



Sandro Percário (Uniso e Unifesp)
Valdir Francisco Odorizzi (UFMS)

*Uso de vitaminas antioxidantes na
prevenção da aterosclerose em coelhos
submetidos à dieta rica em colesterol*



RESUMO

A aterosclerose, atualmente, representa a doença com maior índice de mortalidade total nos países ocidentais e também no Brasil. Mais recentemente, observou-se que os radicais livres participam como importantes intermediários na formação do quadro aterosclerótico através do fenômeno conhecido como "estresse oxidativo". Fisiologicamente, a proteção contra o estresse oxidativo é realizada por um complexo sistema de moléculas antioxidantes, grande parte derivadas da dieta. Assim, os objetivos do presente trabalho foram verificar o envolvimento de radicais livres na instalação de placas de aterosclerose em coelhos submetidos à indução de aterosclerose pela ingestão de dieta rica em colesterol e verificar o potencial benefício do uso de vitaminas antioxidantes adicionadas à dieta na prevenção da instalação de placas de ateroma nestes animais. Foram utilizados 26 coelhos machos da raça Nova Zelândia, divididos em três grupos: os animais dos grupos B e C foram submetidos à indução da aterosclerose por ingestão de dieta rica em colesterol pelo período de dez semanas. Simultaneamente à indução da aterosclerose, os animais do grupo C foram tratados com vitaminas antioxidantes. Simultaneamente, os animais do grupo A receberam apenas ração normal. Foram avaliados o perfil lipídico e os níveis de malondialdeído dos animais, sendo que os animais dos grupos B e C apresentaram elevados níveis de colesterol total, LDL-colesterol e MDA, Embora os níveis apresentados para os animais do grupo C sejam menores que para os animais do grupo B. Estes dados sugerem que os radicais livres participem do processo patológico da aterosclerose e que o uso nutricional de vitaminas antioxidantes possa retardar este processo.

ABSTRACT

Nowadays, atherosclerosis is the higher mortality index disease in western countries and in Brazil. Recently, it has been seen that free radicals play an important role in the onset of atherosclerosis, through a phenomenon known as oxidative stress. Physiologically, the protection against oxidative stress is done by a complex system of antioxidant molecules, mainly from diet. Thus the aim of the present study was to verify whether free radicals are involved in the onset of atherosclerotic plaques in cholesterol-fed rabbits, and to verify the potential benefit of antioxidant vitamins added to diet in the prevention of the disease. The 26 male New Zealand rabbits were divided in three groups as follows: groups B and C animals were submitted to atherosclerosis induction by eating a cholesterol-enriched chow for ten weeks. Simultaneous to the atherosclerosis induction, group C animals got antioxidant vitamins added to the chow. Meanwhile, group A animals were fed a normal rabbit chow for the same period. At the end of this period, blood samples were drawn for lipid profile and TBA reactive species (TBARS) dosage. We found higher levels of total cholesterol, LDL-cholesterol and TBARS for groups B and C animals, although group C presented lower levels than group B animals. Data suggest that free radical may play a crucial role in plaque formation and that the nutritional usage of antioxidant vitamins may retard such process.

Palavras chave: aterosclerose, antioxidantes, radicais livres, estresse oxidativo

Introdução

A aterosclerose atualmente representa a doença com maior índice de mortalidade, sobretudo nos grandes centros urbanos dos países ocidentais. O infarto agudo do miocárdio, o acidente vascular cerebral, a insuficiência vascular crônica e inúmeras outras patologias são, comprovadamente, decorrentes da aterosclerose, fato que evidencia o grau de importância desta doença no contexto médico atual (1)

A sociedade científica em muito tem se empenhado no estudo dos fatores causadores da aterosclerose, bem como nos métodos preventivos e eficientes para o seu controle. Sobretudo nos últimos 40 anos se evidenciaram os fatores de risco da doença, que foram classificados em dois grandes grupos: os primários e os secundários. Agrupam-se, deste modo, a hipercolesterolemia, a hipertensão arterial e o fumo como fatores primários. Entre os fatores secundários destacam-se o diabetes, a vida sedentária, a hereditariedade, a dieta com excesso de gordura saturada e o estresse (2-4).

Na patogenia da doença aterosclerótica é relevante o papel desempenhado pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na formação das placas de ateroma. Estas foram descritas recentemente, como um grupo heterogêneo de partículas que diferem entre si em tamanho, conformação, carga elétrica e composição química. Desta forma tornou-se necessária a melhor caracterização dos subtipos de LDLs, resultando na sua subclassificação, aparecendo como principais categorias as LDLs acetiladas, as metiladas e sobretudo, as peroxidadas (LDL-ox). Sobre as ações fisiopatológicas das LDLs modificadas ainda existe muita controvérsia, porém atribui-se uma ação mais aterogênica que à LDL nativa (2, 5-8).

Mais recentemente, observou-se que os radicais livres participam como importantes intermediários na formação do quadro aterosclerótico (7-18). Sua participação na doença aterosclerótica ocorre através do fenômeno conhecido como "estresse oxidativo", no qual estas espécies químicas lesam compostos orgânicos e componentes celulares, destacando-se entre eles a membrana da célula endotelial. Desta forma, o endotélio fica mais permeável às partículas presentes no sangue e entre elas as LDL, que poderão ser captadas no espaço subendotelial pelos macrófagos, que se transformam em células com grande conteúdo lipídico, as chamadas "células espumosas" (FOAM CELLS).

