ANGELA DE OLIVEIRA GODOY ILHA

Fitoesteróis reduzem endotelina-1 em indivíduos moderadamente hipercolesterolêmicos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Endocrinologia

Orientadora: Dra. Ana Maria Pita Lottenberg

SÃO PAULO

2009

Este estudo foi realizado no Laboratório de Investigação Médica (LIM-10) – Laboratório de Lípides da Disciplina de Endocrinologia e Metabolismo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Este projeto foi desenvolvido com Bolsa de Mestrado provenientes da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Luciano e Regina, pelo apoio, amor e compreensão. Ao Ricardo Kley, que foi o meu grande parceiro neste projeto e exemplo de vida que me inspirou a correr atrás dos meus sonhos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Dra. Ana Maria Pita Lottenberg pela grande oportunidade que me foi concedida e pela sua generosidade em compartilhar seu enorme conhecimento e experiência. Obrigada também pelo estímulo nos momentos de desânimo e pela sua amizade durante todos esses anos.

Ao Dr. Éder Carlos Rocha Quintão, Professor Emérito da FMUSP, pela oportunidade de ouvir suas experiências e de acompanhar seu brilhantismo.

À Dra. Edna Regina Nakandakare, Chefe do Laboratório de Lípides, pelo enorme apoio durante este projeto, que foi desde a triagem dos pacientes ao suporte intelectual.

A Dra. Mônica Neves, Médica Endocrinologista do HCFMUSP, pela ajuda na triagem dos pacientes.

A todos os participantes do protocolo pela colaboração e disponibilidade durante as dezesseis semanas de intervenção.

À Valéria Nunes pela boa vontade e pelo auxílio indispensável em toda a parte experimental, análise de dados e finalização deste trabalho.

À Fabiana Ferreira e Renata Bombo pelo suporte na parte metodológica e experimental deste estudo.

Ao Ricardo Giorgi e à Maria Angela Fortes, do Laboratório de Biologia Molecular (LIM-25), pela colaboração na extração e dosagem de RNAm.

À Claudia de Souza, pela dedicação e paciência em nos acudir a todo o momento em que é solicitada.

À Rosibel Silva, por sempre manter nossos materiais de laboratório em ordem e pelo cafezinho sempre quentinho na hora de maior sono.

A todos do Laboratório de Lípides (LIM-10) pelo apoio, parceria e amizade, em especial: Adriana Machado, Débora Rocco, Gabriela Castilho, Patrícia Rios, Rodrigo Iborra, Roberta Nascimento e Vivian Buonacorso.

Ao Luis Carlos e à Fernanda Kley Santos pelo grande incentivo. Aos amigos, que acompanhou e vibrou com cada conquista realizada.

Ao meu querido irmão, André Ilha, que sempre foi amigo, companheiro e conselheiro em todos os momentos da minha vida.

Aos meus mais que amigos: Ana Zaine, Carol Maciel, Edmundo Silva, Erika Rocco, Eva Oselka e Juliana Gropp por todo o apoio emocional. Vocês tornaram essa minha solitária estada em São Paulo muito mais prazerosa e divertida.

Ao meu namorado, Raphael de Souza Pinto, muito obrigado pelo grande amor e carinho, pelo companheirismo tanto nos plantões de laboratório quanto nos momentos de lazer, por escutar as minhas broncas e vibrar com minhas glórias e por acreditar junto comigo que todo esse esforço vale a pena.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro deste trabalho.

À Empresa Unilever Bestfoods, que colaborou com o preparo e o fornecimento do produto aqui utilizado.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABCA-1: *ATP-binding cassette transporter A-1*
- ABCG5: *ATP-binding cassette transporter G5*
- ABCG8: *ATP-binding cassette transporter G8*
- ACAT2: acil-colesterol-acil transferase 2
- Apo.: apolipoproteína(s)
- CETP: *cholesteryl ester transfer protein*
- CT: colesterol total
- DCV: doença cardiovascular
- DP: desvio padrão
- ET: endotelina
- FE: fitoesterol(s)
- HDL: lipoproteína de alta densidade/ *high density lipoprotein*
- HMGCoA : 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
- ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1/ *inter-cellular adhesion molecule-1*
- IDL: lipoproteína de densidade intermediária/ *intermediate-density lipoprotein*
- IL: interleucina
- IMC: índice de massa corporal
- LDL: lipoproteínas de baixa densidade/ *low density lipoprotein*
- LDLoxi: lipoproteínas de baixa densidade oxidada
- MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1/ *monocyte chemoattractant protein*
- NPCL1: *Niemann-Pick C1 Like 1 Protein*
- PCR: proteína C reativa
- QM: quilomícron
- SAA: soro amilóide A
- TG: triglicérides
- TNFα: fator de necrose tumoral alfa
- VCAM-1: molécula de adesão á monócitos-1/ *Human soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1*
- VLDL: lipoproteínas de muito baixa densidade/ *very low density lipoprotein*

RESUMO

Ilha AOG. Fitoesteróis reduzem endotelina-1 em indivíduos moderadamente hipercolesterolêmicos [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

Introdução: Os fitoesteróis são indicados no tratamento da hipercolesterolemia. Embora sua ação sobre a redução do colesterol já tenha sido exaustivamente estudada, não se encontra bem elucidada na literatura, a forma como atua sobre biomarcadores inflamatórios e endoteliais em indivíduos hipercolesterolêmicos. Objetivo: Avaliar o efeito do fitoesterol adicionado ao leite de soja sobre as concentrações plasmáticas de lípides e biomarcadores, além de alterações em vias transcricionais envolvidos na patogênese da aterosclerose em células linfomononucleares em indivíduos moderadamente hipercolesterolêmicos. Metodologia: Foram estudados 38 pacientes, recrutados no Ambulatório do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Inicialmente, os pacientes foram submetidos a um período basal de três semanas para avaliar a aderência e tolerabilidade ao leite de soja padrão (Placebo). Foram orientados a manter os hábitos alimentares e a atividade física. Receberam 400 mL/dia de leite de soja padrão ou enriquecido com fitoesteróis (1,6 g/dia) por dois períodos de quatro semanas em que o estudo foi randomizado, cego e cruzado. Resultados: O peso corporal foi mantido durante o estudo.

O tratamento com fitoesterol reduziu o colesterol total em 5,5 % (P<0,001), a lipoproteína de baixa densidade (LDL) em 6,4 % e os triglicérides em 8,3 % (P<0,05) e aumentaram as concentrações de campesterol e sitosterol no plasma em 18,9% e 21,6%, respectivamente. Não houve alteração nos valores de lipoproteína de alta densidade (HDL). Com relação aos biomarcadores de aterosclerose, os fitoesteróis provocaram redução apenas na endotelina-1 em 11 % (P<0,05). Esta ação foi independente da redução do LDL-C. Não houve alteração no RNAm para 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A redutase e receptor de LDL. Conclusão: Os fitoesteróis são eficientes na redução da concentração plasmática do colesterol total, triglicérides, LDL-C e da endotelina-1, sendo esta última independente da redução do colesterol.

Descritores: 1. Fitosteróis 2. Colesterol 3. Triglicerídeos 4. Endotelina-1 5. Dieta

SUMMARY

Ilha, AOG. Phytosterols decrease endothelin-1 in moderate hypercholesterolemic individuals. [Dissertação]. Faculty of Medical,University of São Paulo, SP (Brazil); 2009.

Background: Phytosterols are recommended in the treatment of moderate hypercholesterolemia. Although their mechanisms of action on cholesterol reduction has been exhaustively studied, other activities, such as their effects on inflammatory arterial markers and on endothelial function, have not yet been fully investigated.

Objective: To evaluate the efficacy of phytosterols added to soy milk on the reduction of plasma lipids, on biomarkers involved in the pathogenesis of atherosclerosis and on transcriptional changes in 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMGCoA) reductase and low density lipoprotein receptor in moderately hypercholesterolemic individuals.

Design: Moderately hypercholesterolemic patients (n=38, mean age 58 y) were initially followed over a 3-wk baseline period to evaluate their adherence to the program and their tolerance to the added milk. Patients received soy milk (400 mL/d) or soy milk + phytosterol (1.6 g/d) for 2 periods of 4-wk each. The study was randomized, blinded and crossed.

Results: Body weight was maintained during the study. Phytosterol treatment reduced the total cholesterol concentration 5.5 % ($P<0.001$), low density lipoprotein (LDL) 6.4 % and triglycerides 8.3 % ($P<0.05$), without modifying

high density lipoprotein (HDL). Phytosterol reduced plasma endothelin-1 by 11 % ($P<0.05$), independently of LDL-C lowering activity. No effects on LDL receptor or on HMGCoA reductase mRNA expression in mononuclear blood cells were found. Sitosterol and campesterol plasma concentrations increased with phytosterol consumption by 18.9% and 21.6%, respectively. Conclusions: Phytosterol effectively lowered plasma total cholesterol, LDL-C, triglycerides and endothelin-1 concentration. The reduction in endothelin-1 concentration was independent of the decrease in the LDL-C concentration.

KEY WORDS: phytosterol, cholesterol, triglycerides, endothelin-1, diet

APÊNDICES

Apêndice 1

A seguir estão apresentados os valores médios individuais das diversas variáveis de acordo com o período estudado.

Peso (Kg), **IMC** (kg/m^2), **Sexo** (F/M), **Idade** (anos).

	Peso			**IMC**			**Idade**	**Sexo**
	Basal	Placebo	Fito	Basal	Placebo	Fito		
AR	58,7	59,3	59,5	26,44	26,71	26,80	68	F
TE	61,6	62	61,7	25,31	25,48	25,35	76	F
MI	64,4	66,1	66	27,15	27,87	27,83	66	F
MR	62	61,8	62,2	25,81	25,72	25,89	63	F
DO	68,1	69,4	68,5	26,94	27,45	27,10	62	F
MA	49,7	50	49,7	24,30	24,45	24,30	77	F
MJ	53,5	52,5	52,5	23,46	23,03	23,03	71	F
IR	75,9	75,4	75,7	27,88	27,70	27,81	70	F
LE	57,8	58,7	58,9	26,39	26,80	26,89	62	F
IS	61,4	63	61,8	25,56	26,22	25,72	63	F
MN	52,3	52,1	52,5	22,05	21,97	22,14	56	F
IM	59,2	60	60,8	24,96	25,30	25,64	77	F
ES	53,5	52,9	55,3	19,65	19,43	20,31	53	F
HE	57,8	57,1	57,5	24,06	23,77	23,93	55	F
ML	52,2	51,8	51,6	22,59	22,42	22,33	61	F
CA	75	75,8	76,5	23,67	23,92	24,14	69	M
OR	65,5	65,5	65,5	25,59	25,59	25,59	66	F
EV	62,5	63,5	63,4	24,72	25,12	25,08	64	F
IP	52,8	51,4	52,5	22,56	21,96	22,43	52	F
MO	67	67,6	67,4	23,74	23,95	23,88	50	F
MC	68	67	66,6	25,91	25,53	25,38	45	F
EM	84,6	85,4	85,4	28,60	28,87	28,87	57	M
MP	70	70,4	69,9	26,67	26,83	26,63	58	F
MM	62	60,4	61	24,22	23,59	23,83	53	F
AD	63,5	64,2	63,4	23,90	24,16	23,86	48	F
AL	54,5	56,4	55,5	24,22	25,07	24,67	76	F
SI	57,9	57,5	57,9	24,73	24,56	24,73	49	F
EL	54,4	56,3	56,4	18,18	18,81	18,84	22	F
RO	82	81,8	81,8	25,88	25,82	25,82	49	M
NI	90,1	89,9	90,7	28,76	28,70	28,95	38	M
EN	70,2	69,1	70	28,12	27,68	28,04	49	F
CE	60,4	60,2	61,2	26,84	26,76	27,20	66	F
NO	59,6	60,2	59,9	25,13	25,38	25,26	61	F
OD	67,1	67,7	67,7	29,43	29,69	29,69	55	F
IO	88	88,7	89,3	28,73	28,96	29,16	61	M
RE	77,4	77,2	77,8	24,99	24,92	25,12	41	M

VA	69	68,4	70	29,09	28,84	29,52	56	F
WA	69.7	71.5	72	25.60	26.26	26.45	43	M

Colesterol Total (mg/dL), **Triglicérides** (mg/dL), **LDL-C** (mg/dL).

