

JOSÉ JOAQUIM FERNANDES RAPOSO FILHO

**Suco de laranja tem efeito sinérgico à estatina e ao
genfibrozila no tratamento da aterosclerose**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de: Cardiologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Raposo Filho, José Joaquim Fernandes

Suco de laranja tem efeito sinérgico à estatina e ao genfibrozil no tratamento da
aterosclerose / José Joaquim Fernandes Raposo Filho. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo.

Programa de Cardiologia.

Orientadora: Maria de Lourdes Higuchi.

Descritores: 1.Sucos 2.Aterosclerose 3.Área de placa 4.Rosuvastatina

5.Genfibrozila

USP/FM/DBD-341/10

HOMENAGENS

À Profa. Maria de Lourdes Higuchi, que sempre acreditou, teve liderança, e iluminou a tese com seus conhecimentos.

Aos Profs. José A. Ramires e Noedir Stolf que sempre souberam formar e inspirar, personificando a real função da Universidade.

Às assistentes do Departamento de Anatomia Patológica, Sueli Palomino, Márcia Reis, pelo apoio constante.

Às Profas. Tânia Martinez, Beatriz Ferreira que apoiaram o início da pesquisa.

A meus filhos Luka e Caio Fernandes.

À Abecitrus (Associação Brasileira de Citricultura) e a Citrosuco S/A pela colaboração

Antes Que Seja Tarde

Composição: Ivan Lins/Vitor Martins

Com força e com vontade
A felicidade há de se espalhar
Com toda intensidade
Há de molhar o seco
De enxugar os olhos
De iluminar os becos
Antes que seja tarde
Há de assaltar os bares
E retomar as ruas
E visitar os lares
Antes que seja tarde
Há de rasgar as trevas
E abençoar o dia
E de guardar as pedras
Antes que seja tarde
Há de deixar sementes
No mais bendito fruto
Na terra e no ventre
Antes que seja tarde
Há de fazer alarde
E libertar os sonhos
Da nossa mocidade
Antes que seja tarde
Há de mudar os homens
Antes que a chama apague
Antes que a fé se acabe
Antes que seja tarde.

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua elaboração:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de Apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A doença aterosclerótica coronariana e o tratamento atual	2
1.2	A patogenia da aterosclerose.....	2
1.3	O suco de laranja	4
1.4	A vitamina C	9
1.5	Possíveis efeitos do suco de laranja sobre a doença arterial coronária.....	10
1.5.1	Vasodilatação coronária	10
1.5.2	Prevenção da oxidação do LDL.....	11
1.5.3	Flavonóides e função plaquetária.....	12
1.5.4	Flavonóides e redução de lípides.....	12
1.5.5	Flavonóides e isquemia miocárdica.....	13
1.6	As estatinas no tratamento da aterosclerose	14
1.6.1	Benefícios na prevenção primária	16
1.6.2	Efeitos pleiotróficos das estatinas ⁵²	16
1.7	Os fibratos no tratamento da aterosclerose.....	18
2	OBJETIVOS.....	22
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1	Primeira parte - Estudo do modelo.....	26
3.2	Segunda Parte – Estudo da interação do suco de laranja sobre tratamento antiaterosclerótico com estatina ou fibrato	27
3.3	Confecção da ração <i>ad libitum</i>	28
3.4	Coleta de sangue e métodos laboratoriais	28
3.5	Microscopia óptica.....	29
3.5.1	Variáveis que foram analisadas à microscopia ótica	30
3.6	Imunohistoquímica	30
3.7	Técnica de imunoperoxidase.....	30
3.7.1	Revelação.....	32
3.8	Análise estatística.....	33
4	RESULTADOS.....	34
4.1	Primeira Parte - Análise do Modelo.....	35
4.2	Segunda Parte: Resultados do trabalho propriamente dito	39

4.2.1	Análise da área da placa aterosclerótica (mm ²), LDL oxidada e α actina músculo liso nos grupos A, C, D, E e F.....	40
5	DISCUSSÃO.....	50
5.1	Primeira parte: discussão do modelo utilizado	51
5.2	Segunda parte: o papel coadjuvante do suco de laranja no tratamento da aterosclerose	52
5.2.1	Suco de laranja e estatinas	52
5.2.2	Suco de laranja e fibratos.....	55
6	CONCLUSÕES.....	58
7	REFERÊNCIAS	60

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAT	Acetil Coenzima -A transferase
CML	Células musculares lisas
DAC	Doença Arterial Coronária
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
H&E	hematoxilina-eosina
HDL [©]	Lipoproteína de baixa densidade
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule -1
LDL(ox)	LDL oxidada
LDL [©]	Lipoproteína de baixa densidade
LEE	Lâmina elástica externa
LEI	Lâmina elástica interna
MCP-1	Monocyte Chemoattractant protein .
PMF	Flavanonas Polimetoxiladas
PPAR-alpha	Peroxome proliferator-ativated receptor-alpha
TG	Triglicérides
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
EDGF	Fator relaxante derivado do endotélio
ON	Óxido nítrico
LOX-1	Lectin-like oxidized low density lipoprotein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema de classificação dos flavonóides cítricos.....	8
Figura 2 -	Redução de eventos coronarianos com estatinas, em prevenção primária e secundária da doença coronariana.....	18
Figura 3 -	Aorta Ascendente do grupo C, mostra as Elásticas Interna / Externa e a Placa.....	33
Figura 4 -	Consumo médio diário de ração (mg/dia) pelos animais nos grupos analisados.....	40
Figura 5 -	Representação gráfica dos valores medianos obtidos dos casos: área de placa, LDL(ox) e α actina músculo liso das secções transversais da aorta ascendente entre os grupos A, E e F e entre os grupos A, C e D	47
Figura 6 -	Representação gráfica dos resultados entre as medianas da área de placa, LDL(ox) e α actina músculo liso das secções transversais da aorta ascendente entre os grupos A, E e F e entre os grupos A, C e D	48
Figura 7 -	Aspecto microscópico de secções imunomarcadas com anti-LDL(ox) : na figura 7 A, um caso do grupo Grupo C aumento original 40x e grande aumento (100x) na figura 7 B, mostrando muitos pontos positivos (em marron) na porção subintimal. As figuras 7C e 7D mostram quase ausência de positividade na região subintimal respectivamente de um caso do grupo D (40x) C e um caso do grupo F.....	49
Figura 8 -	Potenciais mecanismos de ação antiateroesclerótica dos flavonóides.....	54
Figura 9 -	Efeitos antiaterogênicos da adiponectina	55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Dosagens de bioquímica do sangue de coelho dos grupos A, B SS e SA, colhidas antes do sacrifício36
- Tabela 2** - Média, desvio padrão e mediana das dosagens de bioquímica do sangue de coelho do grupo A, B, SS e SA, colhidas antes do sacrifício37
- Tabela 3** - Medidas das áreas da placa (mm²) das secções transversais da aorta ascendente dos grupos A, B, S.A. e SS38
- Tabela 4** - Níveis de colesterol e frações no plasma dos animais dos diferentes grupos: **A** – dieta com 1% de colesterol por 12 semanas, **C** – genfibrozila + colesterol, **D** – Suco de laranja + genfibrozila + colesterol, **E** - rosuvastatina + colesterol, **F** – Suco de laranja + rosuvastatina + colesterol 1%..... 41
- Tabela 5** - Medidas das áreas, quantidade de α Actina músculo liso e de LDL(ox) detectado pela imunohistoquímica na placa e em células endoteliais das secções transversais da aorta ascendente dos grupos A, C, D, E e F 43

RESUMO

Raposo Filho JJF. *Suco de laranja tem efeito sinérgico à estatina e ao gemfibrozil no tratamento da aterosclerose* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 70 p.

FUNDAMENTO: O suco de laranja (*Citrus sinensis*) é rico em vitamina C, folatos e seu principal flavonóide, a hesperidina, cuja conformação espacial é semelhante à genisteína de soja que tem ação favorável sobre o aparelho cardiovascular. A vitamina C é conhecida como potente inibidor da peroxidação lipídica. Mas sua capacidade por possuir efeitos terapêuticos no tratamento da aterosclerose é pouco estudada. **OBJETIVO:** O presente trabalho visa a determinar se o suco de laranja pode ter efeito aditivo no tratamento com estatinas e fibratos, reduzindo placas ateroscleróticas e a quantidade de LDL Oxidado (LDL ox). **MÉTODOS:** Análise do efeito do suco nas dimensões de cortes histológicos e na quantidade de anticorpos anti LDL oxidado (antiLDLox) em lesões ateroscleróticas na aorta de coelhos. **RESULTADOS:** O suco de laranja potencializou a redução de área de placas ateroscleróticas e a quantidade de LDL(ox) em relação às reduções obtidas com rosuvastatina e gemfibrozil. **CONCLUSÕES:** O suco de laranja tem efeito sinérgico ao tratamento convencional da aterosclerose de coelhos.

Descritores: Suco de laranja, aterosclerose, área de placa, rosuvastatina, gemfibrozila

SUMMARY

JF. *Orange juice has a synergic effect to statin and gemfibrozil in the treatment of atherosclerosis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 71 p.

Statins and fibrates have been used as anti-atherosclerotic drugs. However, a high number of treated patients still present acute events and death by atherosclerotic complications. Flavonoid ingestion has been associated with lower risk of death, lower incidence of coronary artery disease and more preserved endothelial function in atherosclerotic patients. Orange juice is rich in C vitamine, a well known potent inhibitor of lipidic peroxidation, and in flavonoids, mainly the hesperidine that seems the soy bean genisteine, which is associated with decrease LDL and increase HDL. Objective: In this work we studied if orange juice has additive effect to statin and gemfibrozil in the treatment of rabbit atherosclerosis, reducing plaque area and oxidate LDL (LDLox). Methods: Five group of atherosclerotic rabbits, fed with 1% cholesterol enriched diet during 12 weeks, were analyzed: GI - received no treatment, GII – Gemfibrozil 600mg/day, GIII – treated with Gemfibrozil 600mg/day + orange juice, GIV - rosuvastatin/10mg / day and GV - rosuvastatin/10mg / day + orange juice. The most severe atherosclerotic cross section in ascendant aorta was analyzed in H&E and anti-oxidated LDL (oxLDL) immunostained slides, obtaining intimal area, total vessel area, % luminal obstruction and % oxLDL area in intima. Results: The means (standard deviations) of plaque area and % plaque area of oxLDL in GI were 1.05 (0.91) and 0.12 (0.13), with no significant difference with GII animals, respec-

tively 3.85 (5.27) and 0.18 (0.22), but significantly reduced in GIII, 0.64 (1.56) and 0.03 (0.05). Similar data were seen in GIV, 2.11 (2.77) and 0.19 (0.25), compared with GV, 0.04 (0.09) and 0.00 (0.00). Conclusion: This work demonstrates that orange juice has a potential synergistic action with statin and fibrates in reducing atherosclerosis and the mechanism seems to involve inhibition of oxLDL concentration and migration of smooth muscle cells in the subendothelial space.

Descriptors: Orange juice, atherosclerosis, atheroma plaque, oxLDL, rosuvastatin, gemfibrozil

1 INTRODUÇÃO

1.1 A doença aterosclerótica coronariana e o tratamento atual

Mundialmente, vem se testemunhando um declínio na mortalidade; no entanto, a aterosclerose, os eventos aterotrombóticos e suas complicações mantêm-se como a principal causa de morte¹.

Assim, dentre os tratamentos propostos para a aterosclerose, o que mais se destaca e apresenta maiores evidências de benefícios é o tratamento das dislipidemias por meio de estatinas e fibratos².

As estatinas têm efeito pronunciado na redução de morbidade e mortalidade, tanto nos estudos de prevenção primária como de secundária³⁻⁷. Apesar de seu valor inquestionável, persiste um risco residual substancial em pacientes de alto risco. Por exemplo, no estudo PROVE IT⁷, 22% dos pacientes randomizados para terapia de redução intensiva de lípides com estatina apresentaram eventos nos 24 meses subsequentes e 26% no grupo pravastatina até o final do estudo.

1.2 A patogenia da aterosclerose

Antes considerada uma lesão causada por acúmulo de colesterol, a aterosclerose é hoje compreendida como uma complexa interação em que concorrem fatores de risco, acúmulo de lípidos modificados, macrófagos, células musculares lisas (CML), recrutadas, moléculas circulantes e tecidu-

ais que se comunicam entre si. Inflamação e células inflamatórias participam em todas as fases do processo. Essas moléculas promovem a expressão e adesão de glóbulos brancos na superfície do endotélio, mediadas por citocinas quimiotáticas (Monocyte Chemoattractant protein, MCP-1).

No início, o acúmulo de lípidos modificados, LDL oxidados (LDL ox) seguem a ativação de células do endotélio que aumentam a expressão de moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, P-selectina. Posteriormente, ocorre migração e ativação das células inflamatórias (monócitos, mastócitos e linfócitos T)⁸. Como uma consequência maior do fomento do processo inflamatório instalado acontece a migração de células CML da túnica até a média arterial e sua consequente multiplicação caracterizam o ateroma precoce. Essas células proliferam e elaboram uma matriz extracelular, desde a túnica até a camada íntima, alterando seu fenótipo de contrátil para sintético, aumentando a expressão de alpha 1 actina⁹ que junto a células endoteliais e monócitos secretam metaloproteinases que respondem a sinalização oxidativa, inflamatória, hemodinâmica e autoimune.