Ao mesmo tempo, na luz do vaso, partículas de LDL nativas, transformam-se em partículas de LDL peroxidadas, pela ação dos radicais livres,

sendo mais facilmente reconhecidas pelos receptores de LDL modificadas presentes na superfície das células endoteliais e dos macrófagos. Disto decorre um aumento da velocidade de captação de colesterol por estas células, implicando no aumento da velocidade de formação das placas de ateroma (19-22).

Por outro lado, os macrófagos presentes no espaço subendotelial são capazes de sintetizar e secretar diversos tipos de radicais livres, tais como o radical superóxido (O_2^-), peridril (HO_2^-), hidroxila (OH^-) e oxigênio singlet (O_2^{\cdot}), além de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), espécie química considerada como uma das *espécies reativas tóxicas derivadas do oxigênio* (ERTO). Assim, não somente são capazes de reconhecer mais facilmente as LDL modificadas como também de modificar as LDL nativas que se encontrem no espaço subendotelial.

Fisiologicamente a produção de LDLs modificadas é praticamente indetectável, porém em alguns estados patológicos, como na reperfusão de um órgão isquêmico, são formadas grandes quantidades de radicais livres derivados do oxigênio (1, 8, 10), os quais possuem a característica de formarem outros radicais livres mais reativos embora menos estáveis, dentre eles os radicais lipoperóxido, aos quais atribuímos a capacidade de induzir o metabolismo não enzimático do ácido aracdônico, modificando o balanço entre a síntese de prostaglandinas (especialmente prostaciclina) e tromboxane A2 no sentido de aumento da síntese de tromboxane A2, fato este que leva a alterações na hemodinâmica e favorece a aterogênese.

Em nosso laboratório demonstramos anteriormente o efeito benéfico de um varredor de radicais livres na regressão de placas ateroscleróticas. Neste experimento, administramos o probucol (varredor do radical livre hidroxila) em coelhos submetidos à indução dietética de aterosclerose e verificamos que embora não houvesse redução da colesterolemia dos animais, ocorria importante diminuição da área de lesões ateroscleróticas da artéria aorta, em associação à redução dos níveis plasmáticos de malondialdeído, indicador bioquímico indireto de radicais livres (11-12).

Em outro estudo, com o objetivo de testar o potencial efeito do ácido etileno diamino tetracético (EDTA) na inibição da peroxidação lipídica, estudamos a utilização do EDTA em coelhos submetidos à indução da aterosclerose por ingestão de dieta rica em colesterol, verificando-se uma menor velocidade de produção das placas ateroscleróticas nos animais que rece-

beram o EDTA. Sugerimos que este efeito protetor possa ter ocorrido pela inibição (ou diminuição) da produção de radicais livres nas reações de Haber-Weiss (Fig. 1) e de Fenton (Fig. 2), uma vez que o EDTA é um quelador de elementos metálicos, tornando-os indisponíveis para a catálise destas reações (23).

1.1. Radicais livres derivados do oxigênio

No início do século passado, investigadores descobriram que a rancificação das gorduras estava relacionada a uma nova classe de espécies químicas, a qual chamaram de radicais livres. Este importante achado marca o início da química dos radicais livres, componentes vitais da indústria moderna, onde são utilizados nos processos de síntese de polímeros e resinas. Antigamente acreditava-se que a sua alta reatividade química e a irreversibilidade das reações em que estavam envolvidos inviabilizariam a sua existência nos seres vivos. Atualmente esta visão foi descartada, devido ao crescente conhecimento acerca da participação destes elementos nos mecanismos de patogenia humana (10).

Radicais livres são partículas (átomos ou moléculas) que apresentam vida livre e número ímpar de elétrons na camada de valência, ou seja, são espécies químicas reativas que possuem elétrons não pareados nos orbitais mais externos. Decorrem da definição química, duas propriedades peculiares: alta reatividade e alta instabilidade. Estas propriedades manifestam-se nos radicais livres em meias-vidas muito baixas, chegando a valores na ordem de 10-27s. De fato, radicais livres podem reagir com qualquer biomolécula, sendo necessário apenas que estas biomoléculas existam na proximidade do local de formação do radical livre.

Uma molécula pode tornar-se um radical livre tanto ganhando como perdendo um elétron em uma reação química, bem como por fissão homogênea de uma ligação química. Normalmente o rompimento de uma ligação química ocorre de maneira heterogênea, na qual um dos átomos da ligação química retém ambos os elétrons compartilhados, tornando-se um íon negativamente carregado (ou ânion), enquanto o outro átomo perde ambos os elétrons tornando-se um íon positivamente carregado (ou cátion). Porém, em situações onde haja grande oferta de energia (p. ex. radiação UV), a ligação química poderá ser rompida de maneira que cada um dos

átomos que participa da ligação química retenha um dos elétrons compartilhados na ligação, tornando-se radicais livres. Este fenômeno é denominado fissão homogênea e pode ser um mecanismo importante na iniciação da peroxidação lipídica, fenômeno associado à lesão celular.

