982.
- 139 WILLIAMS, R.J.; MOTTERAM, J.M.; SHARP C.H.; GALLAGHER, P.J. Dietary vitamin E and the attenuation of early lesion development in modified watanabe rabbits. *Atherosclerosis* , Shannon, v.94, n. 2, p. 153-159, July. 1992.
- 140 WILLINGHAM, A.K.; BOLANOS, C.; BOHANNAN, E.; CENEDELLA, E.J. The effects of high levels of vitamin E on the progression of atherosclerosis in

- the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Journal of Nutritional Biochemistry*, Igar Stonehan, v. 4, n. 11, p. 651-654, Nov. 1993.
- 141 WILSON, R.B.; MIDDLETON, C.C.; SUN, G.Y. Vitamin E, antioxidants and lipid peroxidation in experimental atherosclerosis of rabbits. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 108, n.11, p.1858-1867, Nov. 1978.
- 142 WISWANATHAN, M.; BHAKTHAN, N.; ROCKEBIE, R.A. Effect of dietary supplementation of vitamin E on serum lipids and lipoproteins in rabbits fed a cholesterol diet. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, v.49, n.4, p.370-375, Apr.1979.
- 143 WITZTUM, J. Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis. *British Heart Journal*, London, v.69, (suppl), n.1, p. S12-S18, Jan. 1993.
- 144 WOJCICKI, J.L.; ROZEWICKA, B.; WISNIEWSKA, B.; SAMOCHOWIEC, S.; JUZWIAK, S.; KADLUBOWSKA, D.; TUSTANOWSKI, S.; JUZYSZYN, Z. Effect of selenium and vitamin E on the development of experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, Shannon, v. 87, n. 1, p. 9-6, Mar. 1991.
- 145 YIA-HERTTUALA, S.; PLENSKI, W.; ROSENFELD, M.; PARTHASARTHY, S.; CAREW, T.; BUTTER, S.; WITZUM, J.; STEINBERG, D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *Journal of Clinical Investigation*. San Diego, v. 84, n. 4, p.1086-1095, Oct. 1989.