	Colesterol Total			**Triglicérides**			**LDL-C**		
	Basal	Placebo	Fito	Basal	Placebo	Fito	Basal	Placebo	Fito
AR	222	316	284	133	254	177	140	219	198
TE	257	257	232	138	127	136	184	184	151
MI	243	252	283	204	207	166	151	169	192
MR	336	337	270	212	293	167	245	228	187
DO	318	321	263	419	183	136	180	240	188
MA	255	275	242	108	118	102	186	207	181
MJ	243	287	255	152	148	130	126	177	148
IR	339	283	283	138	138	125	241	192	194
LE	246	243	249	125	125	155	175	170	146
IS	240	297	227	236	207	202	144	199	144
MN	284	321	287	133	139	111	207	244	211
IM	271	270	311	180	173	180	182	188	213
ES	208	256	251	89	93	99	142	178	173
HE	343	386	345	183	173	127	269	305	266
ML	275	304	269	154	146	131	164	203	158
CA	262	244	228	86	85	89	200	186	169
OR	218	240	222	88	120	107	147	149	143
EV	305	306	320	226	256	235	214	210	228
IP	214	219	214	68	86	59	165	160	157
MO	232	267	241	121	118	73	168	203	184
MC	238	265	245	100	134	113	167	187	174
EM	213	218	222	125	143	84	156	153	168
MP	247	261	262	80	105	67	183	184	211
MM	242	247	198	141	106	159	164	178	118
AD	223	251	226	98	122	152	162	186	160
AL	275	339	276	156	264	157	203	245	216
SI	210	214	195	48	47	58	159	165	134
EL	213	213	220	115	126	128	140	140	145
RO	226	240	227	152	174	233	156	168	141
NI	235	221	200	211	188	175	160	149	135
EN	205	226	246	63	87	87	149	167	180
CE	236	203	220	144	257	116	167	118	158
NO	225	229	222	85	98	105	167	166	157
OD	276	247	246	168	187	153	197	171	174
IO	201	198	221	111	122	178	131	131	138
RE	232	202	204	100	81	115	165	144	136
VA	231	244	204	125	226	146	160	158	135
WA	262	228	198	157	209	127	189	149	139

HDL-C (mg/dL), **IL-6** (pg/mL), **TNFα** (pg/mL), **ET-1** (pg/mL).

	HDL-C			**IL-6**		**TNFα**		**ET-1**	
	Basal	Placebo	Fito	Placebo	Fito	Placebo	Fito	Placebo	Fito
AR	56	46	51	4,03	4,60	1,01	0,98	1,11	0,87
TE	45	48	54	1,40	1,24	2,79	2,15	-	-
MI	52	42	58	-	-	-	-	1,20	1,00
MR	49	51	50	-	-	0,95	0,87	1,54	2,44
DO	54	44	48	2,00	1,56	1,83	1,14	1,57	1,16
MA	47	44	41	2,39	2,38	3,96	3,86	1,67	1,67
MJ	86	81	81	3,10	2,25	1,09	0,67	-	-
IR	70	63	63	1,92	1,67	1,92	1,04	-	-
LE	47	48	71	3,13	1,29	1,15	1,26	1,68	0,94
IS	49	57	42	2,40	1,74	0,70	1,28	1,87	1,66
MN	50	49	54	2,61	2,51	1,36	1,49	1,35	1,50
IM	53	47	61	2,21	2,09	1,76	1,83	1,59	1,45
ES	49	59	58	0,89	0,98	1,27	1,18	1,81	1,23
HE	38	47	53	1,50	1,17	1,14	1,09	1,45	1,32
ML	80	72	85	2,72	2,44	3,41	3,71	0,88	0,85
CA	45	41	41	2,82	3,62	1,44	1,36	1,96	1,62
OR	53	67	57	1,18	0,29	3,52	3,78	1,65	1,29
EV	46	45	45	1,11	1,06	1,53	1,35	0,84	0,81
IP	36	42	45	-	-	1,34	1,51	-	-
MO	39	41	42			1,10	1,08	-	-
MC	51	51	49	2,19	0,95	0,66	1,97	1,63	1,13
EM	32	36	37	2,35	2,85	1,12	1,37	0,84	0,79
MP	48	56	38	6,98	4,12	1,48	1,72	1,14	1,07
MM	49	48	48	1,02	0,86	1,27	1,19	-	-
AD	41	41	35	1,82	2,45	1,24	1,46	-	-
AL	41	42	38	1,28	1,71	1,07	1,08	1,11	0,72
SI	41	40	44	0,17	0,42	3,04	2,13	0,43	0,61
EL	50	48	50	0,95	0,55	1,95	1,47	-	-
RO	40	37	40	0,86	1,39	1,29	1,44	-	-
NI	33	34	30	-	-	-	-	-	-
EN	43	42	49	0,47	0,66	1,05	0,87	-	-
CE	40	33	39	2,47	2,28	1,14	1,07	-	-
NO	41	43	44	0,85	2,18	1,19	1,16	-	-
OD	45	39	41	2,06	1,16	1,10	1,15	-	-
IO	47	42	48	4,19	1,45	1,35	1,54	0,42	0,38
RE	47	42	44	1,22	1,41	0,63	0,83	-	-
VA	46	42	39	1,30	1,47	1,32	1,23	1,27	0,8
WA	42	37	34	1,12	0,74	1,42	1,20	1,02	0,92

VCAM-1 (ng/mL), **PCR** (mg/mL), **SAA** (mg/mL), **Fibrinogênio** (mg/dL).

	VCAM-1		**PCR**		**SAA**		**Fibrinogênio**	
	Placebo	Fito	Placebo	Fito	Placebo	Fito	Placebo	Fito
AR	537	512	0,74	0,57	7,8	6,5	-	-
TE	364	374	1,3	1,61	4,6	5,8	-	-
MI	429	435	8,25	6,5	13,8	9	-	-
MR	263	289	6,88	6,04	8,4	9,1	-	-
DO	356	439	2,18	4,87	7	7,8	-	-
MA	440	477	5,22	1,89	8,1	6,1	-	-
MJ	354	343	1,62	1,99	8,3	9,3	-	-
IR	458	463	1,13	1,61	6,7	8,6	-	-
LE	459	431	3,11	6,64	3	9,5	-	-
IS	345	423	2,13	1,82	-	-	-	-
MN	385	376	0,37	0,23	2,4	1,5	-	-
IM	480	490	1,32	1,45	10,6	10,2	-	-
ES	456	499	6,63	1,4	-	-	-	-
HE	274	275	5,26	5,53	5,2	4,4	-	-
ML	375	364	-	-	-	-	-	-
CA	795	655	5,61	3,2	8,7	5,4	-	-
OR	441	393	2,35	1,35	5,4	5,2	-	-
EV	270	314	0,44	0,38	6	5,4	-	-
IP	355	354	1,32	1,67	4,6	7,5	-	-
MO	536	543	1,31	9,11	2,5	12,5	-	-
MC	525	637	2,08	3,35	7	6,7	-	-
EM	586	607	-	-	-	-	-	-
MP	513	572	7,5	8,36	4,5	10,6	-	-
MM	580	518	0,64	0,54	1,4	1,8	-	-
AD	462	582	3,98	3,18	5,6	5,5	255	318
AL	446	450	2,45	3	7,4	10,4	350	301
SI	596	665	-	-	-	-	-	-
EL	744	700	3,6	5,14	2,4	2,3	276	296
RO	410	399	1,65	1,48	5,4	5,5	-	-
NI	392	433	2,89	2,72	3,8	2,8	284	123
EN	574	592	0,51	0,28	1,6	1,1	218	258
CE	779	666	2,69	0,92	3,9	2,4	269	255
NO	432	344	5,51	2,86	7,4	9	-	-
OD	455	406	1,01	0,82	4,5	3,5	234	187
IO	645	706	1,17	2,97	1,7	5,7	214	168
RE	463	411	5,51	2,86	7,4	9	246	209
VA	391	386	0,33	1,07	4,2	5,8	292	274
WA	437	432	0,94	0,43	3,9	2,6	120	246

Latosterol (µg/mL)**, Campesterol** (µg/mL)**, Sitosterol** (µg/mL)

	Latosterol		**Campesterol**		**Sitosterol**	
	Placebo	Fito	Placebo	Fito	Placebo	Fito
AR	4,262	4,196	3,403	3,993	2,911	3,301
TE	3,045	2,485	3,089	2,946	2,763	2,704
MI	2,860	3,288	3,895	5,716	3,210	4,691
MR	4,859	4,142	3,787	3,957	2,935	3,073
DO	3,902	4,302	3,992	4,071	3,850	4,084
MA	3,160	2,967	5,242	6,269	4,176	5,262
MJ	3,156	4,137	4,840	7,319	3,695	6,152
IR	4,681	4,417	4,551	6,674	3,950	5,541
LE	2,736	2,970	4,832	6,694	4,286	6,231
IS	3,081	2,977	2,806	3,092	2,578	2,895
MN	3,346	4,178	2,838	4,683	2,601	4,027
IM	-	-	-	-	-	-
ES	3,354	2,931	5,760	4,966	3,495	3,739
HE	6,211	5,783	6,802	7,598	5,808	7,095
ML	3,885	4,896	5,420	7,537	4,757	6,893
CA	2,798	3,726	3,896	5,012	3,105	4,380
OR	2,367	3,068	6,064	6,538	5,087	5,572
EV	5,987	5,402	4,930	5,699	4,235	5,063
IP	3,016	4,010	4,506	6,436	3,854	5,821
MO	4,912	4,466	4,300	4,803	3,760	4,487
MC	3,799	3,668	7,952	7,926	5,976	6,069
EM	-	-	-	-	-	-
MP	3,351	3,935	3,681	4,064	3,130	3,332
MM	5,016	4,255	4,392	4,755	3,716	4,297
AD	4,332	5,078	4,995	6,443	4,403	5,645
AL	3,835	4,508	5,126	6,660	4,117	5,385
SI	3,873	3,851	6,736	4,922	5,735	4,440
EL	-	-	5,791	5,309	4,898	4,407
RO	5,672	4,769	4,446	4,988	3,899	4,466
NI	3,961	3,731	3,534	4,082	3,328	3,736
EN	5,987	5,402	4,930	5,699	4,235	5,063
CE	3,799	3,668	7,952	7,926	5,976	6,069
NO	4,502	4,530	3,361	4,271	2,884	3,729
OD	4,688	4,391	3,771	3,615	3,401	3,276
IO	4,168	4,276	3,785	4,766	3,499	4,276
RE	3,714	4,059	7,545	7,975	5,886	6,781
VA	4,061	3,980	4,736	8,036	4,374	6,794
WA	3,381	3,496	7,009	8,526	4,960	5,918