Monócitos transpassam a camada íntima e no espaço subendotelial da parede arterial transformam-se em macrófagos ativados que capturam a LDL(ox)

Em razão da degeneração com acúmulo de lípidos e a necrose com base no LDL(ox), podem surgir focos de calcificação em um processo semelhante ao que acontece na formação de ossos. A morte celular, incluindo a apoptose, é comumente encontrada na placa.

Desse modo, esse fenômeno estimula os glóbulos brancos a produzirem o fator celular (Tissue Factor).

A seguir, hemorragias podem surgir, complicando a placa aterosclerótica.

1.3 O suco de laranja

O suco da laranja (*Citrus sinensis*) é alimento amplamente produzido e consumido no Brasil, é rico em diversos flavonóides e vitamina C. Dr. Albert Szent-Gyorgyi, prêmio Nobel de Química em 1937, identificou uma substância a partir da casca do limão, que reduzia a permeabilidade vascular e que era efetiva no tratamento da púrpura resistente à terapêutica com vitamina C, que denominou substância P (permeabilidade). A substância P seria mais tarde renomeada como flavonóide.

Posteriormente, Szent Gyorgyi aventou a possibilidade de flavonóides e vitamina C possuírem efeito sinérgico em ação antiinflamatória vascular.¹⁰

Um dos maiores grupos de fitonutrientes que apresentam efeitos no metabolismo humano são os flavonóides, subclasses de polifenóis. A hesperidina, a naringina e a nobiletina (descrita posteriormente) são os flavonóides mais conhecidos e estudados da laranja.

O interesse despertado nessas substâncias surgiu com base em pesquisas realizadas com animais de experimentação que demonstraram ação hipolipemiante da hesperidina sobre a concentração de colesterol plasmático. Outros estudos em humanos têm demonstrado que o suco de laranja

reduz a excreção fecal e a concentração hepática de colesterol, indicando que os efeitos anti-colesterolêmicos possam ser devidos às modificações endógenas no metabolismo do colesterol¹¹.

Outros autores reportaram que o metabólito hesperitina, da hesperidina inibe também a enzima HM G-CoA redutase e reduz a concentração plasmática do colesterol em ratos¹². Além disso, os sucos cítricos contêm altas concentrações de limonóides compostos bioativos que parecem ter também ação redutora sobre a apo B em células HepG 2¹².

Nos dados do Quadro 1 está descrita a composição do suco de laranja.

Quadro 1 - Nutrientes do suco de laranja pronto para beber em uma porção (249 g ou 250 mL)¹²

Nutrientes	g	mg	µg	Nutrientes	Mg	µg
Água	222			Vitamina A		22
Proteína	1,5			Vitamina C	86	
Gordura total	0,4			Vitamina B-6	0,2	
Carboidrato	25,0			Vitamina E, alfa tocoferol	0,5	
Açúcar total	21,0			Folato total		45
Fibra dietética total	0,5			Vitamina K		0,2
Cálcio		2,0		Niacina	0,8	
Cobre		0,1		Riboflavina	0,1	
Ferro		1,1		Tiamina	0,2	
Magnésio		27		Beta caroteno		72
Fósforo		35		Alfa caroteno		12
Potássio		436		Beta criptoxantina		369
Selênio			0,2	Luteína + zeantina		286
Sódio		5				
Zinco		0,2				
Flavonóides		mg		Energia		kcal
Hesperitina		13,75 ± 2,41				105
Naringinina		3,86 ± 0,27				

A ingestão média de flavonóides é de cerca de 25 mg/dia em muitos países da Europa, com variações em função dos hábitos alimentares. As laranjas e seus sucos são boas fontes desses flavonóides e contêm cerca de 40 mg/100g do alimento, mas perdas consideráveis ocorrem com a remoção da casca, antes do consumo ou no processo industrial¹³.

De modo geral, os flavonóides podem ocorrer em sua forma livre (aglicona) ou, então, conjugados a açúcares (glicosídeos). Nos alimentos, estes compostos estão na forma glicosídica, e após serem ingeridos, no intestino a molécula de açúcar é degradada e os flavonóides passam para a forma aglicona. Os açúcares mais comuns encontrados conjugados aos flavonóides são: glicose, galactose, ramnose, xilose e arabinose e, menos frequentemente, alguns dissacarídeos^{11,14}. Mais de 80 espécies de açúcares têm sido descritos como ligados aos flavonóides.

A grande variedade de compostos (cerca de 6.000) pode ser explicada pelas modificações estruturais na composição básica da molécula, como reações de hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras. A glicosilação pode ocorrer nos grupos hidroxilas, ligando o flavonóide à molécula de açúcar por meio de um átomo de oxigênio, ou diretamente no núcleo do flavonóide, por meio de um átomo de carbono^{14,15,16}.

Os flavonóides das frutas cítricas são resistentes ao suco gástrico do estômago, sendo absorvidos no trato gastrintestinal^{17,18}, após a deglicosilação por enzimas de bactérias intestinais.

A baixa solubilidade da hesperidina em água dificulta sua absorção, sendo menor que 0,01%, entretanto, um derivado da hesperidina, a glicosil hesperidina (G-Hesperidin) é marcadamente mais solúvel em água que a hesperidina¹⁹. Outras reações, como metilação, sulfatação glicuronidação, resultam em uma variedade de formas conjugadas. Os flavonóides conjugados podem ser excretados pela bile ou levados aos tecidos periféricos onde desempenham ações, tais como atividade antioxidante, prevenção de estresse oxidativo e de doenças crônicas^{20,21}.

Nas frutas cítricas, além das flavanonas, são encontradas também as flavonas altamente metoxiladas, conhecidas como polimetoxiladas (PMF). A Figura 1 apresenta os flavonóides cítricos encontrados nas diferentes partes das frutas e em distintas concentrações, variando de acordo com o solo, o clima e as variedades da fruta e época da colheita, entre outros fatores.

As PMF cítricas mais comuns são a tangeritina e a nobelitina - encontradas em laranjas, tangerinas e casca de laranja azeda (*Citrus aurantium*). Vem sendo mostrado que as PMF possuem maior potencial hipolipemiante do que as flavanonas cítricas²².

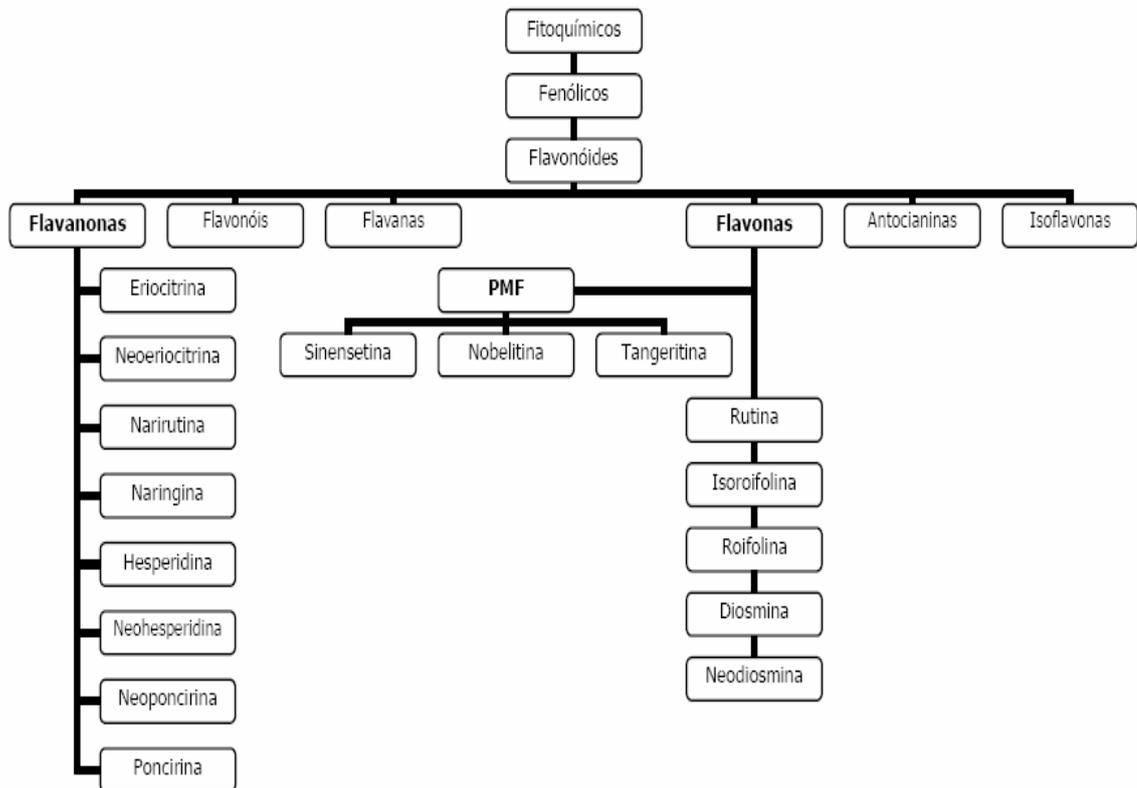


Figura 1 - Esquema de classificação dos flavonóides cítricos²³

O efeito das PMF foi verificado em hamsters com relação aos seus efeitos na dieta hipercolesterolêmica induzida pela dieta. No grupo suplementado com 1% de PMF observou-se diminuição de 27% do colesterol total e 44% de triglicérides séricos, que foram comparáveis ao grupo tratado com dieta suplementada com 3% da combinação hesperidina/naringina (1:1), sugerindo um maior potencial hipolipemiante das PMF.

A soja contém um flavonóide conhecido como genisteína que reduz o colesterol de VLDL e LDL em macacos, ratos e coelhos. Tem sido relatada uma similaridade estrutural entre a genisteína da soja e a hesperidina dos sucos cítricos, sugerindo que estes também podem apresentar propri-

idades hipolipemiante. A ação hipolipemiante de compostos polifenólicos tem sido atribuída à ocorrência comum aos grupos hidroxila na posição 3, 4 ou 5 da sua estrutura²⁴.

O suco de laranja também é rico em folatos que reduzem a homocisteinemia, sendo apontado como fator de risco para doença cardiovascular²⁵.

1.4 A vitamina C

Cada laranja contém 50 a 75mg de vitamina C, que é importante na preservação vascular dependente de endotélio²⁶ e eficiente *scavenger* de anions superóxidos, exerce importante papel na regulação intracelular do estado redox²⁷ e da formação de F2-isoprostanos²⁸. Estes compostos são formados de modo não enzimático, apoiados na peroxidação do ácido aracônico provenientes de fosfolípidios e catalisados a partir de radicais livres. Esse processo pode ser impedido de ser iniciado por ação da vitamina C, pela neutralização dos radicais livres, por meio da doação de elétrons.

Desse modo, estudos mostram que a concentração sérica da vitamina C foi inversamente proporcional à concentração de 8-epi-PGF2 α (outro radical livre produzido), que mostra o efeito direto da vitamina C diminuindo a peroxidação lipídica²⁹.

1.5 Possíveis efeitos do suco de laranja sobre a doença arterial coronária

Dietas ricas em vegetais e frutas têm sido recomendadas para prevenção de doenças³⁰. O Nurses Health Study³¹, seguimento de 120.000 pessoas, mostrou redução de 12% no risco de infarto do miocárdio em pessoas que apresentavam consumo mais acentuado de frutas cítricas.

Acredita-se que flavonóides possam reduzir a doença cardiovascular por meio de quatro mecanismos: 1) Aumento da vasodilatação coronária, 2) Prevenção da oxidação do LDL, 3) Redução da agregação plaquetária³². 4) Redução de lípidos.

1.5.1 Vasodilatação coronária

A preservação do endotélio é fundamental para a vasodilatação coronária, assim, está bem comprovada a relação entre doença arterial coronária e déficit produção de óxido nítrico (ON)³³. Células endoteliais sintetizam e liberam substâncias vasodilatadoras, como as prostaciclina, óxido nítrico e EDGF (fator relaxante derivado do endotélio). Promovem também a síntese da endotelina, que participa da regulação do tônus vascular, controle de plaquetas e adesão, agregação e migração leucocitária. Estudos clínicos mostram que alimentos ricos em flavonóides podem melhorar a função endotelial em hipertensos e portadores de doença arterial coronária^{16,34}, melhorando a vasodilatação dependente de endotélio³⁴, pelo aumento da bioviabi-

lidade de ON, estímulo à produção de EDGF e redução da produção de endotelina.