Embora a descoberta dos radicais livres data do início do século XX e, já na década de 40, a química dos radicais livres estivesse bem definida, foi somente em 1956 (24) que se formulou a primeira teoria relacionando os radicais livres a doenças humanas, no caso as moléstias degenerativas associadas ao envelhecimento. Somente nos últimos anos, estuda-se o seu envolvimento em doenças graves e agudas (25-29)

Embora numerosas moléculas não se encaixem na definição química de radical livre, as espécies reativas tóxicas do oxigênio (ERTO) são consideradas as principais espécies químicas relacionadas a mecanismos patogênicos. As principais ERTO são cinco: radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^{\cdot-}$), radicais alquil ($R^{\cdot-}$) e radicais peroxil ($ROO^{\cdot-}$), sendo os dois primeiros responsáveis pelo desencadeamento da produção dos outros três. Salientamos que as ERTO, apesar de incluírem diversas moléculas radicais livres, não obedecem necessariamente à definição de radicais livres, embora sejam importantes no metabolismo oxidativo. É o caso do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que não é um radical livre (não possui elétron solitário na camada de valência), mas é fundamental para a produção do radical hidroxila ($OH^{\cdot-}$), seja pela reação de Haber-Weiss (Fig. 1), seja pela reação de Fenton (Fig. 2).

As ERTO fazem parte do mecanismo intermediário das moléstias que envolvem isquemia, inflamação, trauma, moléstias degenerativas e hiperóxia. Mesmo nas moléstias onde as ERTO não são a causa primária de lesão, elas são importantes porque toda destruição celular libera ferro, o qual catalisa a geração de radicais hidroxila ($OH^{\cdot-}$), que é um dos mais lesivos para as membranas celulares.

O radical livre superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) apesar de pequena ação direta sobre constituintes celulares, causando-lhes dano, são considerados agressivos principalmente pelo fato de na reação de Haber-Weiss (Fig. 1), reagirem entre si para produzir os radicais hidroxila ($OH^{\cdot-}$), verdadeiros responsáveis pelo dano celular. Estes radicais hidroxila, atuando sobre lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, em um fenômeno chamado de "estresse oxidativo", levam a modificações da função e

estrutura celular que, por sua vez, poderão levar esta célula à morte. Da ação dos OH^{\cdot} sobre ácidos nucleicos decorrem modificações estruturais da molécula do DNA, implicando em mutações gênicas; sobre carboidratos (principalmente em glicosaminoglicanos) são capazes de provocar quebras da estrutura, incorrendo, dentre outras conseqüências, em perda do reconhecimento do contato celular, podendo levar a divisões celulares não limitadas pelo contato com células vizinhas; em proteínas os radicais livres causam o fenômeno conhecido como peroxidação protéica, que causa quebra de cadeias polipeptídicas e/ou perda ou alteração de atividade enzimática, incorrendo em alterações funcionais e estruturais na célula; sobre lipídios resultam no bem estudado fenômeno chamado peroxidação lipídica, que é o principal responsável por alterações da permeabilidade da membrana celular. Desta forma percebe-se que o resultado do estresse oxidativo é, com freqüência, a morte da célula.



Figura 1. Reação de Haber-Weiss. O radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em presença de metais de transição, para produzir radicais hidroxila (OH^{\cdot}), íons hidroxila e oxigênio.

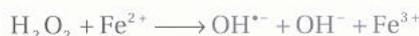


Figura 2. Reação de Fenton. O peróxido de hidrogênio é ionizado em presença de íons ferrosos, levando à produção de radicais hidroxila (OH^{\cdot}) e íons hidroxila. O ferro sofre oxidação sendo liberado na forma de íon férrico.

A manifestação do estresse oxidativo sobre os lipídios celulares é um dos fenômenos mais importantes mediado por radicais livres nos processos patológicos e recebe o nome particular de peroxidação lipídica. É um fenômeno complexo e que apresenta várias reações químicas secundárias, resultando em uma larga gama de produtos, subprodutos e produtos intermediários, tais como os hidroperóxidos e dienos conjugados, compostos carbonílicos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBA) e produtos terciários, tais como hidrocarbonetos voláteis e substâncias fluorescentes. Dentre todas as moléculas produzidas neste fenômeno, o malondialdeído (MDA)

tem sido o mais utilizado para avaliação laboratorial da peroxidação lipídica (30).

1.2. Defesa antioxidante

Fisiologicamente, o organismo pode se defender da agressão mediada pelos radicais livres utilizando as reservas antioxidantes celulares. Estas reservas são constituídas por três sistemas de defesa antioxidante: enzimático, moléculas pequenas e o sistema de quelação de metais.

O sistema antioxidante enzimático é composto por três tipos de enzimas. O primeiro tipo corresponde às enzimas superóxido dismutases (SOD), que atuam sobre o radical $O_2^{\cdot-}$ transformando-o em H_2O_2 (Fig. 3). As SODs são representadas pela SOD-mitocondrial (manganês dependente), a SOD-citoplasmática (dependente de cobre e zinco) e a SOD-extracelular (ferro dependente). Fazem parte do sistema antioxidante enzimático ainda, as enzimas glutaciona peroxidase selênio dependente (GSH-Px) e a catalase (dependente de ferro). Tanto a glutaciona peroxidase como a catalase atuam sobre o H_2O_2 transformando-o em água (Fig. 4 e 5). No entanto, o organismo não dispõe de enzimas que atuem sobre o radical hidroxila, verdadeiro causador de estresse oxidativo. Felizmente, para este fim, nosso organismo pode utilizar moléculas pequenas que diminuem a reatividade do radical hidroxila, tais como as vitaminas A, E e C, o beta caroteno, o ácido úrico e a molécula de glutaciona reduzida (GSH) (31-34).



Figura 3. Dismutação dos radicais $O_2^{\cdot-}$ por ação das enzimas superóxido dismutase (SOD).