RNAm para HMGCoA redutase, RNAm para receptor de LDL

	RNAm para HMGCoA redutase		RNAm para receptor de LDL	
	Placebo	Fito	Placebo	Fito
AR	0,84	0,78	2,65	1,82
TE	1,3	0,33	1,96	0,64
MI	-	-	-	-
MR	1	0,44	1	0,79
DO	-	-	-	-
MA	-	-	-	-
MJ	0,39	0,46	1,85	0,6
IR	-	-	-	-
LE	-	-	-	-
IS	1,17	1,07	0,19	0,29
MN	3,89	0,65	0,38	0,87
IM	0,13	1,77	0,59	1,45
ES	0,58	1,03	0,89	0,28
HE	-	-	-	-
ML	3,3	1,15	0,32	0,21
CA	-	-	-	-
OR	-	-	-	-
EV	0,91	0,67	1,06	0,89
IP	1,13	2,41	0,67	1,76
MO	-	-	-	-
MC	0,55	1,07	3,98	1,03
EM	-	-	-	-
MP	0,22	1,24	2,26	5
MM	1,73	1,1	1,66	0,8
AD	0,64	0,58	1,18	3,46
AL	0,66	1,09	1,2	2,44
SI	-	-	-	-
EL	-	-	-	-
RO	0,65	0,48	0,43	0,5
NI	0,77	3,46	0,61	2,55
EN	-	-	-	-
CE	1,55	0,83	0,77	6,68
NO	-	-	-	-
OD	0,79	0,67	0,68	0,81
IO	0,85	0,67	0,94	0,74
RE	-	-	-	-
VA	-	-	-	-
WA	-	-	-	-

SUMÁRIO

Listas de abreviaturas e siglas
Resumo
Summary

1. INTRODUÇÃO 1
   1.1 Metabolismo das lipoproteínas 2
   1.2 Aterosclerose e inflamação 5
   1.3 Disfunção endotelial 8
   1.4 Fatores alimentares e inflamação 13
   1.5 Absorção de colesterol 15
   1.6 Ações dos fitoesteróis 16
2. OBJETIVO 23
3. MATERIAIS E MÉTODOS 24
   3.1. Triagem dos pacientes 24
   3.2. Casuística 24
   3.3. Comitê de ética 25
   3.4. Especificação do produto lácteo à base de soja 25
   3.5. Protocolo experimental 26
   3.6. Coleta de sangue 27
   3.7. Dosagens bioquímicas 28
   3.8. Extração do RNAm e PCR em tempo real 29
   3.9. Análise estatística 30
4. RESULTADOS 32
5. DISCUSSÃO 38
6. CONCLUSÕES 47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 48

Apêndices

1. INTRODUÇÃO

A importância do colesterol no plasma foi evidenciada nos diversos estudos epidemiológicos que mostraram correlação entre a sua concentração no plasma e eventos cardiovasculares (Cui et al., 2007; Murray e Lopez, 1997; Libby, 2002; Kuller, 2000), representando, juntamente com o fumo, hipertensão arterial e diabetes mellitus (DM), um dos seus principais fatores de risco (Wilson et al., 1998). A aterotrombose é considerada a principal causa de morte na população mundial (52 %), superando o câncer (24 %) e as doenças infecciosas (19 %) (Guilbert, 2001). Condutas terapêuticas com o objetivo de reduzir e tratar fatores de risco, especialmente a hipercolesterolemia, culminaram na diminuição significativa da mortalidade por doença cardiovascular (DCV) em diversos países (Menotti et al., 2007). Os inibidores de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMGCoA) redutase, denominados estatinas são as drogas mais frequentemente utilizadas no tratamento de hipercolesterolemia (The Scandinavian Simvastatin Survival Study, 1994; Nissen et al., 2005; Jacobson, 2006). Outras estratégias, entretanto, também podem ser utilizadas, como a administração do ezetimibe, droga que age na redução da absorção do colesterol (Bays et al., 2008), ou o consumo de alimentos enriquecidos com fitoesterol (FE) (Katan et al., 2003).

A concentração plasmática de colesterol desempenha papel central na gênese da aterosclerose, processo que se inicia com a retenção, agregação

e modificação das partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na camada íntima (Skålén et al., 2002).

1.1 Metabolismo das lipoproteínas

As lipoproteínas são responsáveis pelo transporte de lípides na linfa e no plasma, e são compostas no seu interior por triglicérides e colesterol éster e na superfície por colesterol livre, fosfolípides e apolipoproteínas. Podem ser classificadas em função de sua migração eletroforética, tamanho das partículas, ou mesmo de acordo com a sua densidade, em quilomícrons (QM), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), LDL e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Zilversmit, 1979).

Os QM são sintetizados pelas células intestinais e são responsáveis pelo transporte dos lípides da linfa para a circulação sanguínea (Redgrave, 1983). As VLDL são secretadas pelo fígado, e responsáveis pelo transporte dos triglicérides (TG) de origem endógena. Os TG, tanto dos QM quanto das VLDL, são hidrolisados pela lipoproteína lipase, enzima localizada no endotélio dos capilares dos tecidos extra-hepáticos e pela lipase hepática. Neste processo são liberados ácidos graxos que serão armazenados no tecido adiposo e, utilizados nos tecido para produção de energia e glicerol que retorna ao fígado (Gotto et al., 1986). A metabolização das VLDL e QM resulta, respectivamente, na formação de lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e remanescentes de QM, partículas com baixa concentração de TG e enriquecidas com colesterol ester, que são rapidamente captadas pelo fígado (Redgrave, 1983; Mahley e Huang, 2007).

As LDL são responsáveis pelo transporte da maior parte do colesterol da circulação, e diversos estudos epidemiológicos mostram correlação positiva entre a sua concentração plasmática e doença coronariana (Kannel et al.,1979). As HDL participam do transporte reverso de colesterol, processo responsável pela retirada de colesterol da parede da artéria, direcionando-o ao fígado. Além disso, diminuem a proliferação das células musculares lisas e a oxidação das LDL, bem como a transformação dos macrófagos em células espumosas na parede arterial (Banka, 1996; Barter et al., 2004). As HDL também apresentam funções anti-inflamatórias, como a inibição de moléculas de adesão à monócitos (VCAM-1), molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1) e E-selectina, além de modularem a expressão de fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) e Interleucinas (IL) e de seus respectivos receptores (Norata e Catapano, 2005). Em função das suas propriedades antiaterogênicas e anti-inflamatórias, relacionam-se inversamente com eventos cardiovasculares (Gordon et al., 1989).

As apolipoproteínas têm como principais funções direcionar as lipoproteínas aos seus respectivos receptores, além de solubilizar os lípides e modular enzimas. Diversos receptores participam do reconhecimento das lipoproteínas plasmáticas, destacando-se o receptor B/E, que é definido como uma glicoproteína presente na superfície das células e que desempenha importante papel na homeostase do colesterol, por meio do reconhecimento das lipoproteínas que contêm apo B e E (Goldstein e Brown, 2009). Diversas mutações neste receptor já foram descritas em portadores

de hipercolesterolemia familiar, alterações que diminuem a captação das partículas de LDL (Gylling et al., 1989; Gylling et al., 1995).

A apolipoproteína (apo) B-48 é sintetizada na mucosa do intestino e, após ser complexada aos triglicérides alimentares e ao colesterol livre originados do lúmen intestinal, participa da formação de quilomícrons. É responsável pelo reconhecimento a receptores B/E e pela captação dos remanescentes de quilomícrons (Walldius e Jungner, 2004). A apo B-100, sintetizada no fígado, é fundamental para a produção das partículas de VLDL e faz o reconhecimento de receptores B/E presentes no fígado, adrenal e gônadas (Brown et al., 1981). Em razão de cada partícula VLDL e LDL possuir apenas uma molécula de apo B, e pelo fato de VLDL e LDL constituírem as principais frações contendo apo B-100, a concentração desta proteína reflete a quantidade de lipoproteínas potencialmente aterogênicas presentes no plasma (Elovson et al., 1988). A concentração de apo B-48, associada à hiperlipidemia pós-prandial, não foi relacionada à DCV (Valero et al., 2005). No entanto, pelo fato de as apo B-100 inibirem o sistema fibrinolítico e estimularem a produção de citocinas pró-inflamatórias, foram associadas ao aumento do risco de aterotrombose (Barter et al., 2006).

A apo E interage com dois tipos diferentes de receptores, participando da captação celular tanto de remanescentes de QM quanto das LDL (Shelburne et al., 1980; Innerarity et al., 1979). A apo C, presente em QM e VLDL, modula a atividade da lipoproteína lipase, participando do metabolismo de TG no plasma (Jong et al.,1999). A apo A está presente nas HDL e apresenta-se em duas formas principais: A-I e A-II. A apo A-I é ligante

para o *ATP-binding cassette transporter-A1* (ABCA-1), transportador envolvido no efluxo de colesterol de tecidos periféricos, no início do transporte reverso de colesterol. Já a apo A-II demonstrou-se capaz de inibir a atividade da lipase hepática lipoproteica, sendo debatida sua atividade na atersoclerose (Walldius et al., 2004).

1.2 Aterosclerose e inflamação

A hipercolesterolemia induz interações fisiopatológicas na parede arterial, culminando com a liberação de componentes inflamatórios, os quais agravam a aterosclerose. Há evidências de que a redução do LDL e o aumento do HDL possuem efeitos benéficos nos processos inflamatórios e podem contribuir para menor incidência de eventos cardiovasculares (Kuvin E Karas, 2003). Enquanto a LDL ativa a cascata inflamatória, o HDL neutraliza lipolissacaridases e endotoxinas, que minimizam a ação do TNFα, inibem a ativação de complemento e reduzem a indução de citocinas por meio das moléculas de adesão e infiltração de macrófagos em animais (Shah et al., 2001; Cockerill et al., 1995).

Diversas investigações têm sido realizadas com a finalidade de identificar e validar novos fatores de risco, denominados de biomarcadores, vislumbrando a ampliação de estratégias de prevenção da DCV. Têm sido identificados possíveis marcadores de inflamação e aterosclerose subclínica, na tentativa de elucidar a sua ação como preditores da DCV (Arant et al., 2009).

Células do sistema imune dominam inicialmente a lesão aterosclerótica e aceleram a progressão e ativação dos processos inflamatórios (Hansson, 2005). Há uma conexão direta entre oxidação de lípides, agregação das plaquetas e inflamação (Kuvin e Karas, 2003). A hipercolesterolemia é a principal causa da formação das LDL oxidadas, o que induz a expressão das moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios (Li et al., 1993). A captação das LDL modificadas resulta na formação das "foam cells" enriquecidas de colesterol-éster no espaço subendotelial (Takahashi et al., 2002) (Figura 1).

A hipercolesterolemia induz o aumento da produção de VCAM-1, moléculas envolvidas na adesão de monócitos e linfócitos na superfície do endotélio das artérias de animais (Li et al., 1993), via produção da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), importante fator quimiotático da parede da artéria (Introma e Mantovani, 1997). O aumento de VCAM-1 está associado com o desenvolvimento de DCV independentemente da presença de outros fatores de risco (Shai et al., 2006).