1.5.2 Prevenção da oxidação do LDL

Espécies Reativas do Oxigênio (ERO) são constantemente produzidas por reações enzimáticas nas células e possuem grande capacidade de reação. Em condições fisiológicas normais ERO são produzidas em níveis baixos e são necessárias para a manutenção de funções celulares normais. Os fatores endógenos dos sistemas de defesa antioxidante do organismo têm a capacidade de evitar quaisquer efeitos nocivos. No entanto, vários fatores de risco estabelecidos para a doença cardiovascular têm sido associados à geração excessiva de ERO, conhecido como estado de estresse oxidativo. Por exemplo, em modelos animais de hiperlipidemia³⁵, hipertensão³⁶ e diabetes³⁷ níveis elevados de produção de ânion superóxido vascular foram encontrados. Além disso, estudos clínicos vêm demonstrando que a hipercolesterolemia e diabetes em seres humanos também estão associados com a geração de ânion superóxido vascular aumentada³⁸. Todos estes dados sugerem fortemente que o aumento do estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia da doença cardiovascular. EROs promovem oxidação LDL³⁹, criando a LDL(ox), que é altamente imunogênica, gerando anticorpos específicos, antiLDL(ox), e inativação de ON⁴⁰. Assim, o suco de laranja reduz a peroxidação lipídica⁴¹ e aumenta a viabilidade do óxido nítrico.

1.5.3 Flavonóides e função plaquetária

Flavonóides cítricos, em estudos “in vitro” mostraram capacidade para inibir a agregação plaquetária⁴², inibem o receptor de acoplamento de tromboxane A2, um dos produtos secretados pela plaqueta quando da aderência ao endotélio lesado e inibem a expressão de enzimas envolvidas na sinalização celular da coagulação, como cyclooxygenases, lipoxygenases, fosfodiesterases, tyrosine kinases e fosfolipases⁴³.

1.5.4 Flavonóides e redução de lípidos

As apolipoproteínas B são proteínas estruturais de quilomicrons, VLDL e LDL. São importantes na secreção e transporte dessas lipoproteínas e funcionam como sinais de reconhecimento para a ligação e internalização de partículas LDL pelo receptor LDL. Depois de ajustes para fatores de risco tradicionais, a apo B permanece um fator de risco significativo para infarto do miocárdio, tanto em homens como em mulheres. O LDL[©] não tem tão bom desempenho em mulheres⁴⁴, sendo apo B associada à aceleração de aterosclerose. Flavonóides inibem a secreção de apoB^{21,45}. De Whalley mostrou que flavonóides são potentes inibidores das modificações do LDL, causadas por macrófagos^{22,46}, evitando a produção de hidroperóxidos e protegendo o alpha tocoferol (potente antioxidante contido nas lipoproteínas) prolongando, assim, sua meia vida e evitando a peroxidação lipídica, porém flavonóides inibem também a oxidação sem participação celular, mediada por CuSo4 (sulfato de Cobre) e ferro. Existe também a possibilidade dos flavonóides

recuperarem também moléculas de alpha tocoferol pela doação de uma molécula de hidrogênio, interrompendo, assim, a peroxidação lipídica ao interromper uma reação em cadeia.⁴⁷

O flavonóide da laranja naringina, além de inibir a secreção de apoB, inibe também a produção de proteína microsomal transportadora de triglicérides (MTP-1)⁴⁴.

A hesperidina produz elevação de HDL[©] em indivíduos portadores de dislipidemia¹⁷. Hesperidina e Naringina causam incremento de 5 a 7 x no RNA mensageiro de receptor de LDL, provocando uma captação em dobro de LDL^{©33}. Hesperidina e Naringina inibem a expressão da proteína intracelular Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) que participa do processo de esterificação do colesterol. Estes constituem os possíveis mecanismos conhecidos para alteração nos lípides causados pelos flavonóides⁴⁵.

1.5.5 Flavonóides e isquemia miocárdica

Flavonóides cítricos protegem contra a isquemia miocárdica. Esse efeito pode ser em razão de sua capacidade de inibir a atividade secretória de mastócitos. Mediadores químicos produzidos por mastócitos podem estar envolvidos na inflamação cardiovascular, que é fator de risco cardiovascular³⁰. Mastócitos produzem Interleucina 6, conhecida como fator determinante na gênese da aterosclerose⁴⁸.

1.6 As estatinas no tratamento da aterosclerose

As estatinas são substâncias capazes de diminuir a síntese intracelular do colesterol por competirem com a enzima hidroximetil glutaril coenzima A (HMG-CoA) por meio da inibição parcial da HM-CoA Redutase, havendo, portanto, inibição apenas parcial da síntese de colesterol, preservando colesterol para mecanismos essenciais à vida humana como a preservação da membrana celular, síntese hormonal e da vitamina D. Uma vez que os níveis intracelulares de colesterol diminuem com o uso da droga, há um aumento no número de receptores do LDL[©] na membrana celular, aumentando, assim, o clearance plasmático do LDL^{©49}. A redução nos níveis séricos de LDL-c pode variar de 25% a 55%, de acordo com a droga utilizada. Também pode haver efeito sobre os níveis de triglicerídios, que diminuem em média 15% a 25%, e de HDL-c que podem sofrer uma elevação de cerca de 10 %.

A primeira estatina sintetizada foi a lovastatina, com base no fungo *Aspergillus terreus* e a pravastatina, a partir da *Nocardia autrophica*. Em seguida, a lovastatina foi modificada tendo sido sintetizada a sinvastatina, que é largamente utilizada até os dias de hoje. Posteriormente, surgiram a fluvastatina, a atorvastatina, a cerivastatina, que foi retirada do mercado. Estatinas são eficazes ao reduzirem eventos cardiovasculares em 25% a 38%¹.

As estatinas diminuem a secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), de densidade intermediária (IDL) e de apolipoproteína B, efeitos que indiretamente causam também redução do LDL[©]. Estas vêm sendo associados a uma expressiva diminuição da morbidade e mortalidade

cardiovascular para pacientes em prevenção primária ou secundária da doença coronariana, em vários estudos sumarizados na Figura 2.

O benefício da terapia com estatina vem sendo reportado em muitos estudos com pacientes com DAC estabelecida, independente ou não de dislipidemia.

O estudo 4S comparou sinvastatina (até uma dose máxima de 40 mg) com placebo, além de reportar diminuição dos eventos coronarianos, procedimentos de revascularização e redução de 42% na mortalidade por DAC. Foi o primeiro estudo a mostrar diminuição da mortalidade geral, sem excesso de mortes não cardíacas³. O CARE comparou pravastatina com placebo, também evidenciando redução na incidência de eventos coronarianos, procedimentos invasivos e morte por DAC⁵⁰.

Mais recentemente, O HPS² (UK Heart Protection Study), comparando a sinvastatina 40 mg com placebo, avaliou mais de 20 mil indivíduos, incluindo grupos de pacientes pouco representados em estudos prévios, como mulheres, idosos e pacientes com níveis de colesterol abaixo da média (33% que tinham LDL-c abaixo de 116 mg/dl). A sinvastatina reduziu em cerca de um terço o risco de IAM, acidente vascular cerebral e revascularização miocárdica, além do benefício sobre a mortalidade geral e por DAC, independente do valor inicial do colesterol. O benefício em pacientes com níveis baixos de LDL-c reflete um possível efeito adicional das estatinas, além daquele relacionado à redução dos níveis de colesterol. descritos no item 1.6.2.

1.6.1 Benefícios na prevenção primária

O WOSCOPS foi um estudo de prevenção primária em homens de meia idade que comprovou a redução de eventos e mortalidade coronariana nesse grupo de pacientes, com o uso de pravastatina 40 mg/dia¹⁹. O mesmo foi observado pelo AFCAPS/TexCAPS (com lovastatina) e o ASCOT-LLA (com atorvastatina 10 mg), ambos com a vantagem adicional de ter avaliado também mulheres e de ter incluído pacientes com níveis de colesterol mais próximos ao “normal”⁵¹.

1.6.2 Efeitos pleiotróficos das estatinas⁵²

As estatinas também apresentam ação na coagulação e trombose: redução da agregação plaquetária, redução da expressão do fator tecidual e “PAI 1”. (“plasminogen activator inhibitor 1”). Por meio do aumento da liberação de óxido nítrico por estabilização da célula endotelial, redução da expressão de moléculas de adesão em linfócitos T e mastócitos e redução da proteína C reativa (PCR us), promovem ação na inflamação e imunomodulação.

As estatinas promovem também inibição do sistema NADPHOxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e consequente redução da formação de superóxidos.

Na placa aterosclerótica formada promove estabilização, redução de síntese de metaloproteinases, estímulo à síntese de colágeno e contenção da célula muscular lisa.

Aumentando a bioviabilidade do óxido nítrico por aumento da expressão da óxido nítrico sintetase promove redução da expressão de endotelina 1, aumento da quantidade de células progenitoras do endotélio, melhorando a angiogênese e a função endotelial.

As estatinas são eficazes em homens, mulheres, crianças e adolescentes, mas não devem ser indicadas para gestantes ou mulheres em fase de aleitamento. São eficazes também após procedimento de revascularização miocárdica.

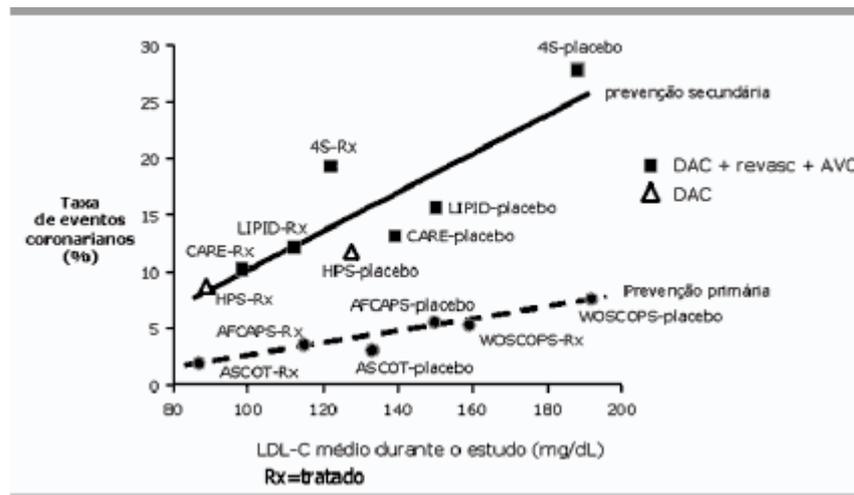


Figura 2 - Redução de eventos coronarianos com estatinas, em prevenção primária e secundária da doença coronariana
 Fonte: Fonseca FH. Arq Bras Cardiol. 2005;85 suppl⁵³

Dentre as estatinas, a rosuvastatina é a mais potente do mercado e é a que produz ligação mais intensa e duradoura com o receptor de LDL⁵³, tendo sido a estatina escolhida para o estudo.

1.7 Os fibratos no tratamento da aterosclerose

Estes fármacos têm ação predominante na hipertrigliceridemia, são derivados de ácido fólico: clofibrato, bezafibrato, fenofibrato, etofibrato, genfibrozila, cipofibrato.

Os fibratos são ligantes que ativam receptores dos peroxossomos (PPAR-alfa), que são fatores de transcrição nuclear. Quando os receptores PPAR-alfa são ativados pelos fibratos, ocorre aumento da expressão dos genes que sintetizam a lipase lipoproteica e a diminuição da expressão do

apo CIII, o que potencializa o catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicéridios. Os fibratos aumentam a expressão das apolipoproteínas AI e AII, elevando os níveis de HDL[©]. Aumentam a excreção do colesterol hepático pelas vias biliares e a afinidade da LDL pelos receptores B-E. Os fibratos reduzem a lipemia pós-prandial. Diminuem os níveis de triglicéridios de 35% a 55%, aumentam HDL-C de 10% a 25% e diminuem LDL-C de 10% a 35% sobretudo às custas da LDL pequena e densa. Mas podem ocorrer aumentos de LDL-C em pacientes com hipertrigliceridemia tratados com fibrato, em decorrência da redução de triglicéridios das VLDL. Formam-se LDL grandes, menos densas e menos aterogênicas.

Os fibratos apresentam efeitos sobre os fatores de coagulação: redução da fibrinogenemia, da agregação plaquetária, do fator VII e de PAI-1.

Podem melhorar a tolerância à glicose. Esses efeitos variam dependendo do medicamento. São absorvidos no intestino, metabolizados no fígado pelo citocromo CYP 450 3A4 e excretados pelos rins. O pico máximo de ação, a meia-vida, a apresentação e as doses habituais são variáveis para cada fibrato. São indicados para hipertrigliceridemia endógena isolada, com HDL-C baixo ou associada à hipercolesterolemia.

Os fibratos são bem tolerados, seus efeitos colaterais (5% a 10%) cessam com a interrupção do tratamento e são: intolerância gástrica, diarreia, litíase biliar, fraqueza muscular, mialgia, diminuição da libido, erupção cutânea, cefaleia e insônia. Podem elevar as enzimas hepáticas, CPK, creatinina e hemocisteína.

São contraindicados na gravidez e amamentação. Interagem com fármacos metabolizados pelo CYP 3A4, o que requer cuidados especiais em casos de polimedicação.

A associação de fibratos com outros hipolipemiantes pode ser feita, observando-se as seguintes precauções:

1) a administração concomitante com colestiramina diminui a absorção do fibrato (se necessário, o fibrato deve ser 3 horas antes ou 3 horas depois da colestiramina);

2) a associação com estatina favorece mialgia e pode facilitar rabdomiólise. Com monitorização adequada das enzimas hepáticas e musculares, esta associação é utilizada na hiperlipidemia mista. A associação das estatinas com genfibrozila não deve ser utilizada pelo risco de rabdomiólise.