Figura 4. Conversão do H_2O_2 a água por ação da glutaciona peroxidase (GSH-Px).



Figura 5. Conversão do H_2O_2 a água por ação da catalase.

Em pacientes portadores de asma brônquica foram identificados níveis extremamente baixos de selênio e de GSH-PX (35), enquanto que a SOD é considerada essencial para a defesa pulmonar (36-37). Também se verificou uma significativa diminuição na capacidade antioxidante total em animais submetidos à indução de broncoespasmo agudo (34). Em indivíduos ateroscleróticos se identificaram diversas deficiências de moléculas antioxidantes como alfa tocoferol e ácido ascórbico (38-40), além de que a adição de antioxidantes á dieta, possa retardar a velocidade de formação das placas ateroscleróticas (31)

Além da produção de enzimas antioxidantes e a utilização de moléculas pequenas como sistema auxiliar na defesa antioxidante, o organismo utiliza-se de proteínas que se ligam a metais de transição impedindo-os de catalisar as reações de Haber-Weiss (Fig. 1) e de Fenton (Fig. 2). Este sistema quelador de íons metálicos é composto por moléculas como a ferritina, a transferrina e a lactoferrina (queladoras de ferro), a ceruloplasmina e a albumina (queladoras de cobre) e um grupo de proteínas chamadas de metalotioneínas, as quais apresentam grupamentos tiólicos (SH), capazes de se ligar a vários metais, tais como o chumbo e o cádmio (41). Paralelamente, diversos minerais podem competir com os metais de transição pela catálise da reação de Haber-Weiss, impedindo a formação de OH^{\cdot} e, conseqüentemente, protegendo do estresse oxidativo. Dentre os metais de transição, devido á sua abundância nas células, o ferro merece destaque, tendo sido diretamente relacionado com risco elevado para aterosclerose (42)

Quando a produção de radicais livres sobrepuja a capacidade fisiológica de defesa antioxidante, instala-se o fenômeno de “estresse oxidativo”, resultando em distúrbios morfológico-funcionais das células agredidas. A partir de então o dano celular passa a se acumular resultando no aparecimento de sinais e sintomas clínicos de moléstias (principalmente degenerativas) e é necessário que se intervenha com medidas terapêuticas antioxidantes (26).

1.3. Óxido nítrico

Sendo um dos mais estudados radicais livres da modernidade, o óxido nítrico (NO) é um gás azul pálido produzido a partir do aminoácido L-arginina por ação das enzimas óxido nítrico sintase (NOS). Possui uma baixa

meia-vida (cerca de 1 a 5 segundos), sendo rapidamente convertido a nitritos (NO-2) e nitratos (NO-3), seus metabólitos estáveis.

Foram descritas três isoformas de enzima NOS, sendo duas formas constitutivas (c-NOS) e uma induzível (i-NOS). As formas constitutivas estão presentes em neurônios não-colinérgicos, não-adrenérgicos (NANC) e células endoteliais e produzem baixa quantidade de NO por longo tempo, sendo aparentemente responsáveis pela produção fisiológica do NO. A forma induzível é ativada por citocinas e interleucinas, está presente em células inflamatórias e endoteliais, produzindo grande quantidade de NO em curto espaço de tempo.

As funções biológicas do óxido nítrico são diversas e complexas, podendo ser considerado um fator parácrino, um gás terapêutico ou um marcador de inflamação. Como fator parácrino, o NO derivado do endotélio desempenha um papel central na modulação do tônus vascular pulmonar, enquanto que o NO derivado do epitélio consiste em uma defesa não-específica das vias aéreas contra os agentes aeropatogênicos aos quais estão constantemente expostas. Como molécula terapêutica gasosa, o NO tem sido usado em terapia de inalação para aliviar a hipertensão pulmonar e/ou hipoxemia refratária em crianças e adultos.

Paralelamente, o NO pode reagir com radicais O_2^- , resultando na formação de peroxinitrito, o qual pode mudar a função do NO como um agente sinalizador transcricional (43-44). O peroxinitrito pode reagir com resíduos de tirosina de proteínas, em reações de nitratação, produzindo nitrotirosina (44). Devido à característica inflamatória da doença, bem como a um aumento na produção de radicais livres superóxido, alguns autores tem identificado elevados níveis de peroxinitrito e, conseqüentemente, de nitrotirosina em pacientes portadores da doença (45-46). Por outro lado, sugere-se que o óxido nítrico possa proteger a LDL da ação oxidativa dos radicais livres (47).

1.4. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Verificar o envolvimento de radicais livres na instalação de placas de aterosclerose em coelhos submetidos à indução de aterosclerose pela ingestão de dieta rica em colesterol;

- Verificar o potencial benefício do uso de vitaminas antioxidantes adicionadas à dieta, na prevenção da instalação de placas de ateroma nestes animais.

2. Métodos

Foram utilizados 26 coelhos machos, adultos jovens da raça Nova Zelândia, pesando $2,5 \pm 0,5$ Kg de peso corporal. Os animais foram divididos em três grupos, chamados grupo A, grupo B e grupo C.

Os animais dos grupos B (N=9) e C (N=10) foram submetidos à indução da aterosclerose por ingestão de dieta rica em colesterol pelo período de dez semanas. Simultaneamente à indução da aterosclerose, os animais do grupo C foram tratados com vitaminas antioxidantes (Vitamina C 16,7 mg/Kg, Vitamina E 6,7 mg/Kg e Beta-caroteno 0,5mg/Kg). Paralelamente, os animais do grupo A (N=7) receberam apenas ração normal para coelhos pelo mesmo período.