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda produzida pelo hepatócito e regulada por citocinas, como a IL-6, IL-1 e TNFα (Figura 1). É rapidamente liberada no plasma em decorrência de inflamação, infecção e estresse não-fisiológico e possui meia vida de 24 horas após o término destes estímulos (Casas et al., 2008). Estudos apontam a PCR como preditor independente para risco de eventos cardiovasculares (Shimada et al., 2009; Ridker et al., 2007). A PCR induz a expressão de MCP-1, resultando no aumento da transmigração dos leucócitos (Pasceri et

al., 2001), além de facilitar a captação de LDL pelos macrófagos (Zwaka et al., 2001).

A IL-6 é uma citocina produzida por diversos tipos celulares, incluindo fagócitos mononucleares ativados, células endoteliais, fibroblastos e principalmente adipócitos (Papanicolaou e Vgontazas, 2000). Como maior indutor das proteínas de fase aguda do processo inflamatório, induz a sinalização hepática para a produção de PCR. Sua síntese pode ser estimulada por outras citocinas, como: TNFα e IL-1 (Heinrich et al., 1990). Estudo prospectivo constatou associação entre alta concentração de PCR, IL-6 e fibrinogênio com incidência de morte por infarto do miocárdio (Luc et al, 2003). A IL-6 diminui a capacidade da insulina em estimular a óxido nítrico sintase, que é responsável pela vasodilatação induzida pelas células endoteliais (Andreozzi et al., 2007). Podem ainda restringir o depósito de lípides no interior do adipócito pelo fato de diminuírem a atividade da lipoproteína lipase (Trujillo et al., 2004). O aumento de IL-6 e TNFα no plasma foi associado à maior incidência de resistência à insulina, sendo preditor independente para o DM tipo 2 (Kern et al., 2001).

O TNFα é uma citocina inflamatória produzida principalmente por fagócitos mononucleares ativados que estimulam o recrutamento de neutrófilos e de monócitos para sítios de infecção por aumentarem a expressão de novas moléculas de adesão, a produção de quimiocinas e a promoção de apoptose de células-alvo (Brandley, 2008). O aumento da produção de TNFα pode provocar trombose intravascular, choque séptico e tem sido implicado como importante mediador de resistência à insulina. O

RNAm de TNFα é expresso no tecido adiposo abdominal em vários modelos genéticos de resistência à insulina (Xu et al., 2002).

Os eventos cardiovasculares estão associados também com disfunção endotelial, condição que exibe manifestações sistêmicas associadas com morbidade e mortalidade (Lerman e Zeiher, 2005). Estudo recente mostrou que o processo inflamatório está associado à disfunção endotelial em crianças portadoras de hipercolesterolemia familiar (Charakida et al., 2009).

1.3 Disfunção endotelial

O endotélio é uma camada única e contínua de células, estrategicamente localizado, separando a parede vascular dos componentes do sangue e teria como função primordial a regulação do tônus, crescimento, trombogenicidade e inflamação vascular (Lerman e Zeiher, 2005). Observou-se que o endotélio vascular é responsável pela síntese de componentes vasoconstritores (Hickey et al., 1985). Em seguida, foi isolada uma substância sequenciada de cultura de células endoteliais denominada endotelina (ET) (Yanagisawa et al., 1988). As endotelinas são compostos de peptídeos contendo 21 aminoácidos (ET-1, ET-2 e ET-3) que diferem na sua estrutura em alguns aminoácidos (Inoue et al., 1989), os quais interagem com dois subtipos de receptores (ETA e ETB) (Arai et al., 1990; Sakurai et al.,1990).

Entre as endotelinas, a ET-1 exibe o maior potencial vasoconstritor em comparação às demais (Inoue et al., 1989); ela é sintetizada a partir de um precursor inativo denominado pré-pro-ET, que posteriormente forma as “big

ET-1" (Denault et al., 1995); estas sofrem a ação das metaloproteases (ET-converting enzyme), originando a ET-1 (Opgenorth et al., 1992; Xu et al., 1994). ET-1 é sintetizada rapidamente em resposta a estímulos, tais como hormônios vasoativos, fatores de crescimento, hipóxia, "shear stress", radicais livres, endotoxinas e ciclosporina (Agapitov e Haynes, 2002). Além disso, a elevação da colesterolemia da LDL (Prasad et a., 2009) e das LDL oxidadas (Boulanger et al., 1992) está envolvida na modulação da concentração de ET-1 no plasma (Figura 1). A síntese de ET-1 é inibida pela ação de óxido nítrico, nitrovasodilatadores, peptídios natriuréticos, heparina e prostaglandinas (Agapitov e Haynes, 2002). Demonstrou-se, em humanos, que pro-ET-1 e ET-1 maduras encontram-se elevadas no plasma durante infecções sistêmicas e estão correlacionadas com alto risco de mortalidade (Goldie e Henry, 1999; Tschaikowsky et al., 2000; Schuetz et al., 2008; Wanecek et al., 2000).

A ET-1 poderá ter ação vasodilatadora ou vasoconstritora, dependendo do seu subtipo e da interação com seus diferentes receptores (ETA ou ETB) (Tostes et al.,2008). Estudos com bloqueadores de receptor ETA observaram a diminuição do efeito vasoconstritor da ET-1 em humanos (Cardillo et al., 2000) e a diminuição da formação de células espumosas em animais (Kowala et al., 1995).

Diferenciando-se da ET-1 apenas pela presença de dois aminoácidos, a ET-2 é também um potente vasoconstritor e tem sido detectada em células do sistema cardiovascular. A ET-3, com concentrações fisiológicas menores

ou sem afinidade para o receptor ETA, é detectada no plasma, coração, cérebro e glândulas adrenais (Tostes et al., 2008).

A ET-1 está envolvida também na fisiopatologia de outras doenças como a doença renal crônica e cérebro-vascular, sepse, hipertensão arterial pulmonar, colites ulcerativas, glaucoma, asma, entre outras patologias (Shah, 2007).

A endotelina pode contribuir para o aparecimento prematuro da aterosclerose por induzir disfunção endotelial em pacientes hipercolesterolêmicos (Bousette e Giaid, 2003). O aumento da ET-1 no plasma (Cardillo et al., 2000) e na coronária (Lerman et al., 1995) em humanos, está associado com a elevação do colesterol sérico. A LDL oxidada induz a expressão tanto do RNAm quanto da proteína de ET-1 (Boulanger et al., 1992). Além da sua ação vasoconstritora, a ET-1 também estimula a proliferação de células musculares lisas (Jing et al., 1998). Desta forma, diversas ações foram atribuídas à endotelina, como propriedades inotrópicas, quimiotáticas e mitogênicas (Figura 1). Exerce influência também sobre a homeostase de sal e água, por meio de efeitos nos sistemas renina-angiotensina, vasopressina, peptídeo atrial natriurético e estímulo no sistema nervoso simpático (Agapitov et al., 2002). Por todas estas ações, a sua concentração no plasma relaciona-se com aterosclerose, disfunção endotelial, hipertensão arterial e eventos cardiovasculares (Shah, 2007).

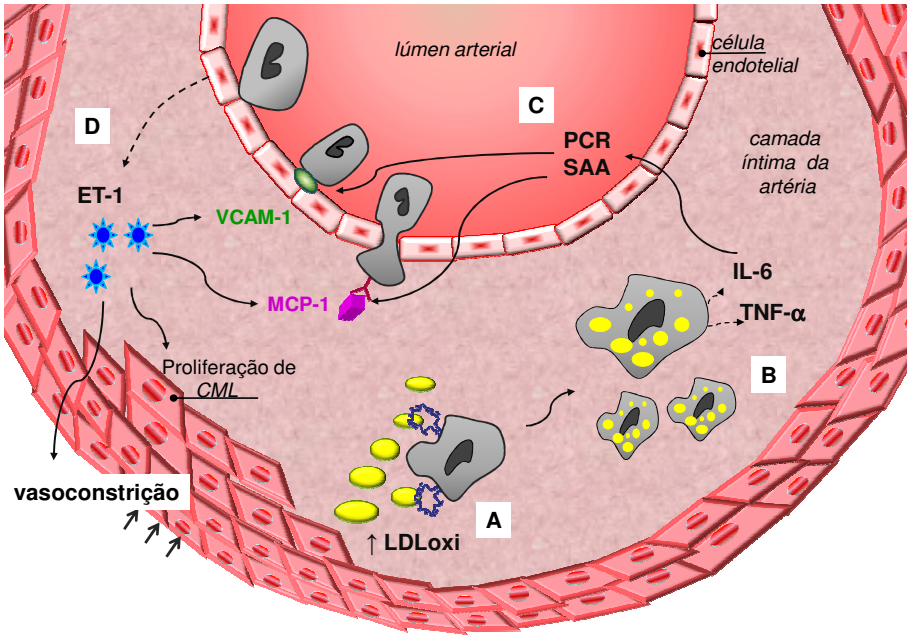

Figura 1- Interação dos biomarcadores na hipercolesterolemia: A- Aumento da concentração das LDLoxi e maior captação de macrófagos na camada íntima da artéria; B- Formação das células espumosas e conseqüente aumento da liberação de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF-α), que estimulam a produção de proteínas de fase aguda (PCR e SAA); C- PCR e SAA estimulam VCAM-1 e MCP-1; D- O aumento das LDLoxi estimula a liberação de ET-1 pelas células endotelias, que por sua vez, estimula a produção de VCAM-1 e MCP-1, promove a proliferação de CML e a vasoconstrição.
Abreviaturas: CML (célula muscular lisa), ET-1 (endotelina-1), IL-6 (interleucina-6), LDLoxi (lipoproteína de baixa densidade oxidada), MCP-1 (proteína quimiotática de monócito-1), PCR (proteína C reativa), SAA (soro amilóide A), TNF-α (Fator de necrose tumoral-alfa), VCAM-1 (molécula de adesão à monócito-1)

Outro importante biomarcador para aterosclerose é o fibrinogênio, proteína de fase aguda, relacionada à atividade de coagulação, que desencadeia reações envolvidas com a formação inicial e avançada da placa aterosclerótica (Fatah et al.,1992; Kannel, 2005). Diminui fibrinólise devido ao aumento da densidade do coágulo e aumenta a agregação plaquetária e a viscosidade do plasma (Tracy, 2003). Elevações das concentrações

plasmáticas de fibrinogênio estão associadas com a progressão de aterosclerose de carótida (Sabeti et al., 2005). A sua associação com os lípides plasmáticos já foi evidenciada no “Northwick Park Heart Study”, estudo prospectivo que mostrou correlação entre colesterolemia, trigliceridemia, fator VII e fibrinogênio (Meade et al., 1986)

Diversos fatores demográficos e ambientais influenciam as concentrações plasmáticas de fibrinogênio, como dieta, medicamentos, idade, fumo, álcool, peso corporal, sexo e exercício físico (de Maat, 2001), entretanto, estudos sugerem que 30 a 50 % das concentrações de fibrinogênio são determinadas geneticamente (Hamsten et al., 1987; Humphries et al., 1987).