Em pacientes com DAC e HDL-C baixo, o estudo *Veterans Affairs High-Sensitivity Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial*⁵⁴ demonstrou que o uso de genfibrozila comparado ao placebo diminui em 22% o risco de IAM não fatal e morte por DAC, e no subgrupo de diabéticos, a redução de grupo foi maior. O ensaio clínico randomizado *Bezafibrato Infarction Prevention Study* (BIP)⁵⁵, o uso de bezafibrato em pacientes com DAC não resultou em benefício significativo, exceto subgrupo com triglicéridios acima de 200 mg/dl, com redução de 40% de eventos cardiovasculares. Estes resultados sugerem que o benefício dos fibratos é observado em pacientes com triglicéridios elevado, HDL-C baixo e LDL-C próximo aos valores normais.

Na prevenção primária, o Helsinki Heart Study⁵⁶ demonstrou benefício com o uso de genfibrozila na redução de eventos cardiovasculares, sobretudo no subgrupo de pacientes diabéticos. O estudo FIELD⁵⁷ utilizou fenofibrato em diabéticos, em prevenção primária e secundária, não se observou redução de risco em relação aos desfechos primários, apenas em relação aos desfechos secundários, sugerindo a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos com ação sinérgica à dos fibratos e melhora do desempenho dessas drogas em desfechos cardiovasculares em futuros estudos.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo comparar os efeitos da administração de genfibrozila e rosuvastatina em associação com o suco de laranja, em relação ao uso isolado das drogas, quanto à possibilidade de redução sinérgica da aterosclerose, avaliando melhora do perfil lipídico sanguíneo, redução do tamanho das placas e possíveis mecanismos envolvidos, em aterosclerose experimental.

Analisa se eventual efeito sinérgico do suco de laranja à ação anti-aterosclerótica das estatinas ou fibratos relaciona-se com menor área de placa, menor quantidade de fibras musculares lisas e LDL(ox) na placa.

Para isto, utilizou-se o modelo de aterosclerose em coelhos induzida por dieta rica em colesterol. Inicialmente, foi realizado um estudo do modelo experimental a ser utilizado, com coelhos Nova Zelândia do Biotério Central da UNIP (Universidade Paulista, campus de Limeira). Constatou-se que os coelhos, realmente, têm aterosclerose com dieta enriquecida com 1% de colesterol. A influência do suco de laranja sobre o animal com e sem aterosclerose foi estudada.

Com base nos resultados demonstrados, observou-se que só o suco não reduz e também não induz aterosclerose em coelhos. Assim, foi feito o estudo da ação aditiva do suco de laranja sobre fibrato ou estatina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O suco de laranja foi cedido pela Citrosuco S.A[®], nome comercial Lanjal[®], concentrado 1.000 ml, mantido a uma temperatura de 6 graus Celsius na distribuidora e no biotério.

O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do HC-FMUSP e Comissão Científica e de Ética do Instituto do Coração

O trabalho foi realizado conforme The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, publicado pelo US National Institutes of Health NIH Publication N 85-23, revisado em 1996.

Desse modo, foram estudados 65 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia (*White New Zealand*), provenientes do Biotério Central da UNIP (Universidade Paulista, campus de Limeira), com 60 dias de idade aproximadamente, todos machos, pesando de 2,8 a 3,0 Kg. Eles foram acondicionados em gaioleiros de aço inoxidável adequados à espécie no Biotério, mantidos com ração com formulação adequada para a espécie e água (grupo controle) ou suco de laranja *ad libitum*, com intervalos de luz e escuridão a cada 14/10 horas e temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

O trabalho foi dividido em duas partes:

3.1 Primeira parte - Estudo do modelo

O estudo constituiu-se de quatro grupos de coelhos para avaliar o modelo que será usado na segunda parte, objetivo fundamental deste trabalho, que era analisar se havia ação sinérgica do suco de laranja sobre a ação antiaterosclerótica e antilipídica da estatina e fibrato.

Grupo SA - Grupo com dieta habitual e só água (n= 10). Grupo controle para avaliar se os coelhos com dieta usual e tomando água não apresentam aterosclerose. Composto de coelhos alimentados com dieta normal e água por 12 semanas.

Grupo SS - Grupo com dieta habitual e só suco de laranja (n= 5). Grupo para avaliar se só o suco de laranja pode apresentar o aparecimento de placas de ateroma. Composto de coelhos alimentados com dieta habitual e substituição de água por suco de laranja por 12 semanas.

Grupo A - Grupo com dieta hipercolesterolêmica (n=10) – Para avaliar se a dieta enriquecida com colesterol leva ao desenvolvimento da placa de aterosclerose. Composto de coelhos alimentados com dieta enriquecida com 1% de colesterol com formulação adequada para a espécie e água, durante 12 semanas.

Grupo B - Grupo com dieta hipercolesterolêmica + suco de laranja (n=10) – Para avaliar se o suco de laranja leva à regressão das placas de aterosclerose nos animais que receberam dieta rica em coleste-

rol. Composto de coelhos alimentados com dieta normal, enriquecida com 1% de colesterol e suco de laranja 750 ml /dia ao invés de água, por 12 semanas.

3.2 Segunda Parte – Estudo da interação do suco de laranja sobre tratamento antiaterosclerótico com estatina ou fibrato

Grupo C - Grupo com dieta hipercolesterolêmica 12 semanas + genfibrozila 600mg /dia, composto de coelhos alimentados com dieta normal, enriquecida com 1% de colesterol durante 12 semanas e 1 comprimido de genfibrozila (Pfizer) macerado na ração.

Grupo D - Grupo com dieta hipercolesterolêmica 12 semanas + suco de laranja+ genfibrozila 600mg /dia, composto de coelhos alimentados com dieta normal, enriquecida com 1% de colesterol, suco de laranja ao invés de água e 1 comprimido de genfibrozila macerado na ração.

Grupo E - Grupo com dieta hipercolesterolêmica 12 semanas + rosuvastatina: composto de coelhos alimentados com dieta normal, enriquecida com 1% de colesterol durante 12 semanas, e 1 comprimido de Rosuvastatina, contendo 10 mg de rosuvastatina cálcica, macerado e misturado à ração.

Grupo F - Grupo com dieta hipercolesterolêmica 12 semanas + rosuvastatina + suco de laranja: composto de coelhos alimentados com dieta normal, enriquecida com 1% de colesterol durante 12 semanas, 1 comprimido de Crestor[®], contendo 10 mg de rosuvastatina cálcica, macerada e misturada à ração e suco de laranja, ao invés de água.

3.3 Confecção da ração *ad libitum*

Inicialmente, os animais foram alimentados com ração para coelhos Nuvilab[®]; laboratório Nuvital, Curitiba, PR, Brasil. Para obter a dieta hipercolesterolêmica, foram adicionados 10 g de colesterol em pó (Sigma – C 8503 – 95% de pureza USP) a cada quilo de ração comercial. O colesterol foi dissolvido em uma mistura de 50 ml de éter etílico e 100 ml de álcool etílico 70^o e, em seguida, pulverizado à ração. A ração permaneceu em cubas apropriadas para evaporação do conteúdo volátil da mistura durante 24 horas. Cada animal recebeu diariamente 150 g de ração, aproximadamente, com consumo controlado por pesagem.

3.4 Coleta de sangue e métodos laboratoriais

Foram colhidas amostras de Colesterol Total, Triglicerídios, HDL[®], GTP/ALT- Alanina aminotransferase, GOT/AST-(Aspartato aminotransferase) e Fosfatase Alcalina, sendo os dois primeiros pelo método Cinético em UV e o último pelo método Colorimétrico, Cinético, dos coelhos no início do

estudo e logo após seu sacrifício. Colesterol total e frações dosados pelo método enzimático CHOD-PAP (Merck[®], E.U.A.). Os níveis séricos de HDL foram medidos, após precipitação com ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. O valor do LDL foi calculado pela fórmula de Friedwaldo: $LDL^{\text{®}} = (TG/5 + HDL) - COL^{\text{®}}$. Os valores dos triglicerídios calculados pelo método enzimático de cor (GPO-PAP), com uso do aparelho Cobas Mira (Roche[®]).

Amostras da aorta torácica dos animais foram colhidas logo após o sacrifício e avaliadas na histologia.

3.5 Microscopia óptica

Cortes transversais de 0,5 cm foram identificados sequencialmente, da aorta torácica descendente e da aorta abdominal, incluídos para análise histológica, e o segmento com maior porcentagem de obstrução da luz foi analisado morfometricamente.

O segmento escolhido foi cortado a 5 um e corado pelo método hematoxilina-eosina (H&E) e Tricrômico de Masson. Os cortes histológicos da aorta (porções torácica e abdominal) foram submetidos à análise e à quantificação da área de placa e reações de detecção de anticorpo Anti LDL(ox) e anti-actina músculo liso pela técnica de imunohistoquímica.

3.5.1 Variáveis que foram analisadas à microscopia ótica

- 1- Área da camada íntima;
- 2- Área potencial da luz delimitada pela lâmina elástica interna (LEI);
- 3- Área da luz
- 4- Porcentagem de obstrução da luz

3.6 Imunohistoquímica

Cortes histológicos seriados de 5 µm foram submetidos a reações de imunohistoquímica para marcação dos seguintes antígenos: alfa-actina músculo liso (clone 1A4 –Dako Cytomation- California) e LDL(ox) clone-2C7OSF10 – produzidos pela Profa. Dra Dulcineia Saes Parra Abdalla (FCF –USP), SP.

3.7 Técnica de imunoperoxidase

A técnica utilizada constou de desparafinação das lâminas em 3 banhos de xilol (10 min cada), seguidos de três banhos em etanol 100%, dois banhos em etanol 95% e um banho em etanol 70%. As lâminas foram lavadas várias vezes em água ultrapura.

A recuperação dos antígenos com Tris/EDTA pH 9.0 com 0,1% de Tween 20 na panela Pascal (DakoCytomation- California/ S2800) foi feita conforme calibração do fabricante, por 2 minutos a 121°C com pressão de 15.9 psi.

Após o término do programa, as cubas foram retiradas e as lâminas mantidas com o tampão 5 minutos T.A., depois foram lavadas várias vezes em água.

Ocorreu o bloqueio de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 20v com cinco banhos de 6 minutos cada e lavadas várias vezes em água corrente.

Para impossibilitar ligações não específicas do tecido com o anticorpo primário, foram incubados com solução bloqueadora de proteína (DakoCytomation- California/ Ref X0909) por 30 minutos a 37°C em câmara úmida.

As amostras foram incubadas com anticorpo anti-LDL oxidada e anti-alfa actina músculo liso diluído 1:80 e 1:600 respectivamente em solução de PBS e 1% de albumina bovina (BSA) a 4°C em câmara úmida por 18 horas.

As lâminas foram lavadas em PBS com 1% de Tween 20 várias vezes e incubadas com anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase (Envision DakoCytomation- California/ K4001), puro durante 45 minutos a 37°C em câmara úmida.

3.7.1 Revelação

Para a revelação das ligações antígenoanticorpo utiliza-se o kit Sistema Substrato-Cromógeno DAB – diaminobenzidina (DakoCytomation- California/ K3468), diluído a 1:50 e as lâminas são incubadas por 1 minuto; depois lavadas bem em água corrente para retirar todo o DAB restante.

- Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 30 segundos.
- Lavagem novamente as lâminas e mergulhá-las rapidamente na água de Scott (para tornar azul a coloração dos núcleos corados pela Hematoxilina).
- Montagem das lâminas: desidratação com banhos de álcool 70º; dois banhos no álcool 95º; três banhos no álcool 100º; posteriormente diafanização com três banhos no xilol; montagem em lamínula e resina sintética.