Preparo da ração rica em colesterol:

A ração rica em colesterol foi preparada pela vaporização de uma solução de colesterol em clorofórmio sobre a ração, na proporção de 1,5 g de colesterol para 100 g de ração. Antes de ser consumida, a ração assim preparada permaneceu em repouso por 48 horas em uma capela para que o solvente pudesse evaporar completamente. Após o preparo, a ração foi separada em porções individuais de 150 g para uso diário e colocada em sacos plásticos lacrados. Todos os dias pela manhã, recolheu-se a sobra de ração do dia anterior, que foi pesada para controle da ingestão de colesterol por animal (48-49).

Vitaminas antioxidantes:

Os animais do grupo C receberam Vitamina C 16,7 mg/Kg, Vitamina E 6,7 mg/Kg e Beta-caroteno 0,5mg/Kg. A Vitamina E foi misturada à solução de clorofórmio e colesterol e vaporizada sobre a ração normal para coelhos. A Vitamina C e o Beta-caroteno foram dissolvidas em água destilada e pul-

verizada sobre a ração previamente enriquecida com Vitamina E e colesterol após a completa evaporação do clorofórmio. Em seguida a ração é colocada em uma estufa (45°C) por 12 horas para secar totalmente. Da mesma maneira que para a ração rica em colesterol, após o preparo, a ração é separada em porções individuais de 150 g para uso diário e colocada em saco plástico lacrado. Todos os dias pela manhã, recolheu-se a sobra de ração do dia anterior, que foi pesada para controle da ingesta de colesterol por animal.

Todos os animais receberam tanto a ração rica em colesterol, como a ração enriquecida com vitaminas antioxidantes diariamente pelo período de dez semanas.

Parâmetros avaliados:

Ao final do período de dez semanas foram colhidas amostras de sangue para avaliação laboratorial de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicérides e malondialdeído, além de retirada a artéria aorta desde a emergência do arco aórtico até a bifurcação das ilíacas para avaliação da área ocupada por lesões ateroscleróticas e estudo histológico das placas de ateroma (28-29)

– Colesterol Total e Frações:

O colesterol total foi avaliado por método enzimático-colorimétrico realizado com a utilização de kits comerciais (Biodiagnóstica). O HDL-colesterol foi separado pelo método de precipitação com sulfato de dextran, sendo dosado pelo mesmo método descrito para o colesterol total. O LDL-colesterol foi calculado matematicamente pela equação de Friedwald.

– Triglicerídeos

Avaliados por método enzimático realizado com a utilização de kits comerciais (Biodiagnóstica).

– Malondialdeído (MDA)

É um indicador do processo de peroxidação lipídica, processo mediado por radicais livres. O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um complexo com absorvância máxima a 532 nm. O método utilizado foi descrito por Satoh, modificado (50-54).

– Porção de artéria coberta por placas ateromatosas:

Medida por planimetria computadorizada. Este método se baseia na comparação da área da artéria tomada por placas de ateroma em relação à área total da artéria, sendo os dados obtidos em mesa digitalizadora de computador.

3. Resultados

A tabela 1 contém os valores médios de colesterol total, MDA e porcentagem de artéria aorta coberta por lesões ateroscleróticas, enquanto que a tabela 2 contém os valores médios de triglicérides, HDL-colesterol e LDL-colesterol. Os grupos B e C comportaram-se de maneira similar e, em comparação ao grupo A, demonstraram valores significativamente maiores de colesterol total ($p < 0,001$), MDA ($p < 0,001$ e $p < 0,01$ respectivamente), porcentagem de artéria aorta coberta por lesões ateroscleróticas ($p < 0,001$) e LDL-colesterol ($p < 0,001$). Paralelamente estes grupos demonstraram uma significativa diminuição nos valores de HDL-colesterol ($p < 0,05$).

Tabela 1. Valores médios de Colesterol Total (mg/dl), MDA (ng/ml) e da área de lesões ateroscleróticas da superfície da artéria aorta (% Lesão).

Grupo	Colesterol (mg/ml)	MDA (ng/ml)	% Lesão
A (N=07)	64 ± 32	411 ± 51	0
B (N=09)	1577 ± 553*	1004 ± 200*	34,8 ± 5,7*
C (N=10)	1766 ± 609*	799 ± 188*#	19,2 ± 3,7* +

* = $p < 0,001$; + = $p < 0,001$; # = $p < 0,05$.

Tabela 2. Valores médios de triglicérides (ng/ml), HDL-colesterol (ng/ml) e LDL-colesterol (ng/ml) para os animais dos três grupos.

Grupo	Triglicérides (mg/ml)	LDL-Colesterol (mg/ml)	HDL-Colesterol (mg/ml)
A (N=07)	134 ± 145	17 ± 18	24,0 ± 11,4
B (N=09)	247 ± 154 ^{NS}	1513 ± 551*	14,9 ± 4,3*
C (N=10)	208 ± 48 ^{NS}	1510 ± 618*	16,4 ± 4,2*

NS = Não Significante; * = $p < 0,001$; + = $p < 0,05$.

Quando comparados ao grupo B, os animais do grupo C demonstraram valores significativamente menores para o MDA ($p < 0,05$) e para a porcentagem de artéria aorta coberta por lesões ateroscleróticas ($p < 0,001$).