Estudo populacional constatou que mulheres submetidas à angiografia coronariana por suspeita de isquemia, possuíam também concentração aumentada de soro amilóide A (SAA) (Arant et al., 2009). O SAA, sintetizado no fígado, induz a produção de IL-1, IL-8 e TNF-α por neutrófilos, linfócitos e monócitos, além de estimular a produção de moléculas de adesão e quimiotáticas de monócitos (Song et al., 2009). Depósitos dessa proteína de fase aguda têm sido encontrados em lesões ateroscleróticas (Maier et al., 2005) e em macrófagos ativados (Ray et al., 1999). O SAA é um mediador pró-trombótico e pró-inflamatório em síndrome coronariana aguda, sendo fortemente associado à aterogênese e suas complicações (Song et al., 2009).

1.4 Fatores alimentares e inflamação

Em razão da importância dos processos inflamatórios no desenvolvimento da aterosclerose, diversas pesquisas vêm sendo conduzidas, com a finalidade de identificar suas possíveis causas, entre elas a ação de nutrientes que possam estar envolvidos tanto na inflamação como na função endotelial. Várias evidências demonstram que dieta rica em gordura associa-se fortemente com inflamação crônica, resistência à insulina e obesidade. Por exemplo, demonstrou-se que o alto consumo de gordura elevou a concentração plasmática de VCAM-1, sendo este efeito mais exacerbado em diabéticos (Nappo et al., 2002). O alto consumo de lípides aumentou a expressão de TNFα no músculo, o que causou resistência à insulina por mecanismos autócrinos (Borst e Conover, 2005). Por outro lado, a dieta do Mediterrâneo, com quantidades adequadas de gordura, ameniza o ambiente pró-inflamatório induzido por LDL modificado em células endoteliais, com reduções de VCAM-1 e E-selectina (Bellido et al., 2006).

Em pacientes com sobrepeso foi constatada correlação positiva da IL-6 com ácidos graxos saturados, e negativa com poli-insaturados (W-6) (Fernández-Real et al., 2003). Com o consumo de dietas ricas em gordura saturada e gordura trans, observou-se aumento de IL-6, PCR, fibrinogênio e E-selectina em homens saudáveis (Baer et al., 2004). A produção de IL-6 e TNFα foi maior em pacientes moderadamente hipercolesterolêmicos com o consumo de ácidos graxos trans, quando comparado ao consumo de gordura poli-insaturada (Han et al., 2002).

Além da ação dos ácidos graxos sobre marcadores inflamatórios, vem sendo avaliada a ação de outros componentes alimentares. Um estudo observacional, baseado em inquérito alimentar, relacionou dieta rica em fibras com menor concentração plasmática de IL-6 e receptor-2 de TNFα (Ma et al., 2008). A suplementação de colesterol na dieta de coelhos provocou aumento da atividade da "Endothelin-converting enzyme", enzima envolvida na formação da ET-1, e de concentrações deste peptídeo na parede vascular e no plasma (Mitani et al., 2000).

Há poucos estudos com relação à ação da dieta sobre o fibrinogênio. Parece que os ácidos graxos ômega-3 resultam em reduções modestas no fibrinogênio plasmático (de Maat, 2001).

Desde 1957, a partir do estudo publicado por Keys e Grande (1957), sabe-se que populações cujo consumo de gordura excede 30% das calorias da dieta apresentam maior incidência de aterosclerose. Posteriormente, foi demonstrado que o excesso de colesterol alimentar provoca elevação da colesterolemia, aumentando, assim, a incidência de aterosclerose (Connor et al., 1961; Connor, 1961).

Atualmente, sabe-se que a dieta contribui pouco na totalidade do colesterol presente no lúmen intestinal, sendo a bile a sua principal fonte: o consumo de colesterol é de aproximadamente 300 mg/dia, enquanto a bile direciona aproximadamente 800-1200 mg/dia ao intestino (Mok et al., 1979), razão pela qual o colesterol alimentar exerce menor influência sobre a colesterolemia (Gylling e Miettinen,1992). Comparativamente, os ácidos

graxos, especialmente os saturados e trans, exercem o maior efeito no aumento do colesterol plasmático (Kromhout et al., 1995).

1.5 Absorção de colesterol

O colesterol alimentar é transportado até as células da mucosa intestinal por meio de micelas, estruturas compostas por ácidos biliares, ácidos graxos, diglicerídeos, monoglicerídeos, fosfolípides, colesterol, fitoesteróis e vitaminas lipossolúveis (Figura 3) (Law, 2000). A maior parte do colesterol alimentar encontra-se na forma livre, sendo esta preferencialmente absorvido em relação ao colesterol éster, em razão de sua melhor solubilidade na micela (Compassi et al., 1995). Já os ácidos biliares são fundamentais no processo da sua absorção intestinal e do seu transporte para a linfa (Siperstein et al., 1952).

O mecanismo molecular da absorção dos esteróis não se encontra totalmente elucidado até o momento (Patel e Thompson, 2006). A Niemann-Pick C1 Like 1 Protein (NPC1L1) é a principal proteína na membrana da borda em escova responsável pela captação desses esteróis (Altmann et al., 2004). No interior do enterócito, a maior parte do colesterol é esterificada pela enzima acil-colesterol-acil transferase 2 (ACAT2) e, posteriormente, incorporada aos quilomícrons na membrana basolateral, culminando na secreção dessas partículas para o sistema linfático. Uma pequena quantidade de colesterol não-esterificado retorna para o lúmen intestinal por meio de transportadores específicos, denominados ATP-binding cassette

transporter G5 (ABCG5) e ATP-binding cassette transporter G8 (ABCG8) (Figura 4) (Yu et al., 2002).

A eficiência da absorção do colesterol pode variar de 24 a 74 % devido à influência genética. Os polimorfismos de apo E influenciam a resposta de lípides e lipoproteínas por meio de interações com a dieta e os medicamentos. Os mecanismos pelos quais a apo E influencia essa variabilidade são controversos. Evidências demonstram que a presença de apo E4 favorece a absorção intestinal de colesterol, aumentando o seu conteúdo no fígado e reduzindo a síntese do receptor B/E. Já na presença de apo E2 ocorreria o oposto, ou seja, há menor absorção de colesterol no intestino, o que estimula a síntese de receptores B/E (Gylling e Miettinen, 1992).

1.6 Ações dos fitoesteróis

A absorção do colesterol pode ser influenciada pelos FE, definidos como moléculas de origem vegetal com estrutura funcional similar ao colesterol (Ostlund, 2002), presentes em pequenas quantidades em vegetais, como milho, soja e semente de girassol (Weihrauch et al., 1978)

Os FE apresentam uma dupla ligação na posição 5 e são classificados em esteróis e estanóis. Este último é produzido artificialmente por hidrogenação do esterol (Law, 2000). O β-Sitosterol é o mais abundante nos alimentos, seguido do Campesterol e Stigmasterol (Ostlund, 2002). Estruturalmente, os FE diferem do colesterol por possuírem adicionalmente

um grupamento etila ou metila na cadeia do carbono 24 (Von Bergmann et al., 2005) (Figura 2).

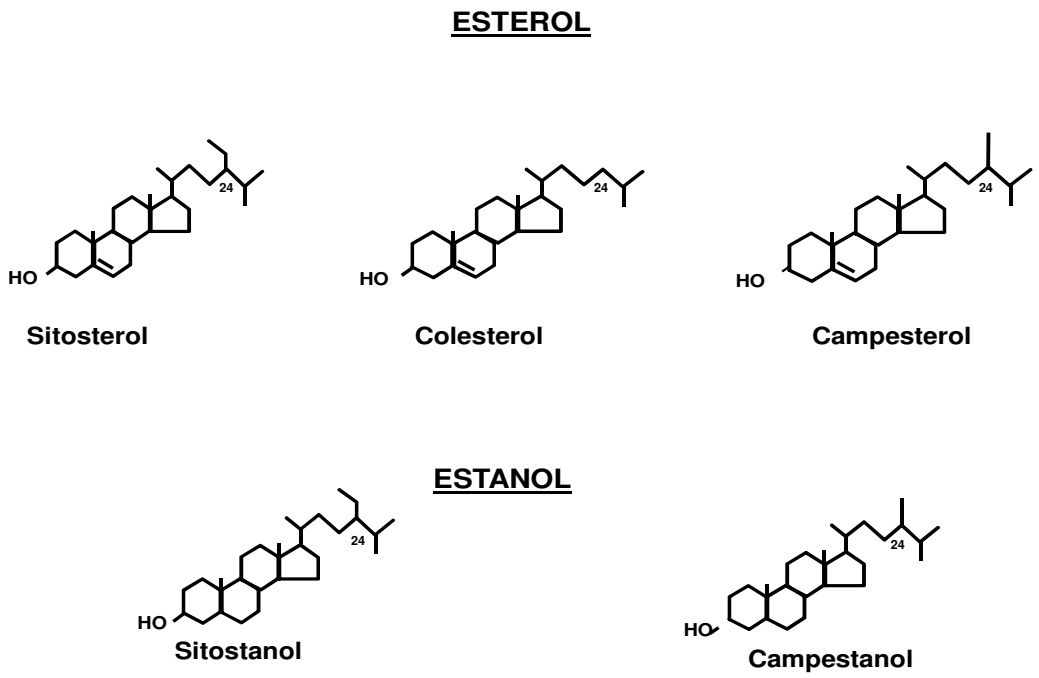

Figura 2 - Estrutura química dos principais esteróis e estanóis

Os FE são mais hidrofóbicos e possuem grande afinidade físico-química pela micela em relação ao colesterol, favorecendo a maior permanência em seu interior. Por este motivo, deslocam colesterol para fora da micela, aumentando a sua excreção nas fezes (Figura 3) (Ikeda et al., 1988. Esta ação parece ser independente da quantidade de colesterol ingerida, conforme demonstrado em pacientes hipercolesterolêmicos (Kassis et al., 2008).

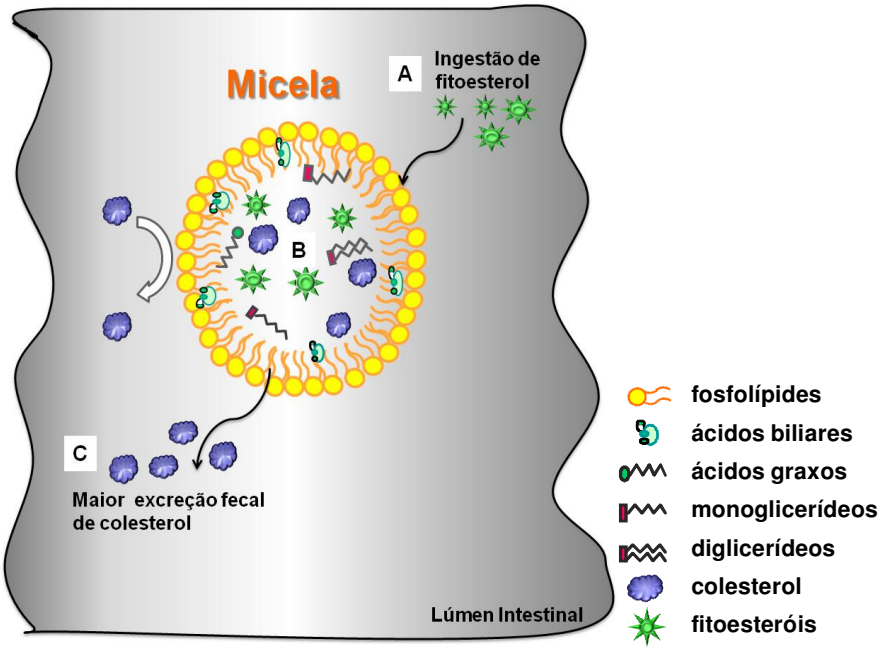

Figura 3- Estrutura da micela e o mecanismo de competição entre colesterol e fitoesterol no interior dessa estrutura: A – maior ingestão de fitoesterol; B- mecanismo de competição no interior da micela, o FE possui maior afinidade físico-química pela estrutura, dificultando a solubilização e incorporação do colesterol no interior da micela; C- maior excreção fecal de colesterol.