A análise microscópica das áreas de placa foi realizada em um analisador de imagens Quantimet 500 da Leica, utilizando uma objetiva de 2,5x, contornando-se as áreas da placa e luz do vaso. A quantificação da positividade pela imunohistoquímica foi feita por detecção da cor marrom, como resultado do cromógeno da imunohistoquímica. (Figura 3)

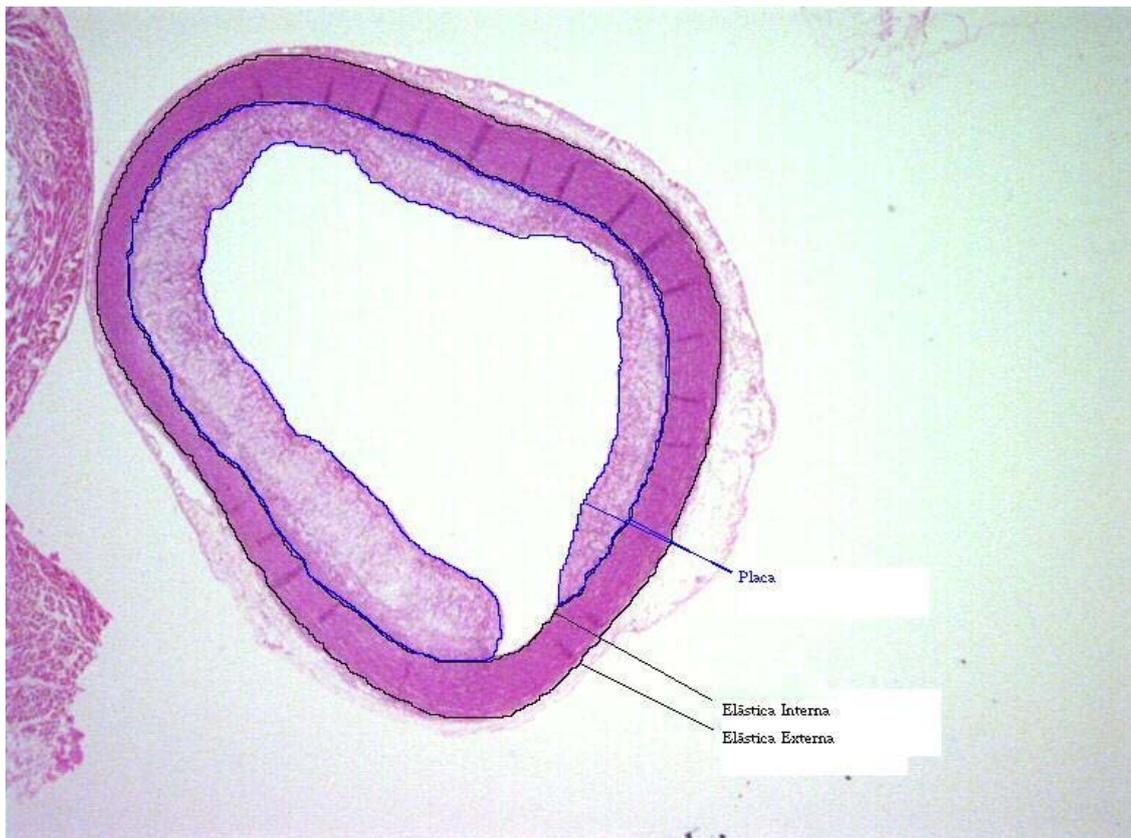


Figura 3 - Aorta Ascendente do grupo C, mostra as Elásticas Interna / Externa e a Placa

3.8 Análise estatística

A comparação dos comprimentos, das áreas e das porcentagens das área positivas, entre os diferentes grupos, foi feita pelo teste de análise de variância (ANOVA) na comparação de 3 ou mais grupos. Os testes T de student ou Mann Whitney foram usados na comparação entre 2 grupos, e correlações pelos testes de Pearson ou Spearman, conforme os resultados apresentassem ou não distribuição normal, utilizando-se o nível de significância $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Primeira Parte - Análise do Modelo

Casuística do Estudo

Grupo SA- O grupo controle de coelhos alimentados com dieta normal e que só beberam água, não apresentou placas de aterosclerose pelos exames macroscópicos e microscópicos.

Grupo SS - composto de cinco coelhos que foram alimentados com dieta normal e beberam suco de laranja em lugar de água, também não desenvolveram placas ateroscleróticas ou calcificação do vaso.

Grupo A - composto de nove coelhos alimentados com dieta enriquecida com 1% de colesterol, com formulação adequada para a espécie e água. Os animais foram sacrificados na 12^a. semana, a partir da data de chegada.

Grupo B - composto de oito coelhos alimentados com dieta normal, enriquecida com 1% de colesterol durante 12 semanas, suco de laranja 750 ml/dia em lugar de água

Níveis de Colesterol Plasmático

Nos dados da Tabela 1, encontram-se os níveis de colesterol e frações no plasma dos animais do modelo, colhidas antes do sacrifício.

Tabela 1 - Dosagens de bioquímica do sangue de coelho dos grupos A, B SS e SA, colhidas antes do sacrifício

Animais dos Grupos	Colesterol	HDL	TGO	TGP	TG
A1	64,2	20,4	74,1	81,8	23,4
A2	669,2	27,2	50,5	38,5	63,6
A3	SE	SE	SE	SE	SE
A4	211,3	11,5	27,3	19,1	160,9
A5	897	16,3	18,1	36,5	202,2
A6	96,8	16,5	27,5	43,1	54,6
A7	385,8	50,6	138,1	69,1	171,1
A8	227,5	42,2	12,9	12,3	64,4
A9	71,9	22,9	20,7	24,5	17,6
B1	SE	SE	SE	SE	SE
B2	856	12,4	59,8	16,8	96,9
B3	675,3	8,1	109,5	24,5	68,2
B4	588,1	16,2	74,3	32,2	117,9
B5	534,2	33,1	93	28,1	65
B6	852,8	39,3	50,8	28,5	104,4
B7	857,5	16,8	51,3	26,8	47,3
B8	865,6	109	56,5	31,4	166,9
SS1	27,2	15,2	31,8	28,7	48,9
SS2	15,1	7,5	7,8	38,5	100,8
SS3	34,5	17,3	14,6	25,3	77,8
SS4	30,8	17,9	19,4	51,8	44,9
SS5	34,3	19,7	17,5	20,8	77,6
SA1	28,2	12,1	65	20,9	74,1
SA2	25,2	15,4	65,7	58,6	38,3
SA3	31,6	10,5	81,5	43	52,6
SA4	25,5	4,8	72	69,2	84,4
SA5	30,5	9,8	24,0	47,8	68,4
SA6	SE	SE	SE	SE	SE
SA7	SE	SE	SE	SE	SE
SA8	SE	SE	SE	SE	SE

Tabela 2 - Média, desvio padrão e mediana das dosagens de bioquímica do sangue de coelho do grupo A, B, SS e SA, colhidas antes do sacrifício

Grupos	Bioquímico	Média	Desvio Padrão	Mediana
A	colesterol	327,963	306,097	219,4
	HDL	25,95	13,652	21,65
	TGO	46,15	42,255	27,4
	TGP	40,613	24,082	37,5
	TG	94,725	72,009	64
B	colesterol	747,071	144,352	852,8
	HDL	33,557	35,125	16,8
	TGO	70,743	22,761	59,8
	TGP	26,9	5,166	28,1
	TG	95,229	40,165	96,9
SS	colesterol	28,38	8,002	30,8
	HDL	15,52	4,763	17,3
	TGO	18,22	8,775	17,5
	TGP	33,02	12,352	28,7
	TG	70	23,143	77,6
S.A.	colesterol	28,2	2,878	28,2
	HDL	10,52	3,858	10,5
	TGO	71,05	7,645	68,85
	TGP	47,9	18,174	47,8
	TG	63,56	18,214	68,4

O grupo A apresentou espessamento intimal acentuado ($1,049 \pm 0,908$). Os resultados demonstraram que a administração de ração enriquecida com 1% de colesterol foi efetiva em produzir placas de aterosclerose.

O grupo B mostrou espessamento intimal acentuado ($3,56 \pm 2,661$, $p=0,08$), sem diferença estatisticamente significativa com o grupo A, mostrando que a administração de suco de laranja não leva à redução das placas de aterosclerose.

O Grupo SA não apresentou espessamento intimal significativo ($0,0653 \pm 0,185$), e o SS não mostrou a formação de placa (0,00).

O teste de Mann-Whitney utilizado mostrou que a mediana entre o grupo A é menor (1,03) que a do grupo B (4,44), porém sem diferença estatisticamente significativa, pela alta variabilidade de resultados entre os animais ($P = 0,081$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Medidas das áreas da placa (mm^2) das secções transversais da aorta ascendente dos grupos A, B, S.A. e SS

Grupos	Média	Desvio-Padrão	Mediana	Maximo	Mínimo
A	1,05	0,91	1,03	2,46	0
B	3,566	2,661	4,444	6,368	0
S.A.	0,0653	0,185	0	0,522	0
SS	0	0	0	0	0

4.2 Segunda Parte: Resultados do trabalho propriamente dito

Esta parte estuda a possível ação sinérgica do suco de laranja sobre o tratamento com drogas antiateroscleróticas.

Comparação do grupo A – de animais ateroscleróticos pelo consumo de dieta rica em colesterol e que beberam água, versus grupos C e D, respectivamente, que receberam estatina e estatina + suco de laranja, ao invés de água. Comparação também do grupo A com os grupos E e F que receberam, respectivamente, genfibrozila e genfibrozila + suco de laranja.

A Figura 4 mostra o consumo médio diário de ração (mg/dia) pelos animais nos grupos analisados. Observa-se que não houve diferença no consumo médio diário da ração enriquecida com colesterol, ou seja, qualquer diferença na quantidade das placas de aterosclerose não pode ser atribuída a uma diferença no consumo da dieta.

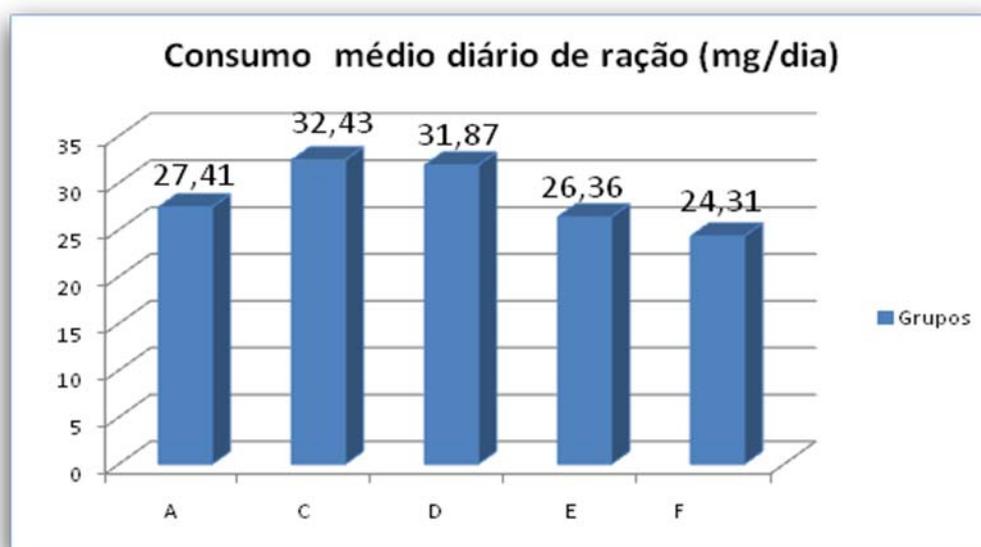


Figura 4 - Consumo médio diário de ração (mg/dia) pelos animais nos grupos analisados

4.2.1 Análise da área da placa aterosclerótica (mm²), LDL oxidada e α actina músculo liso nos grupos A, C, D, E e F

Os dados da Tabela 4 mostram os resultados dos níveis plasmáticos de colesterol e frações nos diferentes animais estudados (A, C, D E e F).

Tabela 4 - Níveis de colesterol e frações no plasma dos animais dos diferentes grupos: **A** – dieta com 1% de colesterol por 12 semanas, **C** – genfibrozila + colesterol, **D** – Suco de laranja + genfibrozila + colesterol, **E** - rosuvastatina + colesterol, **F** – Suco de laranja + rosuvastatina + colesterol 1%

Animais dos Grupos	Colesterol	HDL	TGO	TGP	TG
A1	64,2	20,4	74,1	81,8	23,4
A2	669,2	27,2	50,5	38,5	63,6
A3	SE	SE	SE	SE	SE
A4	211,3	11,5	27,3	19,1	160,9
A5	897	16,3	18,1	36,5	202,2
A6	96,8	16,5	27,5	43,1	54,6
A7	385,8	50,6	138,1	69,1	171,1
A8	227,5	42,2	12,9	12,3	64,4
A9	71,9	22,9	20,7	24,5	17,6
C1	854,9	27,8	46,9	13,3	88
C2	875,1	11,3	78,5	33,2	124,8
C3	409,3	69,9	55,7	44,2	33,6
C4	867,8	106,8	38,5	57,8	189,8
C5	SE	SE	SE	SE	SE
C6	478,2	76,5	41,8	37,3	39,5
C7	870,6	100,6	64,4	21	185,6
C8	232,5	42,1	46,1	24	15,1
C9	SE	SE	SE	SE	SE
D1	53,7	13,6	35,97	66,4	28,9
D2	SE	SE	SE	SE	SE
D3	66,8	11,3	50,84	30,4	23,8
D4	601	29,1	555,09	39,3	42,5
D5	37,3	16,1	10,7	37,1	44,8
D6	60,9	10,3	46,79	101,6	38
D7	SE	SE	SE	SE	SE
D8	100,1	19	71,52	53,2	32,5
D9	119,6	18,8	97,84	50,2	37,2
D10	SE	SE	SE	SE	SE
D11	868,3	100,1	25,5	SE	SE
D12	856,4	106,6	45,6	SE	SE
D13	333,4	50,6	17,2	SE	SE
D14	567,1	75,6	39,2	SE	SE
E1	11	2,3	9,5	14,9	2,73
E2	612,3	20,8	296,1	209,1	24
E3	718,1	10,5	100,2	100,8	46,7
E4	SE	SE	SE	SE	SE
E5	486	19	240,5	538,7	23,8
E6	SE	SE	SE	SE	SE
E7	452,8	16,5	27,4	35,8	48,1
E8	838,7	26,4	7,4	80,3	218,5
E9	284,1	20,6	29,3	6,4	240,1
E10	26,4	6,3	4,9	26,5	123,7
E11	23,9	14,3	25,2	45,4	51
F1	211,4	16,7	10,4	32,2	50,1
F2	163,8	15,4	13,4	3,2	50,5
F3	SE	SE	SE	SE	SE
F4	9,6	5,5	14,4	7,6	14,1
F5	115	10,5	40,4	145	51,1
F6	478,3	24,6	105,5	111,2	58,9
F7	SE	SE	SE	SE	SE
F8	82,8	8,8	17,8	5,6	20,6
F9	SE	SE	SE	SE	SE

SE= Sem exame

Nos dados da Tabela 5, encontram-se as análises (mm^2) da área da placa aterosclerótica, de LDL oxidada e de α Actina músculo liso na placa e em células endoteliais das secções transversais da aorta ascendente dos grupos A, C e D e nos grupos A, E e F.