4. Discussão

Considerando que todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições, verificamos que a adição de colesterol à ração dos coelhos foi responsável pela elevação dos níveis séricos de colesterol total, LDL-colesterol, bem como pela elevação dos níveis de MDA e pelo aumento na porcentagem de artéria aorta coberta por placas de ateroma.

Não houve qualquer alteração significativa nos níveis de triglicérides em nenhum dos grupos estudados, reforçando a sugestão de que estes lipídios desempenham um papel secundário, se desempenham algum, na fisiopatologia da doença aterosclerótica.

O aumento da colesterolemia era esperado uma vez que houve aumento na ingestão do próprio colesterol. Em relação ao aumento do MDA este aumento é explicado pelo fato do colesterol ser um lipídio polinsaturado, podendo assim, sofrer o processo de peroxidação lipídica, levando a um aumento na produção de espécies químicas oxidantes, tais como os radicais alquil e peroxil.

Este aumento nos níveis de MDA associado a uma maior oferta de colesterol circulante resultou em uma grande deposição do colesterol na parede das artérias, refletindo-se no aparecimento de placas de ateroma em grande parte da artéria aorta. No entanto, este aumento da formação de placas foi mais intenso nos animais que recebiam somente a ração rica em colesterol do que nos animais que recebiam também as vitaminas antioxidantes, sugerindo que estas vitaminas tenham diminuído a velocidade de deposição do colesterol na camada íntima da artéria.

O pequeno número de animais não impediu que fossem verificadas estas importantes diferenças entre os três grupos de animais estudados, entretanto as doses de vitaminas empregadas deixam em aberto o questionamento sobre a possibilidade de existência de um efeito dose-dependente, ou seja, de que com a utilização de dosagens maiores destas vitaminas, obteríamos efeito maior no retardo da instalação das placas de ateroma.

De qualquer forma, não podemos deixar de considerar que a doença aterosclerótica é uma doença multifatorial e que os mecanismos envolvidos na sua fisiopatogenia são amplos e complexos, de sorte que muitas vezes a utilização de uma estratégia única na prevenção desta patologia pode não surtir os efeitos esperados.

A única grande certeza em relação a esta implacável doença é a necessidade de se produzir muitos trabalhos científicos mais para que se possa atingir uma maior compreensão sobre os seus complexos mecanismos bioquímicos.

5. Conclusões

Com base nos dados obtidos no presente trabalho, concluímos que, primeiramente, há o envolvimento dos radicais livres no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas, conforme visualizado pela elevação dos níveis de MDA nos animais dos grupos B e C. Em segundo lugar, o uso de vitaminas antioxidantes pode retardar a instalação das lesões ateroscleróticas.

REFERÊNCIAS

- ANGEL, M. E.; RAMASASTRY, S. S.; SWARTZ, W. M.; NARAYANAN, K.; KUHNS, D. B.; BASFORD, R. E.; FUTRELL, J. W. – The critical relationship between free radicals and degrees of ischemia: evidence for tissue intolerance of marginal perfusion. *Plast.Recons. Sur.*, v. 81, n. 2, p. 233-239, 1988.
- ASHAKUMARY, L & VIJAYAMMAL, P. P. L. – Effect of nicotine on antioxidant defence mechanisms in rats feed a high-fat diet. *Pharmacology*, n. 52, p. 153-8, 1996.
- ASSMAN, G. SCHULTE, H. – Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (The PROCAM experience). *Am. J. Cardiol.*, n. 70, p. 733-7, 1992.
- BADIMON, J. J.; BADIMON, L. ; FUSTER, V. Regression of atherosclerosis lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol. Fed. Rabbit, *The American Society for Clinical Investigation Inc.*, n. 85, p. 1234-41, 1990.
- BAKKER, S. J. L.; IJZERMAN, R. G.; TEERLINK, T.; WESTERHOFF, H. V.; GANS, R. O. B.; HEINE, R. J. – Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and b-cell failure? *Atherosclerosis*, n. 148, p. 17-21, 2000.
- BEASLEY, R.; THOMSON, C.; PEARCE, N. – Selenium, glutathione peroxidase and asthma [editorial]. *Clin. Exp. Allergy*, v. 21, n. 2, p. 157-9, 1991.
- BROWN, A. J.; LEONG, S. L.; DEAN, R. T.; JESSUP, W. – 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque. *J. Lipid Res.*, n. 38, p. 1730-45, 1997.