Os mecanismos de ação do fitoesterol na redução do colesterol plasmático ainda não foram totalmente elucidados. Possíveis ações moleculares do FE no interior do enterócito e do hepatócito estão sendo sugeridas (Moghadasian e Frohlich, 1999; Calpe-Berdiel et al, 2009). Alguns estudos mostraram que a suplementação de FE alterou RNAm para HMGCoA redutase e receptores de LDL in vitro e vivo, respectivamente (Field et al, 1997; Plat e Mensink, 2002a), sugerindo outras ações do FE independentes do mecanismo de competição com o colesterol.

Além disso, os FE parecem também aumentar a expressão do RNAm dos receptores de LDL em monócitos e linfócitos T em humanos (Plat e Mensink, 2002a). Reforçando essa hipótese, a injeção subcutânea de FE em

frangos e hamsters demonstrou efeitos similares na redução do colesterol plasmático quando comparada à administração de FE oral (Konlande e Fisher, 1969; Vanstone et al, 2001).

Outros mecanismos foram sugeridos para explicar a ação do FE na micela sobre a redução do colesterol, como, por exemplo, a formação no lúmen intestinal de um cristal insolúvel em água entre FE e colesterol que seria minimamente absorvido (Davis, 1955; Goetschel e Bar, 1992). Entretanto, estas hipóteses não foram comprovadas posteriormente (Mel´nikov et al., 2004).

Alguns estudos encontraram associação da concentração de fitoesterol no plasma com eventos cardiovasculares (Miettinen et al., 1998). Em animais apoEKO, observou-se a diminuição da progressão da lesão aterosclerótica com o consumo de FE (Moghadasian et al., 1997; Moghadasian et al., 1999; Moghadasian, 2006; Plat et al., 2006).

Após serem captados pela NPC1L1 no enterócito, os FE, assim como o colesterol, retornam rapidamente ao lúmen por intermédio das proteínas transportadoras ABCG5 e ABCG8. Uma ínfima parte pode ser esterificada pela ACAT2 e transportada posteriormente por lipoproteínas e excretada pela bile (von Bergmann et al., 2005) (Figura 4).

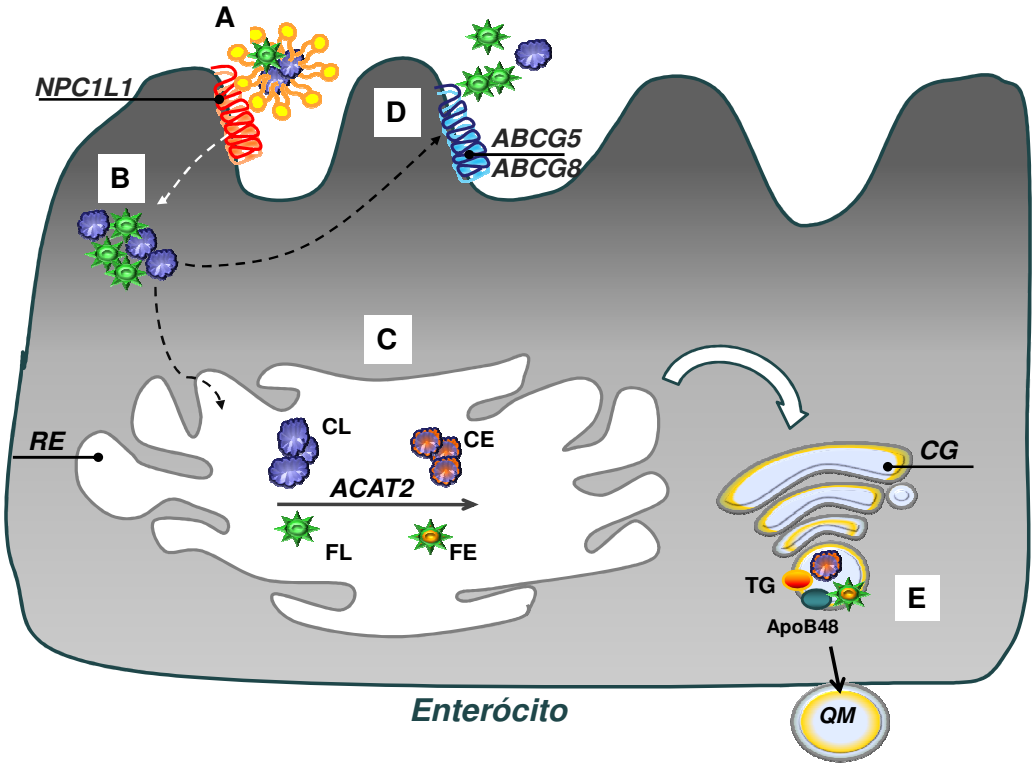

Figura 4- Absorção dos esteróis no interior do enterócito: A- aproximação da micela na borda em escova do enterócito; B- colesterol e fitoesterol entram no interior da célula através de proteínas transportadoras de esteróis (NPC1L1); C- o CL é esterificado pela ACAT2 no RE, assim como uma pequena parte do FL também pode ser esterificado por essa mesma enzima; D- a maior parte do FE retorna ao lúmen intestinal através das proteínas transportadoras ABCG5 e ABCG8; E- o CE, juntamente com o FE, TG e apo 48 no CG formam os QM que são carreados pelo sistema linfático
Abreviaturas: ABCG5 (ATP Binding Cassete Transporter G5), ABCG8 (ATP Binding Cassete Transporter G5), ACAT2 (acil-colesterol-acil-transferase-2), apoB48 (apoliproteína B 48), CE (colesterol ester), CG (complexo de golgi), CL (colesterol livre), FE (fitoesterol ester), FL (fitoesterol livre), NPC1L1 (*Niemann-Pick C1 Like 1 Protein*), QM (quilomicron), RE (retículo endoplasmático), TG (triglicérides)

Peterson, em 1951, foi o primeiro pesquisador a demonstrar redução do colesterol com a ingestão de fitoesteróis adicionados ao óleo de soja em frangos (Peterson, 1951). Em 1953, Pollak demonstrou essa resposta em humanos (Pollak, 1953).

A utilização dos FE com o objetivo de diminuir o colesterol foi limitada, inicialmente, por se tratar de uma molécula de baixa solubilidade, impossibilitando a sua incorporação em alimentos, e, posteriormente, pela descoberta das estatinas, drogas muito mais eficazes na redução da colesterolemia (Rosenthal, 2000). Após o desenvolvimento de métodos que possibilitaram a esterificação do fitoesterol, foi possível sua incorporação a alimentos, sendo adicionado pela primeira vez às margarinas. Atualmente, outros alimentos, como queijo cremoso, pães, molhos para salada, iogurte, leite, cereal matinal, barras de cereais e sucos de frutas também estão sendo enriquecidos com o fitoesterol (Law, 2000).

A dieta habitual fornece em média 150 a 400 mg/dia de FE (Weihrauch et al., 1978), e a sua eficiência na redução da colesterolemia foi observada com o consumo de 0,8 a 4 g/dia, quantidade suficiente para reduzir o colesterol plasmático entre 10 e 15 % (Patel et al., 2006). Uma revisão de aproximadamente 40 estudos observou que a dose de 2 g/dia resultou na redução de 10 % do LDL-C, e que quantidades maiores não potencializam esta ação (Katan et al., 2003).

Várias pesquisas têm mostrado que a ingestão de 2 a 4 g/dia de sitostanol ou sitosterol adicionado à margarina diminui em média 10 % o CT, e até 14 % o LDL-C em indivíduos hipercolesterolêmicos (Miettinen et al., 1995). Investigações realizadas na Finlândia e no Brasil também obtiveram os mesmos resultados em indivíduos hipercolesterolêmicos moderados sem alteração de HDL-C e TG (Lottenberg et al., 2002; Hallikainen e Uusitupa, 1999).

Diversas condutas terapêuticas envolvendo fármacos e dietas vêm sendo propostas para a redução do colesterol. Com base nos resultados de diversos estudos clínicos e experimentais (Castro et al., 2006; Acuff et al., 2007; Allen et al., 2008), a última diretriz da *National Cholesterol Education Program* para o tratamento da hipercolesterolemia incluiu a recomendação de inclusão de fitoesteróis (2 g/dia), além da limitação do consumo de ácidos graxos trans (NCEP, 2002).

A avaliação de 200 indivíduos hipercolesterolêmicos mostrou que os FE não alteraram a função endotelial (Raitakari et al., 2008). Por outro lado, a suplementação de FE em camundongos mostrou prejudicar a vasodilatação do endotélio e piorar o tamanho da lesão após isquemia cerebral (Weingärtner et al., 2008).

Embora a ação dos FE sobre a redução da colesterolemia já tenha sido exaustivamente estudada, o seu efeito sobre os processos inflamatórios e endoteliais vem sendo investigado apenas recentemente.

2. OBJETIVO

O objetivo do estudo foi avaliar ações do FE envolvidas sobre biomarcadores inflamatórios e endoteliais em indivíduos moderadamente hipercolesterolêmicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Triagem dos pacientes

A seleção dos pacientes foi feita no Ambulatório de Dislipidemia do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas e entre funcionários da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Os voluntários interessados em participar do protocolo foram orientados sobre o método e os objetivos do estudo. Os pacientes que faziam uso de medicamentos que interferissem nos lípides do plasma foram orientados a suspender a medicação um mês antes de iniciar os exames da triagem.

3.2. Casuística

Foram selecionados indivíduos portadores de hipercolesterolemia primária moderada (CT entre 200 mg/dL e 300 mg/dL), TG abaixo de 250 mg/dL e que apresentassem LDL-C superior a 130 mg/dL, sendo excluídos do estudo, indivíduos com IMC acima de 30, portadores de DM, hipotireoidismo não tratado, doença hepática e renal. Medicações que interferissem nos lípides plasmáticos foram interrompidas quatro semanas antes do início do protocolo.

3.3. Comitê de ética

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAPPesq n° 112/06). Todos os indivíduos foram informados quanto ao protocolo e aos objetivos dos procedimentos e forneceram consentimento por escrito.

3.4. Especificação do produto lácteo à base de soja

O leite de soja enriquecido com FE e o leite placebo foram produzidos na Holanda pela Unilever Bestfoods Brasil Ltda. e sua composição está demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição nutricional do leite de soja por porção de 200 mL

Composição nutricional	Sem fitoesterol	Com fitoesterol
Energia (kcal)	138	144
Proteína (g)	6,5	6,5
Gordura total (g)	4,4	5,0
Poli-insaturada	2,3	2,5
Monoinsaturada	1,0	1,1
Saturada	0,7	0,9
Trans	0	0
Colesterol (mg)	0	0
Carboidrato (g)	18,2	18,2
Açúcares totais	14,1	14,1
Lactose	0	0
Sódio (g)	0,1	0,1

Cada embalagem continha 0,8 g de FE, sendo 78 % sitosterol-éster, 13 % sitostanol-éster, 5,3 % campesterol-éster e 0,5 % campestanol-éster.