Tabela 5 - Medidas das áreas, quantidade de α Actina músculo liso e de LDL(ox) detectado pela imunohistoquímica na placa e em células endoteliais das secções transversais da aorta ascendente dos grupos A, C, D, E e F

GRUPOS	N. Animais	PLACA (mm ²)		
		ÁREA	α ACTINA	LDL
A	1	0,00	0	0,00
	2	0,87	0,06	0,13
	3	1,03	0,09	0,13
	4	1,72	0,18	0,10
	5	0,00	0,00	0,00
	6	1,82	0,16	0,40
	7	1,79	0,07	0,11
	8	0,00	0,00	0,00
	9	1,57	0,23	0,18
C	1	7,15	0,87	0,30
	2	16,30	0,92	0,66
	3	0,46	0,06	0,01
	4	1,59	0,12	0,08
	5	0	0	0
	6	4,93	1,12	0,25
	7	3,28	0,19	0,23
	8	0,95	0,07	0,06
	9	0	0,00	0
D	1	0,33	0,04	0,03
	3	0	0	0
	4	4,78	0	0,16
	5	0	0	0
	6	0,36	0	0
	7	0	0	0
	8	0	0	0
	9	0,27	0	0,03
	10	0	0	0
	11	0,49	0,16	0,093
	12	1,38	0,04	NR
	13	0,71	0	NR
	14	0	0	NR
	E	1	0,25	0,06
2		0,37	0,03	0,03
3		1,61	0,25	0,28
4		0	0	0
5		0,36	0	0
6		0	0	0
7		3,11	0,16	0,43
8		6,41	0,48	0,23
9		6,91	0,75	0,73
10		0	0	NR
11		0	0	NR
F	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0,07	0	0,01
	4	0	0	0
	5	0	0	0
	6	0	0	0
	7	0	0	0
	8	0	0	0
	9	0	0	0

Pela Análise de Variância (teste de Kruskal-Wallis) foi possível detectar diferença estatisticamente significativa, tanto na área de placa aterosclerótica como na quantidade de positividade de LDL(ox) entre os grupos A, E e F, sendo $P= 0,017$ e $P= 0,018$, respectivamente. Pela análise de comparação múltipla, encontra-se que a diferença está entre os grupos E e F ($P<0,05$).

Com relação à medida da área de placa, observou-se que o grupo C apresenta maior tamanho de placa do que os animais dos grupos A e D, tendo uma média de 3,85, porém não houve diferença estatisticamente significativa ($P= 0,08$). No entanto, a comparação entre C e D pelo teste de Mann Whitney mostrou diferença significativa tanto na área de placa quanto na área de LDL(ox) ($p<0,05$).

Já com relação à α Actina músculo liso, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos A, C e D ($P= 0,009$) e entre os grupos A, E e F ($0,017$). (Tabela 6 e Figuras 5 e 6).

Tabela 6 – Média, desvio-padrão, mediana e valor de P da análise quantitativa da área, LDL(ox) e de α Actina músculo liso na placa aterosclerótica (mm²) e em células endoteliais das secções transversais da aorta ascendente dos grupos A, C e D e nos grupos A, E e F

Área da placa (mm²)				
Grupo de Animais	Média	Desvio Padrão	Mediana	P
A	1,05	0,91	1,03	0,08
C	3,85	5,27	1,59	
D	0,64	1,56	0,00	
A	1,05	0,91	1,03	0,017* (E vs F) Teste de Tukey
E	2,11	2,77	0,37	
F	0,04	0,09	0,00	

LDL ox (mm²)				
Grupo de Animais	Média	Desvio Padrão	Mediana	P
A	0,116	0,13	0,11	0,09
C	0,18	0,22	0,08	
D	0,03	0,05	0	
A	0,116	0,126	0,11	0,018
E	0,19	0,25	0,03	
F	0,00111	0,00333	0	

α actina músculo liso				
Grupo de Animais	Média	Desvio Padrão	Mediana	P
A	0,09	0,08	0,07	0,009
C	0,37	0,457	0,12	
D	0,019	0,045	0	
A	0,09	0,08	0,07	0,017
E	0,16	0,25	0,03	
F	0	0	0	

A Figura 7 exemplifica os aspectos microscópicos de secções imunomarcadas revelando baixa de LDL(ox) nos grupos de animais que se receberam suco de laranja, ou seja grupos D e F.

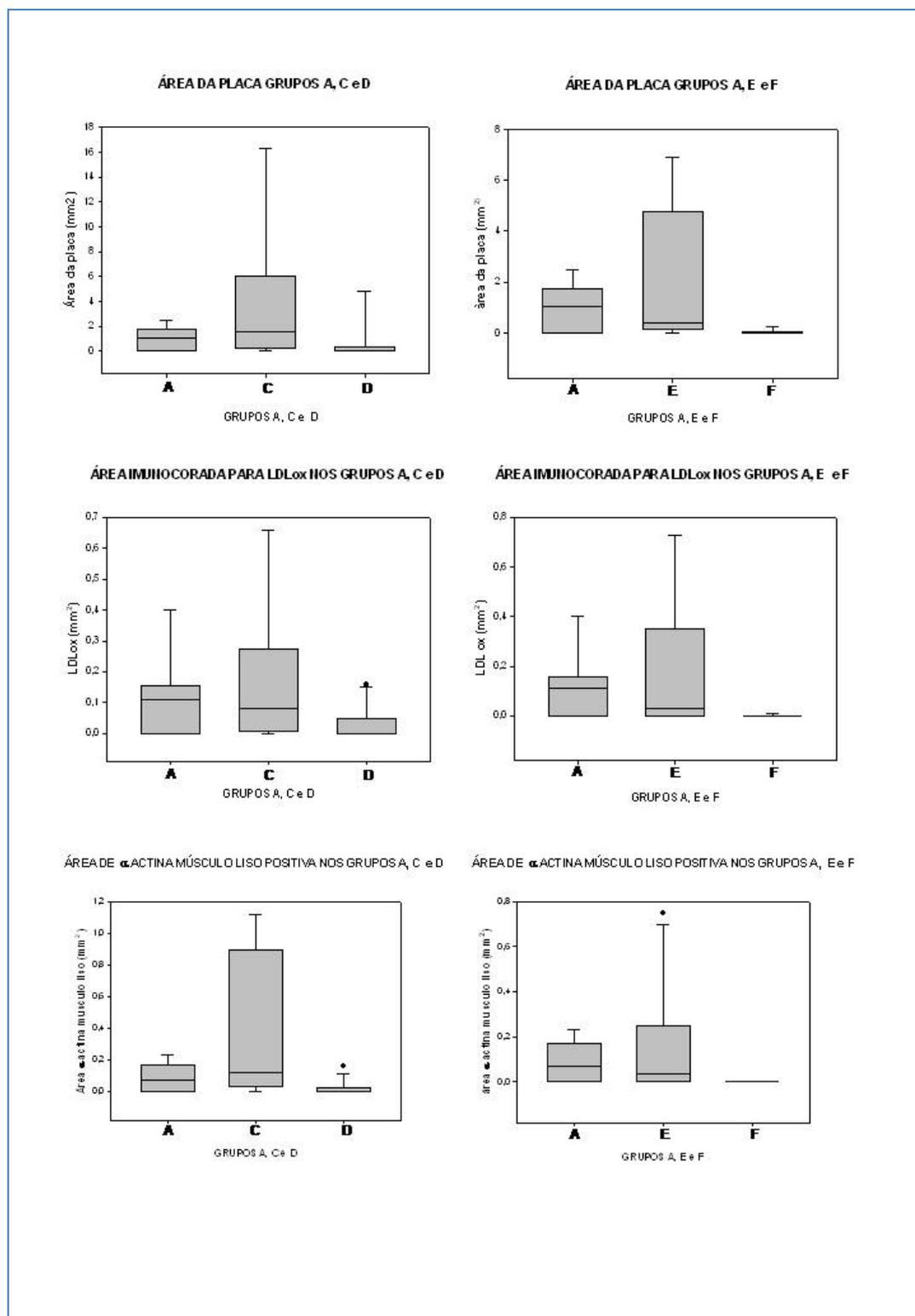


Figura 5 - Representação gráfica dos valores medianos obtidos dos casos: área de placa, LDL(ox) e α actina músculo liso das secções transversais da aorta ascendente entre os grupos A, E e F e entre os grupos A, C e D

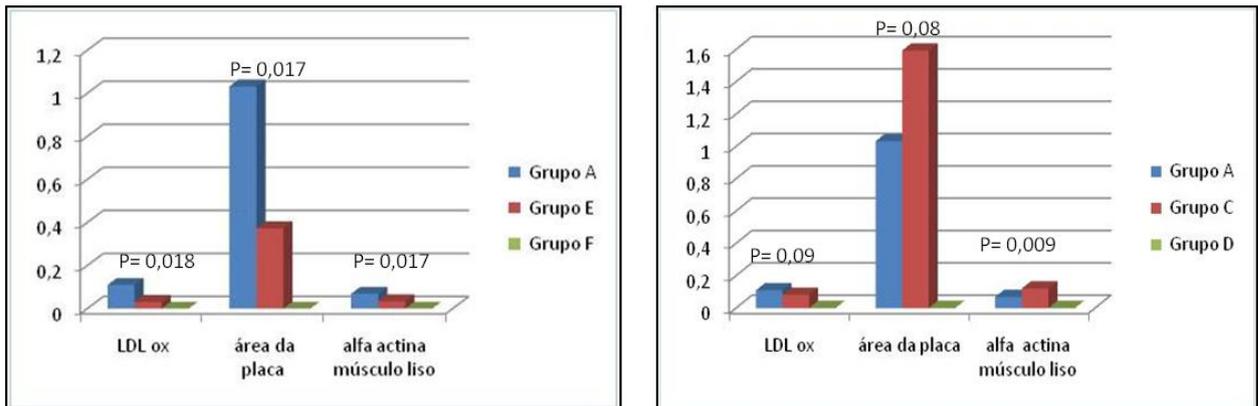


Figura 6 - Representação gráfica dos resultados entre as medianas da área de placa, LDL(ox) e α actina músculo liso das secções transversais da aorta ascendente entre os grupos A, E e F e entre os grupos A, C e D

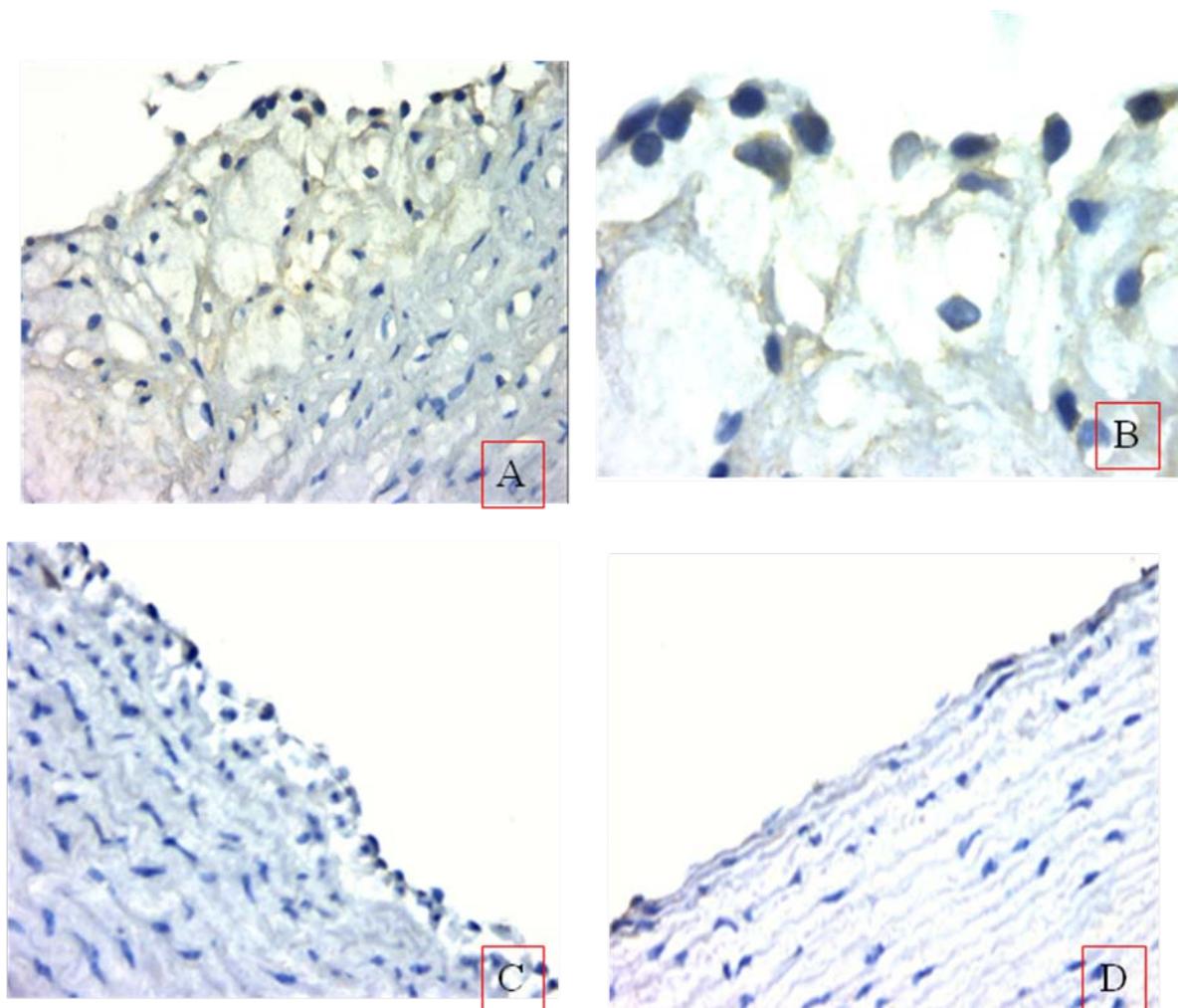


Figura 7 - Aspecto microscópico de secções imunomarcadas com anti-LDL(ox) : na figura 7 A, um caso do grupo Grupo C aumento original 40x e grande aumento (100x) na figura 7 B, mostrando muitos pontos positivos (em marron) na porção subintimal. As figuras 7C e 7D mostram quase ausência de positividade na região subintimal respectivamente de um caso do grupo D (40x) C e um caso do grupo F.