- CACHIA, O.; LÉGER, C. L.; DESCOMPS, B. – Monocyte superoxide production is inversely related to normal content of α -tocopherol in low-density lipoprotein. *Atherosclerosis*, n. 138, p. 263-9, 1998.
- CONSTANTINIDES, P.; BOOTH, M. D.; CARLSON, G. – Production of Advanced Cholesterol Atherosclerosis in the Rabbit. *Arch. Pathol.*, n. 70, p. 712-24, 1960.
- CONTI, M.; MORAND, P. C.; LEVILLAIN, P.; LEMONNIER, A. – Improved fluorometric determination of malonaldehyde. *Clin. Chem.*, n. 377, p. 1273-5, 1991.
- COTRAN, R. S.; MUNRO, M. Pathogenesis of Atherosclerosis: recent concepts. In: GRUNDY, S. M.; BEAM, A. G. *The Role of cholesterol in atherosclerosis*. Philadelphia: Hanley & Belfur, 1987, p. 5-21.
- CRAPO, J. D. & DAY, B. J. – Modulation of nitric oxide responses in asthma by extracellular antioxidants. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 104, n. 4PT1, p. 743-6, 1999.
- ESTEBAUER, H.; GEBICK, J.; PUHL, H.; JURGENS, G. – The Role of Lipid Peroxidation and Antioxidants in Oxidative Modification of LDL. *Free Radical Biology & Medicine*, n. 13, p. 341-90, 1992.
- FANI, K.; DEBONS, A. E.; JIMENEZ, F. A.; HOOVER, E. L. – Cholesterol-Induced Atherosclerosis in the Rabbit: Effect of Dimethyl Sulfoxide on Existing Lesions. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 244, n. 3, p. 1145-9, 1987.
- FELIPPE Jr., J. & PERCÁRIO, S. – Efeito de antioxidantes endovenosos sobre a peroxidação lipídica em humanos. *Rev. Soc. Bras. Med. Biomolec. Rad. Livres*, v. 1, n. 5, p. 19-23, 1995c.
- FELIPPE Jr., J. & PERCÁRIO, S. – Prevenção de aterosclerose experimental com o uso de antioxidantes: papel das vitaminas e do beta caroteno. *Rev. Soc. Bras. Med. Biomolec. Rad. Livres*, v. 1, n. 3, p. 21-5, 1995b.
- FELIPPE Jr., J. & PERCÁRIO, S. – Uso do EDTA na prevenção da doença aterosclerótica em coelhos alimentados com ração rica em colesterol. *Rev. Soc. Bras. Med. Biomolec. Rad. Livres*, v.1, n. 2, p. 22-5, 1995a.
- FELIPPE, Jr., J. & PERCARIO, S. – Radicais Livres em Medicina Intensiva. *Rev. Bras. Terap. Int.*, v. 3, n. 3, p. 66-72, 1991.
- FERREIRA, R.; LLESUY, S.; MILEI, J.; SCORDO, D.; HOURQUEBIE, H.; MOLTENI, L.; PALMA, C.; BOVERIS, A. – Assesment of miocardial oxidative stress in patients after myocardial revascularization. *Am. Heart J.*, v. 116, n. 2, p. 307-312, 1988.
- FEUERSTEIN, G. & GOLDSTEIN, R.E. – Lipid peroxides and the coronary circulation. *Am. Rev. Respir. Dis.*, n. 136, p. 485-487, 1987.
- FUHRMAN, B.; BUCH, S.; VAYA, J.; BELINKY, P.; COLEMAN, R.; HAYEK, T.; AVIRAN, M. – Licorice extract and its major polyphenol glabridin protect low-density lipoprotein against lipid peroxidation: in vitro and ex vivo studies in human and

- atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am. J. Clin. Nutr.*, n. 66, p. 267-75, 1997.
- GEY, K. F. – On The Antioxidant Hypothesis with Regard to Atherosclerosis. *Biblhca Nutr. Dieta*, n. 37, p. 53-91, 1986.
- HALLIWELL, B.; BORISH, E. T.; PRYOR, W. A.; AMES, B. N.; SAUL, R. L.; MCCORD, J. M.; HARMAN, D. – Oxygen radicals and human disease. *Ann. Int. Med.*, n. 107, p. 526-545, 1987.
- HALVORSEN, B.; BRUDE, I.; DREVON, C. A.; NYSOM, J.; OSE, L.; CHRISTIANSEN, E. N.; NENSETER, M. S. – Effect of homocysteine on copper iron-catalyzed, azo compound-initiated, and mononuclear cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J. Lipid Res.*, n. 37, p.1591-600, 1996.
- HARMAN, D. – Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, n. 11, p. 298-300, 1956.
- HAYEK, T.; ATTIAS, J.; SMITH, J.; BRESLOW, J. L.; KEIDAR, S. – Antiatherosclerotic and antioxidative effects of captopril in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, n. 31, p. 540-4, 1998.
- HOLMAN, R. L.; Mc GILL, H. C.; STRONG, J. P.; GEER, J. C. – Technics for Studying Atherosclerotic Lesions. *Lab. Invest.*, n. 7, p. 42-7, 1958.
- KILLIOM, S. L.; HUNTER, G. C.; ESKELSON, C. D.; DUBIK, M. A.; PUTNAN, C. W.; HALL, K. A.; LUEDKE, C. A.; MISIOROWSKY, R. L.; SCHILLING, J. D.; McINTYRE, K. E. – Vitamin E levels in human atherosclerotic plaque: the influence of risk factors. *Atherosclerosis*, n. 126, p. 289-97, 1996.
- KNIGHT, J. A.; PLEPER, R. K.; MCCLELLAN, L. – Specificity of the thiobarbituric acid reaction: Its use in studies of lipid peroxidation. *Clin. Chem.*, v. 34, n. 12, p. 2433-2438, 1988.
- LEEUEWENBURGH, C.; RASMUSSEN, J. E.; HSU, F. E.; MUELLER, D. M.; PENNATHUR, S.; HEINECKE, J. W. – Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. *J. Biol. Chem.*, n. 272, p. 3520-6, 1997.
- LI, Z.; MAO, H. Z.; ABOUD, F. M.; CHAPLEAU, M. W. – Oxygen-derived free radicals contribute to baroreceptor dysfunction in atherosclerotic rabbits. *Circ. Res.*, n. 79, p. 802-11, 1996.
- LUZ, P. L. Atherosclerose: aspectos atuais. *Atheros*, v. 4, n. 1, p. 14-17, 1993.
- MARTINEZ, T. L. R.; PERCARIO, S.; IHARA, S.; LOPES, I. L.; FELIPPE Jr., J.; PORTUGAL, O. P.; MARTINEZ, E. E. F.; BADIMON, J. – Major Impact of Probucol and its Antioxidant Effect on Regression of Experimental Atherosclerotic Lesions. *Third Internacional Conference on Preventive Cardiology*, 27 June-1 July 1993, Oslo, Norway.