3.5. Protocolo experimental

O estudo foi randomizado e cruzado com duração de 11 semanas. Inicialmente, os pacientes foram submetidos a um período basal de três semanas, durante o qual receberam o produto placebo, com a finalidade de avaliar a sua adesão. A dose diária do produto era de 1,6 g (duas porções do produto).

Aleatoriamente, metade do grupo iniciou com o leite placebo (período Placebo), passando para leite com fitoesterol (período Fitoesterol) no final de quatro semanas. O restante do grupo iniciou com leite enriquecido com fitoesterol e foi submetido ao procedimento inverso. As coletas de sangue foram feitas no último e no antepenúltimo dia de cada período (Figura 2).

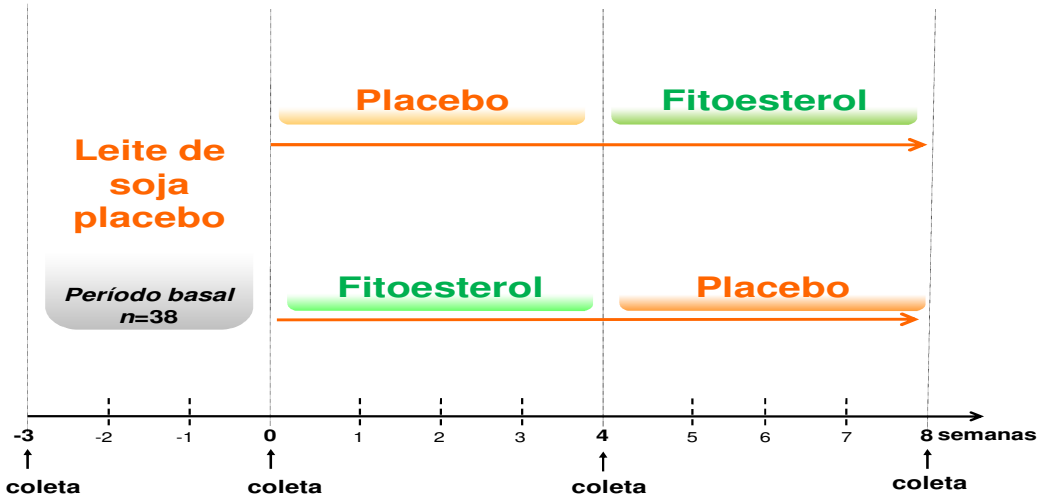

Figura 5. Desenho do estudo

Durante todo o estudo, os pacientes compareceram semanalmente ao laboratório, para controle de peso corporal e para receberem o produto. Foi realizado acompanhamento nutricional para garantir a manutenção da dieta habitual dos pacientes. Os pacientes foram orientados a consumir o leite de soja juntamente com uma refeição ou lanche que fornecesse fontes de gordura, com a finalidade de garantir a melhor eficácia do produto; a não consumirem bebidas alcoólicas; e a manterem a atividade física habitual.

3.6. Coleta de sangue

O sangue foi coletado após 12 horas de jejum. Para as análises bioquímicas, o sangue foi colhido em tubos contendo 10 % EDTA (10 µL/mL de sangue) e imediatamente colocados sobre o gelo. A seguir, foi centrifugado a 4 °C, durante 20 minutos, em baixa rotação, para obtenção do plasma, ao qual se acrescentaram os seguintes conservantes (µL/mL de plasma): 5 µl benzamidina 2 mM, 20 µl gentamicina 0,5 % cloranfenicol 0,25 %, 10 µl aprotinina e 0,5 µl fluoreto de fenilmetilsufonila 0,5 mmol/L diluído em DMSO.

Para as medidas dos marcadores inflamatórios, o sangue foi colhido em tubo seco, e o fibrinogênio em tubo com citratato. O plasma e o soro total foram estocados a -70 ºC. Todas as medidas foram realizadas no final do estudo, em duplicata.

3.7. Dosagens bioquímicas

Para a obtenção das HDL utilizou-se o método de precipitação de lipoproteínas que contêm apo B (Bachorik e Albers, 1986). Adicionou-se ao plasma o agente precipitante composto de solução de sulfato de dextrana e cloreto de magnésio 2 M (1:1) (50 µL/500µL de plasma). O plasma foi agitado em vortex, mantido à temperatura ambiente por 10 minutos e imediatamente centrifugado durante 30 minutos, a 700 x g a 4 ºC, em centrífuga refrigerada (marca Sorvall modelo RT 6000B, Du Pont Company, Newton, CT, EUA). Separou-se o sobrenadante e se desprezou o precipitado. Alíquotas de aproximadamente 500 µL foram estocadas a -70 ºC.

As concentrações dos lípides plasmáticos (CT, HDL-C e TG) foram determinadas por métodos enzimáticos colorimétricos em aparelho automatizado COBAS MIRA (Roche Diagnostics, Basiléia, Suíça), com a utilização de kits da Roche Diagnostics (Manheim, Alemanha). A concentração do LDL-C foi determinada, indiretamente, pela fórmula de Friedewald [LDL-C = CT -(HDL-C + TG/ 5)] (Friedewald et al., 1972).

As dosagens de biomarcadores inflamatórios (IL-6 e TNFα) e endoteliais (ET-1 e VCAM) foram, respectivamente, realizadas no soro e no plasma, utilizando-se kits de imunoenzimático ultrassensíveis (ELISA Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, marca R&D Systems, Minneapolis, USA) .

As análises do fibrinogênio pelo método de Clauss modificado, apo B por método turbidimétrico e PCR e SAA por nefelometria, foram realizadas na Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP

O número de indivíduos referente ao resultado de biomarcadores diferiu, pois não foi possível utilizar todas as análises, em razão da grande variabilidade intraensaio obtida em algumas amostras (excluímos os valores de variação intraensaio superiores a 20 %). No caso do fibrinogênio, optou-se por sua análise apenas quando o estudo já estava em curso, e esta análise só é possível com coleta diferenciada, razão pela qual se utilizou apenas amostra de 12 pacientes.

O campesterol e β-sitosterol, marcadores de absorção do colesterol intestinal, e latosterol, marcadores de síntese de colesterol, foram medidos por cromatografia gasosa no cromatógrafo a gás acoplado ao espectrofotômetro de massa marca Shimadzu GCMS-QP2010 plus utilizando versão 2.5 do software GCMS solution (Phillips et al., 1999).

3.8. Extração do RNAm e PCR em tempo real

O RNAm total foi extraído de células linfomononucleares de sangue periférico usando Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com recomendações do fabricante. A concentração do RNA foi determinada espectrofotometricamente, e a averiguação de integridade foi constatada com a visualização de duas bandas, correspondentes às frações 18S e 28S do RNA ribossomal, corrido em gel de agarose a 1 % contendo

brometo de etídio. A síntese de cDNA foi realizada com Kit “SuperScript III Reverse Transcriptase” (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As concentrações de RNAm de HMGCoA redutase e receptor de LDL foram determinadas por PCR em tempo real e os resultados foram normalizados de acordo com o gene de controle interno, no caso o RNAm de β-actina. Os “Primers” foram designados usando o primer3_cgi v0.2 program. Os seguimentos usados nos “primers” de oligonucleotídeos foram: LDLr upper 5’-GTGTCACAGCGGCGAATG-3’, lower 5’-CGCACTCTTTGATGGGTTCA-3’; HMGCoA redutase upper5’-TACCATGTCAGGGGTACGTC-3, lower 5’-CAAGCCTAGAGACATAATCATC-3 e β-actin upper 5’-CCTGGCACCCAGCACAAT-3’, lower 5’-CGATCCACACGGAGTACT-3. Na quantificação do RNAm para os genes estudados, foi utilizado o equipamento Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Austrália), além do conjunto de reagentes SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com instruções do fabricante.

3.9. Análise estatística

A análise dos resultados foi realizada por meio de testes estatísticos pareados e paramétricos. As comparações entre os períodos Placebo e Fitoesterol foram analisadas pelo Teste “t de Student”, com os resultados expressos como média ± desvio padrão. Para a verificação da correlação entre duas variáveis, utilizou-se o coeficiente de correlação por postos de Pearson.

O poder da amostra para detectar diferenças significativas entre os grupos foi de 95 %.

Para análise estatística, utilizou-se o programa GraphPad Prisma versão 4.00. Foi considerado o nível de significância de $P<0,05$.

4. RESULTADOS

O estudo foi iniciado com 41 indivíduos, sendo que dois pacientes foram excluídos, em razão de terem apresentado alteração de peso, e um paciente desistiu do estudo no início do protocolo por não ter aderido ao produto. Dos 38 indivíduos validados, 31 eram do sexo feminino e sete do sexo masculino, com idades entre 18 e 70 anos. Na Tabela 2 estão descritas as características basais da população estudada.

Tabela 2 - Características basais da população estudada

Parâmetros	Média ± DP
Idade (anos)	58 ± 12
Peso (kg)	64 ± 10
IMC (kg/m^2)	25,3 ± 2,4
Colesterol total (mg/dL)	245 ± 34
Triglicérides (mg/dL)	141 ± 53
LDL-C (mg/dL)	165 ± 34
HDL-C (mg/dL)	49 ± 12

NOTA: 38 pacientes analisados.
Abreviaturas: DP (desvio padrão), HDL-C (colesterol de lipoproteína de alta densidade), IMC (índice de massa corporal), LDL-C (colesterol de lipoproteína de baixa densidade)

O peso corporal e o IMC dos participantes permaneceram inalterados durante todo o estudo, como demonstrado na Tabela 3, sendo que a variação individual máxima tolerada foi de 5 % do peso inicial. A ordem do início do estudo (placebo–fitoesterol ou fitoesterol–placebo) não interferiu nos resultados.

Os fitoesteróis reduziram as concentrações plasmáticas de TG, CT, LDL-C e apo B, sem, no entanto, alterarem o HDL-C. Não houve diferença nas concentrações plasmáticas de fibrinogênio, PCR, SAA, IL-6, TNFα e VCAM-1 (Tabela 3). O mesmo resultado foi obtido quando a resposta foi analisada em função do grau de hipercolesterolemia dos pacientes (dados não demonstrados). No entanto, os fitoesteróis mostraram-se eficientes na redução da concentração plasmática de endotelina-1 (11 %).