5 DISCUSSÃO

5.1 Primeira parte: discussão do modelo utilizado

Com relação ao estudo do modelo, foi possível avaliar pelo grupo SA (dieta usual e água) que os coelhos utilizados no presente estudo não apresentam espessamentos ateroscleróticos na artéria aorta e que só a ingestão de suco de laranja em grande quantidade não leva à formação da placa. Por outro lado, confirmou-se que o coelho é um bom modelo para desenvolvimento da aterosclerose. Ao usar a dieta enriquecida com colesterol, houve espessamento médio intimal e formação de placas ateroscleróticas consideráveis, conforme a técnica inicialmente descrita por Anistchkoff⁵⁸.

Por outro lado, analisando o grupo B (dieta rica em colesterol + suco de laranja), verificou-se que o suco de laranja sozinho não tem ação antiaterosclerótica. Isto porque não houve diferença estatística entre os grupos B e A (só dieta hipercolesterolêmica) em relação ao parâmetro área de placa e perímetros interno e externo.

5.2 Segunda parte: o papel coadjuvante do suco de laranja no tratamento da aterosclerose

A adição do suco de laranja resultou em intensa redução de área de placas ateroscleróticas, quantidade de LDL(ox) e alfa-actina causadas inicialmente pela rosuvastatina e pela genfibrozila usados isoladamente.

5.2.1 Suco de laranja e estatinas

A influência cardiovascular do suco de laranja e, em particular, seus possíveis efeitos na progressão da aterosclerose ainda é pouco estudada.

Pela primeira vez, foram demonstrados os efeitos positivos na administração sinérgica do suco de laranja no tratamento com estatinas e fibratos. Possivelmente, esses efeitos ocorram em razão dos componentes específicos do suco de laranja como folatos, flavonóides, vitamina C que uma vez somados exerceriam efeitos específicos e variados nas etapas iniciais do desenvolvimento da aterosclerose.

O LDL[©], uma vez oxidada por fatores de risco, induz o aparecimento de moléculas de adesão (VCAM-1, ICAM-1) no endotélio e citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e Tnf alfa, que facilitam sua internalização no espaço subendotelial por meio do receptor específico para LDL(ox), LOX-1, estimulando a produção de radicais livres de oxigênio e estimulação do fator de transcrição Nf Kb. As moléculas de LDL(ox), uma vez aderidas ao endo-

télio, através da citocina MCP-1, juntando-se a monócitos, são internalizadas na parede arterial.

Nesta nova localização, transformam-se em macrófagos ativados, reagindo com as moléculas de LDL(ox) e produzindo, finalmente, células espumosas, lesão inicial da aterosclerose.

Os flavonóides contidos no suco de laranja pela ação antioxidante, propriedades redutoras e transformadoras dos lípidos, ação relaxante vascular, antiagregante plaquetária e antiinflamatórias já descritas anteriormente (Figura 9), aqui podem explicar a redução de área de placas ateroscleróticas e LDL(ox), além da caracterização de anticorpos anti LDL(ox) “aprisionadas” na superfície endotelial, impedidas de penetrar na parede arterial iniciando assim o processo aterosclerótico.

Novos estudos vêm apontando diferentes efeitos dos flavonóides. A quercitina é um flavonóide da laranja que impede a expressão de LOX1⁵⁹, diminui a produção de superóxidos e disfunção endotelial⁶⁰.

Os flavonóides contidos no suco de laranja, “*in vitro*”, inibiram as enzimas fundamentais na síntese do colesterol (hydroxymethylglutaryl-CoA reductase and sterol O-acyltransferase)⁶⁰, em ratos alimentados com macerado de flavonóides da laranja. Naringina, outro flavonóide da laranja, mostrou mesma intensidade em reduzir HmgcoA Redutase⁶¹ na mesma intensidade que lovastatina e idêntica capacidade de reduzir lipídeos da estatina, na aorta de coelhos.

A hesperidina também possui a capacidade de inibir a enzima lipase lipoproteica em pâncreas de porcos⁶² enzima parcialmente envolvida na síntese de LDL[®], possivelmente possuindo a mesma capacidade em seres humanos.

Esses efeitos, possivelmente somados, justifiquem a potencialização da estatina que foi obtida. Muitas ações biológicas dos flavonóides lembram as ações das estatinas (Figura 9), predominantemente os efeitos pleiotróficos, ajudando a justificativa do sinergismo com esta classe de drogas.

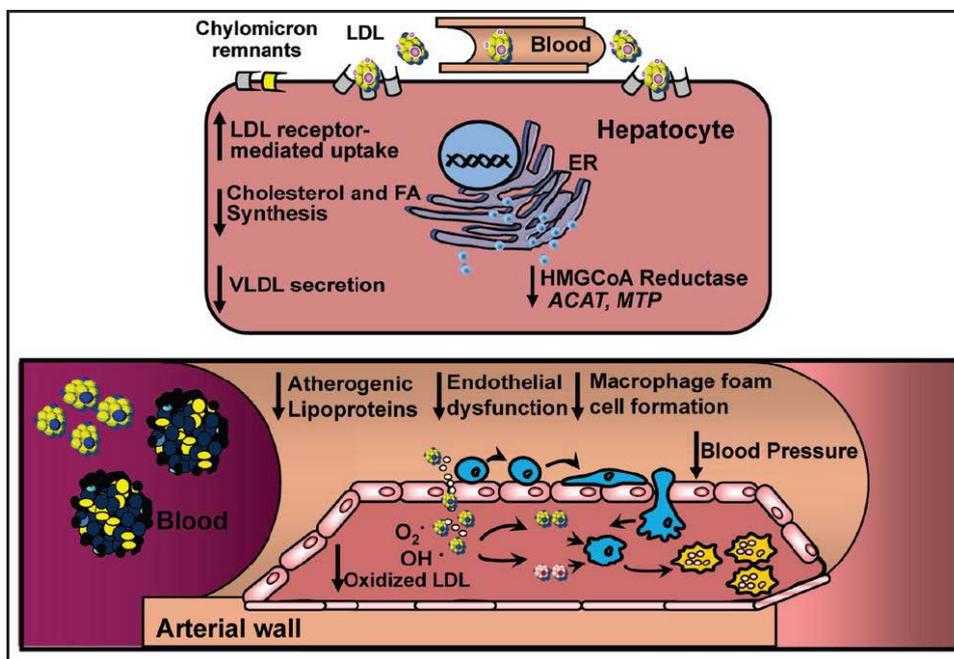


Figura 8 - Potenciais mecanismos de ação antiateroesclerótica dos flavonóides
 Fonte: Mulvihill EE et al. Can J Cardiol. 2010;26 Suppl A.⁶³

5.2.2 Suco de laranja e fibratos

Flavonóides do suco de laranja induzem a expressão de adiponectina⁶⁴, estimulam a expressão de receptores PPAR alpha e diminuem resistência à insulina^{62,65}. A adiponectina possui diversos efeitos cardiovasculares (Figura 10) como diminuição da aderência de monócitos ao endotélio, bloqueio da formação de células espumosas, diminuição da proliferação das células musculares lisas, aumento da produção de óxido nítrico em células endoteliais, diminuição da expressão de TNF alpha. Além de estimulação de receptores PPAR⁶⁶, efeitos que se assemelham aos dos fibratos, drogas que sabidamente são pouco ativas para redução do LDL⁶⁷, poderiam justificar os benefícios encontrados na adição de suco que diminui a síntese hepática de colesterol e apo B, sugerindo sinergismo entre elas.

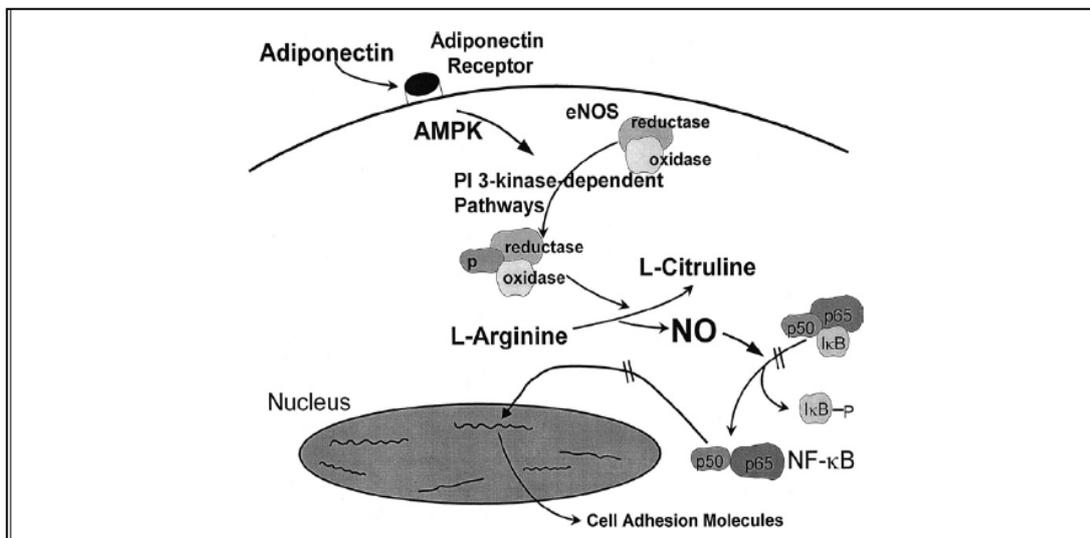


Figura 9 - Efeitos antiaterogênicos da adiponectina
 Fonte: Han SH et al. J Am Coll Cardiol 2007;49(5):531-8.⁶⁵

Os dados do presente estudo não mostraram diminuição dos níveis de colesterol com rosuvastatina ao contrário do que era esperado. Este achado deve-se às particularidades do metabolismo lipídico em coelhos e da alta variabilidade encontrada nas dosagens de colesterol do grupo E. Rosuvastatina mostrou-se eficaz ao reduzir a disfunção endotelial em ratos⁶⁶, mas existem outros estudos mostrando a redução de colesterol em coelhos.⁶⁷

Nossos dados mostram a redução de anticorpos anti LDL(ox), em relação ao tratamento convencional da dislipidemia. O achado deve-se à diminuição da peroxidação lipídica das moléculas de LDL, que uma vez não modificados (oxidados) não seriam reconhecidos nem haveria a produção de anticorpos anti LDL(ox), o que justificaria a redução encontrada nesta pesquisa. O efeito deve-se à ação antioxidante da vitamina C ou da ação dos flavonóides hesperidina e naringina (entre outros), ou mesmo, ao efeito simultâneo de dois componentes interagindo no estado oxidativo do LDL[®], e a análise de nossos dados não permite elucidar a origem do efeito.

Por outro lado, demonstrou-se melhora significativa dos níveis de colesterol sérico, quando o suco acompanha o tratamento com fibrato. Mas, pela grande variação das médias, bem como pelo pequeno número de casos há necessidade da repetição do experimento em animais e seres humanos para confirmação do achado.

Apesar da redução de placas ateroscleróticas e da quantidade de LDL(ox) e do efeito antiproliferativo do suco, caracterizada pela redução de alpha-1 actina há necessidade de confirmação dos resultados, antes de se

recomendar que o tratamento para dislipidemia seja tomado acompanhado de suco de laranja, ressaltando que os efeitos dos parâmetros da aterosclerose obtida foram conseguidos quando o suco é coadjuvante do tratamento habitual e o emprego concomitante de dieta hipercolesterolêmica e suco (sem as drogas) resultou em placas ateroscleróticas maiores, possivelmente, pelo elevado aporte calórico obtido nestes casos.