- MCCALL, J. M., BRAUGHLER J. M., HALL, E. D. – Lipid peroxidation and the role of oxygen radicals in CNS injury. *Acta Anaesth. Belg.*, v. 38, n. 4, p. 373-379, 1987.
- METAL chelation therapy, oxygen radicals and human disease – *Lancet*, n. 19, p. 43-5, 1985. (Editorial)
- PANASENKO, O. M.; SHAROV, V. S.; BRIVIDA, K.; SIES, H. – Interaction of peroxy-nitrite with carotenoids in human low density lipoproteins. *Arch. Bioche. Biophys.*, n. 373, p. 302-5, 2000.
- PAOLISSO, G.; ESPOSITO, R.; D’ALESSIO, M. A.; BARBIERI, M. – Primary and secondary prevention of atherosclerosis: is there a hole for antioxidants? *Diab. Metab.*, n. 25, p. 98-306, 1999.
- PERCARIO, S. – Dosagem das LDLs modificadas através da peroxidação lipídica: correlação com risco aterogênico. Anais Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa casa de São Paulo, n. 13, p. 49-52, 1993.
- PERCÁRIO, S., VITAL, A. C. C., FELIPPE Jr., J. – Efeito de duas formas farmacêuticas da vitamina E sobre a peroxidação lipídica. *Rev. Soc. Bras. Med. Biomolec. Rad. Livres*, v.1, n. 1, p. 17-8, 1994a.
- PERCARIO, S.; CAMARGO, C. X.; FELIPPE Jr., J. – Avaliação dos radicais livres pela dosagem da peroxidação lipídica: padronização da técnica. Congresso Brasileiro de Clínica Médica II, São Paulo, Brasil, 25 a 29 setembro, 1993. Livro de abstracts, p. 116.
- PERCARIO, S.; IHARA, S.; MARTINEZ, T. L. R.; FELIPPE Jr., J. – Regression of Experimental Atherosclerosis in Rabbits by Using an Antioxidant. International Conference on Critical Aspects of Free Radical in Chemistry, Biochemistry and Medicine. Vienna, Austria, 14-17th february, 1993. Book of abstracts, p.79
- PERCÁRIO, S.; ROMALDINI, H.; ODORIZZI, V. F. – Papel dos radicais livres e da defesa antioxidante no broncoespasmo agudo induzido em cobaias. *LAES & HAES*, v. 23, n. 133, p.126-56, 2001.
- PERCARIO, S.; VITAL, A. C. C.; JABLONKA, F. – Dosagem do Malondialdeido (MDA). *NewsLab*, v. 2, n. 6, p. 46-50, 1994.
- RATTAN, A. K. & ARAD, Y. – Temporal and kinetic determinants of the inhibition of LDL oxidation by N-acetylcysteine. *Atherosclerosis*, n. 138, p. 319-27, 1998.
- REILLY, M. P.; PRATICO, D.; DELANTY, N.; DiMINNO, G.; TREMOLI, E.; RADER, D.; KAPOOR, S.; ROKACH, J.; LAWSON, J.; FRITZGERALD, G. A. – Increased formation of distinct F2 isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation*, n. 98, p. 2822-8, 1998.
- SATOH, K. – Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin. Chim. Acta*, n. 90, p. 37-43, 1978.

- SECCIA, M.; PERUGINI, C.; BELLOMO. – The formation of some antigenic epitopes in oxidized human low-density lipoprotein is inhibited by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, n. 232, p. 613-7, 1997.
- SEDGWICK, J. B.; GEIGER, K. M.; BUSSE, W. W. – Superoxide generation by high-density lipoproteins from patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, n. 142, p. 120-5, 1990.
- STEINBERG, D. & WORKSHOP PARTICIPANTS – Antioxidants in the Prevention of Human Atherosclerosis. *Circulation*, v. 85, n. 6, p. 2337-44, 1992.
- SZABÓ, C. – The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock*, v. 6, n. 2, p. 79-88, 1996.
- TSAN, M. F. – Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *P.S.E.B.M.*, n. 214, p. 107-22, 1997.
- UPMACIS, R. K.; DEEB, R. S.; HAJJAR, D. P. – Regulation of prostaglandin H2 synthase activity by nitrogen oxides. *Biochemistry*, n. 38, p. 12505-13, 1999.
- YAGI, K. – A simple Fluorometric assay for lipoperoxides in blood plasma. *Biochem. Med.*, v. 15, p. 212-6, 1976.
- ZACHARSKY, L. R.; CHOW, B.; LAVORI, P. W.; HOWES, P. S.; BELL, M. R.; DI-TOMMASO, M. A.; CARNEGIE, N. M.; BECH, F.; AMIDI, M.; MULUK, S. – The iron (Fe) and atherosclerosis study (FeAST): a pilot study of reduction of body iron stores in atherosclerotic peripheral vascular disease. *Am. Heart J.*, n. 139, p. 337-45, 2000.

Endereço do primeiro autor:

Rua Dr. Carlos Orsi Filho, 1518
Jardim Ibiti do Passo
18086-060 – SOROCABA, SP
E-mail: s.percario@bol.com.br