Embora os flavonóides possuam interessantes e variados efeitos no metabolismo de seres humanos, são encontrados na natureza em quantidades mínimas, tendo, portanto, efeitos biológicos limitados. Eles possuem absorção dependente da forma de extração, armazenamento, efeito biológico dependente da concentração sérica de subprodutos, talvez esses fatos estejam relacionados com a falta de ação do suco isolado na aterosclerose. Assim, futuras formulações galênicas com associação de doses efetivas de flavonóides, como acontece com a hesperidina e a diosmina, amplamente usadas como antiedematosas e recuperadoras da fragilidade capilar na formulação comercial DAFLON®.

Assim, após os testes em animais e, posteriormente, em seres humanos foi comprovado o efeito biológico que pode representar importante tratamento coadjuvante adicional da aterosclerose.

6 CONCLUSÕES

O suco de laranja, ao ser acrescentado ao tratamento convencional de dislipidemias, resultou em:

1. Diminuição da quantidade e da área de LDL(ox) quando comparadas ao tratamento convencional.
2. Redução das áreas de lesões ateroscleróticas quando comparadas ao tratamento convencional
3. Diminuição de alpha 1 actina, quando comparada ao tratamento convencional
4. Redução do colesterol total plasmático quando do uso associado de genfibrozila.

7 REFERÊNCIAS

1. LaRosa JC, He J, Vuppiuturi S. Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA*. 1999; 282:2340-6.
2. Bates TR, Connaughton VM, Watts GF. Non-adherence to statin therapy: a major challenge for preventive. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10:2973-85.
3. Scadinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomized trial cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. *Lancet*. 1994; 344:1383-9.
4. Sheperd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillopp JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastation in men with hypercholesterolemia. West Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*. 1995; 333:1301-13.
5. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM. Primary prevention of acute coronary events with lovastation in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherocherosis Prevention Study. *JAMA*. 1998; 279:1615-22.
6. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, Crowe T, Howard G, Cooper CJ, Brodie B, Grines CL, DeMaria AN. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2004; 291:1071-80.

7. Lemos JA de, Blazing MA, Wiviott SD, Lewis EF, Fox KA, White HD, Rouleau JL, Pedersen TR, Gardner LH, Mukherjee R, Ramsey KE, Palmisano J, Bilheimer DW, Pfeffer MA, Calif RM, Braunwald E. Early intensive vs a delayed conservative simvastatin strategy in patients with acute coronary syndromes: phase Z of the A to Z trial. *JAMA*. 2004; 292:1307-16.
8. Libby P, Lee RT. Matrix matters. *Circulation*. 2000; 102:1874-6.
9. Gabbiani G, Kocher O, Bloom WS, Vandekerckhove J, Weber K. Actin expression in smooth muscle cells of rat aortic intimal thickening, human atheromatous plaque, and cultured rat aortic media. *J Clin Invest*. 1984; 73(1):148-52.
10. Kim D, Lee CW. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2004;44(4):253-73.
11. Kim HK, Jeong TS, Lee MK, Park YB, Choi MS. Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clin Chim Acta*. 2003; 327:129-137.
12. Borradaile NM, Carroll KK, Kurowska EM. Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. *Lipids*, 1999; 34:591-8.
13. Alimentos funcionais: o maravilhoso mundo dos nutracêuticos. *Aditivos e Ingrediente*. 2001;14:38-56.
14. Lee SH, Jeong TS, Park YB, Kwon YK, Choi MS, Bok SH. Hypocholesterolemic effect of hesperetin mediated by inhibition of 3-

- methylglutaril coenzyme A reductase and acyl coenzyme A: cholesterol diet. *Nutr Res.* 1999; 19:1245-58.
15. Ameer B, Weintraub RA, Johson JV, Yost RA, Rouseff RL. Flavone absorption after naringin, hesperidin and citrus administration. *Clin Pharmacol Ther.* 1996; 60:34-40.
 16. Harbone JB, Williams CA. Advances in flavonoids since 1992. *Phytochemistry.* 2000; 55:481-504.
 17. Kurowska E, Spence JD, Jordan J, Wetmore S, Freeman DJ, Piché LA, Serratore P. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72:1095-100.
 18. Hollman PCH, Katan MB. Absorption metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother.* 1997; 51:305-10.
 19. Yamada M, Tanabe F, Arai N, Mitsuzumi H, Miwa Y, Kubota M, Chaem H, Kibata M. Bioavailability of glucosyl heperidim in rats. *Biosc Biotechnol Biochem.* 2006; 70:1386-94.
 20. Hollman PCH, Katan MB. Dietary flavonoids intake health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol.* 1999; 37:937-42.
 21. Tapiero H, Tew KD, Ba GN, Mathé G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother.* 2002; 56: 200-7.
 22. Kurowska EM, Manthey JA. Hypolipidemic effects and absorption of citrus polymethoxyl ated flavones in hamster with diet induced hypercholesterolemia. *J Agric Food Chem.* 2004; 52:2879-86.

23. Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr.* 2004, 134:3479S-3485S.
24. Montforte MT, Trovato A, Kirjavainen S, Forestieri AM, Galati EM, Lo Curto RB. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid (note II): hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Farmacol.* 1995; 50:595-9.
25. Brouwer IA, van Dusseldorp M, West CE, Meyboom S, Thomas CM, Duran M, van het Hof KH, Eskes TK, Hauwvast JG, Steegers-Theunissen RP. Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in human in a dietary. *J Nutr.* 1999; 333:313-5.
26. Colm GH, Mac Grath LT, Young SI, Johnston DG. The effect on endothelial function of vitamin C during methionine induced hyperhomocysteinaemia. *BMC Cardiovasc Disord.* 2001; 1471-507.
27. Carr AC, Frei B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *J Clin Nutr.* 1999;69:1086-107.
28. Gokce N, Keaney JF Jr, Frei B, Holbrook M, Olesiak M, Zachariah BJ, Leeuwenburgh C, Heinecke JW, Vita JA. Long-term ascorbic acid administration reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 1999; 99:3234-40.
29. Moreno CS, Pilar CM, Begoña ALP, Begoña O, Granada F, Martín A. Effect of orange juice intake on vitamin C concentrations and biomarkers of antioxidant status in humans. *Am J Clin Nutr.* 2003;78: 454-60.

30. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000; 52:673-751.
31. Joshipura KJ, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, Colditz G, Ascherio A, Rosner B, Spiegelman D, Willett WC. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med.* 2001; 134:1106-114.
32. Jendeková L, Kojsová S, Andriantsitohaina R, Pechánová O. The time-dependent effects of provinols on brain NO synthase activity in L-NAME-induced hypertension. *Physiol Res.* 2006; suppl 1:S31-S37.
33. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327:524-6.
34. Perez-Vizcaino F, Ibarra M, Cogolludo AL, Duarte J, Zaragoza-Arnaez F, Moreno L, Lopez-Lopez G, Tamargo J. Endothelium-independent vasodilatador effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 302:66-72.
35. Miller FJ Jr, Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Produção de superóxido no músculo liso vascular contribui para o estresse oxidativo e comprometimento do relaxamento na aterosclerose. *Circ Res.* **1998**;82:1298-305.
36. Morawietz H, Weber M, Rueckschloss U, Lauer N, Hacker A, Kojda G. Upregulation of vascular NAD(P)H oxidase subunit gp91phox and impairment of the nitric oxide signal transduction pathway in hypertension. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 285:1130-5.

37. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res.* 2001;88:E14-22.
38. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res.* 2000; 86:E85-E90.
39. Hiramatsu K, Rosen H, Heinecke JW, Wolfbauer G, Chait A. Superoxide initiates oxidation of low density lipoprotein by human monocytes. *Arteriosclerosis.* 1987; 7:55-60.
40. Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals. *FEBS Lett.* 1995; 369:131-5.
41. Korkina LG, Afana'ev IB. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol.* 1997; 38:151-63.
42. Janssen K, Mensink RP, Cox FJ, Arriban JL, Hovenier R, Hollman PC, Katan MB. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and dietary supplement study. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67:255-62.
43. Benavente-Garcia O, Castillo J, Marin FR, Ortuño A, Del Rio J. Uses and properties of Citrus flavonoids. *J Agric Food Chem.* 1997; 45:4505-15.
44. Barter PJ, Ballantyne CM, Carmena R, Castro Cabezas M, Chapman MJ, Couture P, Graaf J, Durrington PN, Faergeman O, Frohlich J, Furberg CD, Gagne C, Haffner SM, Humphries SE, Jungner I, Krauss RM, Kwiterovich P, Marcovina S, Packard CJ, Pearson TA, Reddy KS,

- Rosenson R, Sarrafzadegan N, Sniderman AD, Stalenhoef AF, Stein E, Talmud PJ, Tonkin AM, Waldius G, Williams KM. Apo B versus cholesterol in estimating cardiovascular risk and guiding therapy: report of the thirty-person/ten-country panel. *J Intern Med.* 2006; 259:247-258.
45. Wilcox LJ, Borradaile NM, De Dreu LE, Huff MW. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by flavonoids naringenin and hesperetin via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP *J Lipid Res.* 2001; 42:725-34.
46. Whalley CV, Rankin SM, Hult RS, Jessup W, Leake DS. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein by macrophages. *Biochem Pharmacol.* 1990; 39:1743-50.
47. Charleux JL. Beta-carotene, vitamin C, and vitamin E: the protective micronutrients. *Nutr Rev.* 1996;54:S109-14.
48. Francus T. Mast cell and atherosclerosis. *Przegl Lek.* 2001;58(11):1004-8.
49. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science.* 2001; 292(5519):1160-4.
50. Sacks FM, Pfeffer MA, Moyle LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *N Engl J Med.* 1996; 335:1001-9.
51. Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J, ASCOT Investigators. Prevention of

- coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients Who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial – Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2003; 361:1149-58.
52. Tang WH, Francis GS. Statin treatment for patients with heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2010; 7:249-55.
 53. Fonseca FAH. Farmacocinética das estatinas. *Arq Bras Cardiol*. 2005;85(suppl.5):9-14.
 54. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J. Genfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Eng J Med*. 1999; 341:410-8.
 55. Haim M, Benderly M, Brunner D, Behar S, Graff E, Reicher-Reiss H, Goldbourt U. Elevated serum triglyceride levels and long-term mortality in patients with coronary heart disease: the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Registry. *Circulation*. 1999; 100:475-82.
 56. Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P. Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med*. 1987; 317(20):1237-45.
 57. Keech A, Simes RJ, Barter P, Best J, Scott R, Taskinen MR. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people

- with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet*. 2005; 366(9500):1849-61.
58. Anitschkoff NN, Veränderungen Kaninchen U. Aorta bei experimentelle Cholesterolinsteatose. *Beitr Path Anat*. 1914;56:379-91.
59. Jeong YJ, Choi YJ, Choi JS, Kwon HM, Kang SW, Bae JY, Lee SS, Kang JS, Han SJ, Kang YH. Jeong YJ, Choi YJ, Choi JS, Kwon HM, Kang SW, Bae JY, Lee SS, Kang JS, Han SJ, Kang YH. Attenuation of monocyte adhesion and oxidised LDL uptake in luteolin-treated human endothelial cells exposed to oxidised LDL. *Br J Nutr*. 2007;97(3):447-57.
60. Bok SH, Lee SH, Park YB, Bae KH, Son KH, Jeong TS, Choi MS. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acylCoA:cholesterol-transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J Nutr*. 1999;129:1182-5.
61. Kawaguchi K, Mizuno T, Aida K, Uchino K. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1997;61:102-4.
62. Kunimasa K, Kuranuki S, Matsuura N, Iwasaki N, Ikeda M, Ito A, Sashida Y, Oikawa S. Identification of nobiletin, a polymethoxyflavonoid, as an enhancer of adiponectin secretion. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19(7):2062-4.
63. Mulvihill EE, Huff MW. Antiatherogenic properties of flavonoids: Implications for cardiovascular health. *Can J Cardiol* 2010;26(Suppl. A):17A-21A.

64. Wu CH, Lin JA, Hsieh WC, Yen GC. Low-Density-Lipoprotein (LDL)-bound flavonoids increase the resistance of LDL to oxidation and glycation under pathophysiological concentrations of glucose in vitro. *J Agric Food Chem.* 2009;57(11):5058-64.
65. Han SH, Quon MJ, Kim JA, Koh KK. Adiponectin and cardiovascular disease: response to therapeutic interventions. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(5):531-8.
66. Suh JW, Choi DJ, Chang HJ, Cho YS, Youn TJ, Chae IH, Kim KI, Kim CH, Kim HS, Oh BH, Park YB. HMG-CoA reductase inhibitor improves endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats via down-regulation of caveolin-1 and activation of endothelial nitric oxide synthase. *J Korean Med Sci.* 2010 Jan;25(1):16-23.
67. Hernandez DB. Estudo comparativo dos efeitos da rosuvastatina e atorvastatina nos lipídeos plasmáticos, peroxidação lipídica e função endotelial em coelhos hipercolesterolemicos [Dissertação]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP; 2007.