Tabela 3 - Peso, IMC e dados laboratoriais no final dos períodos Placebo e Fitoesterol em indivíduos moderadamente hipercolesterolêmicos

Parâmetros	n	Placebo	Fitoesterol	Percentual de variação
Peso (kg)	38	64,9 ± 10,2	65,1 ± 10,3	-
IMC (kg/m^2)	38	25,4 ± 2,4	25,4 ± 2,4	-
Colesterol total (mg/dL)	38	261 ± 43	244 ± 35[2]	(5,5)
HDL-C (mg/dL)	38	46 ± 10	48 ± 12	
LDL-C (mg/dL)	38	183 ± 36	169 ± 31[1]	(6,4)
Apolipoproteína B (mg/dL)	38	126 ± 22	118 ± 19[1]	(5,3)
Triglicérides (mg/dL)	38	154 ± 59	133 ± 42[1]	(8,3)
Fibrinogênio (mg/dL)	12	250 ± 57	239 ± 61	-
PCR (mg/L)	35	2,69 ± 2,27	2,71 ± 2,38	-
SAA (mg/L)	33	5,51 ± 2,86	6,07 ± 3,12	-
IL-6 (pg/mL)	33	2,02± 1,03	1,74 ± 1,01	-
TNFα (pg/ mL)	36	1,54 ± 0,80	1,51 ± 0,77	-
ET-1 (pg/mL)	24	1,31 ± 0,4	1,14 ± 0,4[1]	(11)
VCAM-1(ng/mL)	38	469 ± 127	472 ± 118	-

NOTA: número em média ± desvio padrão
Abreviaturas: ET-1 (endotelina-1), HDL-C (lipoproteína de alta densidade colesterol), IL-6 (interleucina-6), IMC (índice de massa corporal), LDL-C (lipoproteína de baixa densidade colesterol), PCR (proteína C reativa), SAA (soro amilóide A), TNFα (fator de necrose tumoral-alfa), VCAM-1 (molécula de adesão à monócito-1)
[1] P<0,05 [2] P<0,001 –fitoesterol < placebo (Teste t Student)

Com a finalidade de avaliar a interferência do grau de hipercolesterolemia sobre a resposta do fitoesterol, os pacientes foram divididos em dois grupos (Tabela 4), de acordo com a mediana dos valores de LDL-C basal (≥ 167 mg/dL ou ≤166 mg/dL). Observamos que nos pacientes que apresentavam concentração menor de LDL basal não reduziram triglicérides e apo B.

Tabela 4 - Concentrações plasmáticas de lípides e apolipoproteína B de acordo com a mediana do LDL-C basal nos períodos Placebo e Fitoesterol em indivíduos moderadamente hipercolesterolêmicos

Parâmetros Lipídicos	LDL-C ≤ 166 mg/dL[1]		LDL-C ≥ 167 mg/dL[2]	
(mg/dL)	Placebo	Fitoesterol	Placebo	Fitoesterol
Triglicérides	146 ± 58	134 ± 45	164 ±61	132 ± 41[3]
Colesterol total	243 ± 34	230 ± 26[3]	283 ± 44	263± 37[3]
LDL-C	166 ± 24	154 ± 20[3]	202 ± 39	186 ± 33[3]
Apo B	115 ± 12	109 ± 13	140 ± 25	129 ± 20[3]

NOTA: número em média ± desvio padrão
Abreviaturas:
[1] n= 21
[2] n= 17
[3] P<0,05 –fitoesterol < placebo (Teste t Student)

Na Figura 6, representamos a variação individual do LDL-C com a ingestão de FE nos diferentes graus de hipercolesterolemia basal.

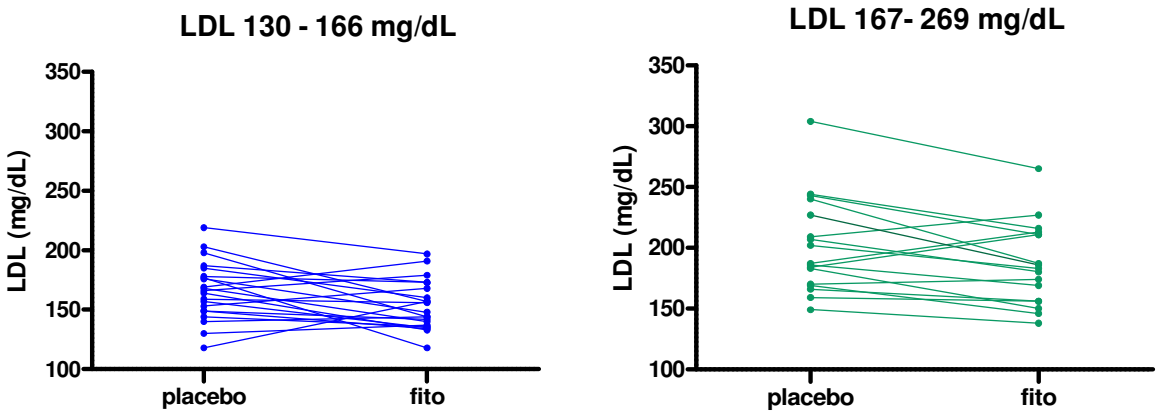

Figura 6: Resposta individual do LDL-C ao tratamento com fitoesterol nos diferentes graus de hipercolesterolemia

Sabe-se que, entre outros fatores, o grau de colesterolemia também pode induzir a síntese de ET-1 (Lam et al., 2006). Com a finalidade de avaliar o efeito independente dos FE sobre a ET-1, os pacientes foram divididos em responsivos e não-responsivos ao tratamento. Entre aqueles que tiveram redução do LDL-C com FE, observou-se diminuição da concentração de ET-1; porém, o mesmo resultado foi obtido entre os indivíduos que tiveram elevação do LDL-C com o fitoesterol. Com relação aos outros biomarcadores, não foram observadas essas diferenças.

Tabela 5 – Concentração plasmática de endotelina-1 em relação aos valores de LDL-C basal com o uso de fitoesterol

Reação do LDL-C com Fitoesterol	Placebo	Fitoesterol	Percentual de variação (%)
Redução de LDL-C[1]	1,41 ± 0,38	1,21 ± 0,44[3]	(12)
Aumento de LDL-C[2]	1,00 ± 0,39	0,91 ± 0,35[3]	(8)

[1] n= 18 [2] n= 6
[3] P<0,05 –fitoesterol < placebo (Teste t Student)

Os fitoesteróis não alteraram o RNAm para HMGCoA redutase (n=21, placebo: 1,09 ± 0,92 ng/µL; Fitoesterol: 1,04 ± 0,73 ng/µL) e nem para receptor de LDL (n=21; placebo 1,20 ± 0,91; Fitoesterol 1,60 ± 1,65).

As concentrações plasmáticas de campesterol e sitosterol, marcadores de absorção, aumentaram com a ingestão de FE em 18,9% (placebo 4,85 ± 1,35 µg/mL; Fitoesterol 5,61 ± 1,48 µg/mL; P< 0,0001) e 21,6% (placebo 4,03 ± 1,01 µg/mL; Fitoesterol 4,82 ± 1,21 µg/mL; P< 0,0001) respectivamente. A concentração plasmática de latosterol, marcador de síntese de colesterol, não alterou durante o estudo.

Houve correlação entre esteróis plasmáticos e biomarcadores (Figura 7). A ET-1 correlacionou-se inversamente com as concentrações plasmáticas de latosterol e sitosterol (Figura 7A e 7B). A IL-6 correlacionou-se inversamente com campesterol e sitosterol (Figura 7C e 7D) e o TNFα com o latosterol (Figura 7E).

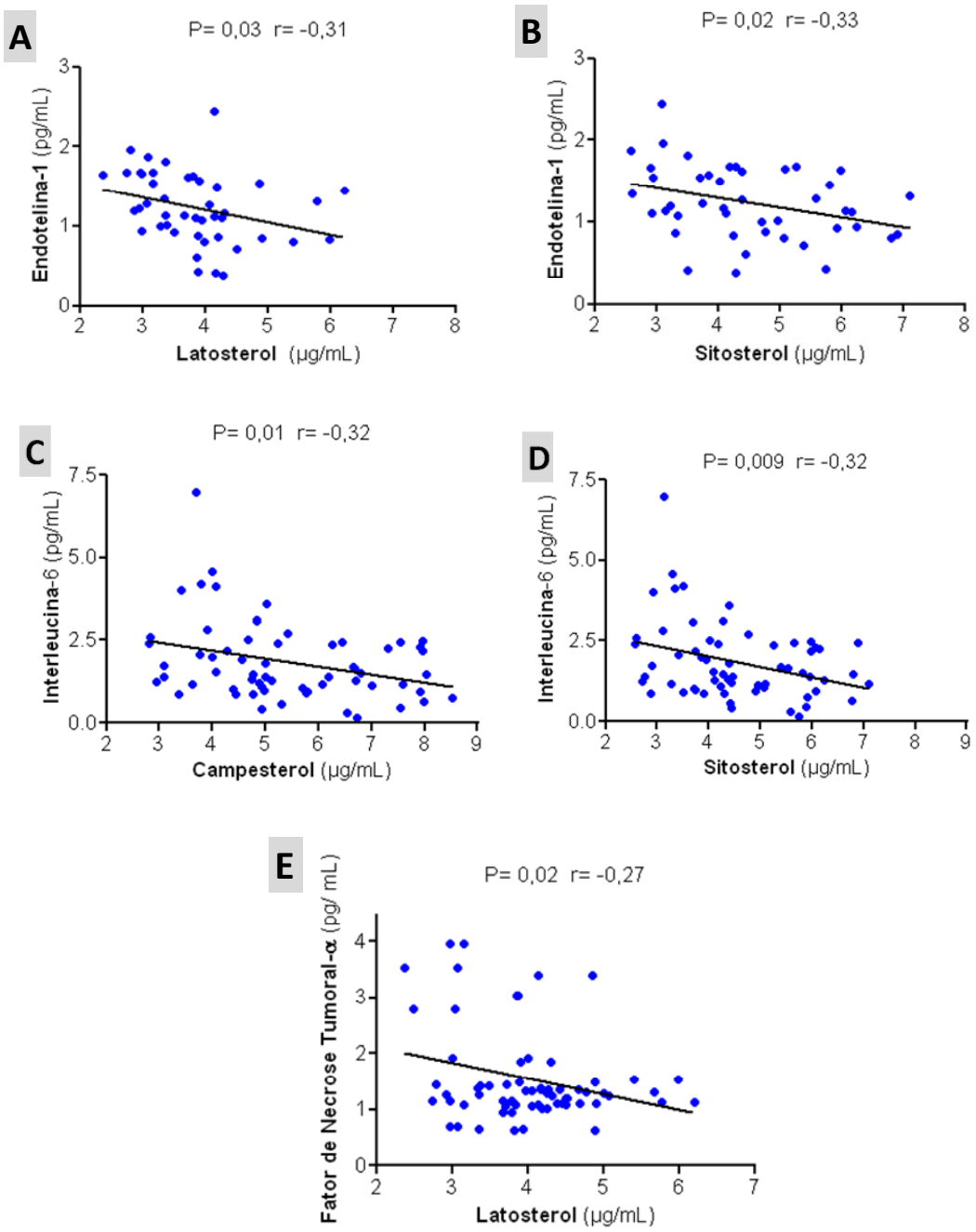

Figura 7. Correlação entre biomarcadores e esteróis plasmáticos

5. DISCUSSÃO

O presente estudo realizado com leite de soja enriquecido com FE reforça a sua eficácia na redução do CT e do LDL-C (Tabela 1). O mesmo resultado foi obtido em estudos prévios, nos quais se avaliou o consumo de margarina enriquecida com FE em hipercolesterolêmicos moderados e nos quais se observou redução aproximada de 6 % do CT e de 8 % do LDL-C, quando comparados ao placebo A menor redução de colesterol observada no nosso estudo pode ser explicada pela quantidade inferior de FE utilizada em comparação aos demais (Lottenberg et al., 2002, Miettinen et al., 1995; Hallikainen e Uusitupa, 1999). No entanto, ao se avaliar o efeito de quantidades crescentes de FE (0,83, 1,61 e 3,24 g/dia) em indivíduos saudáveis e moderadamente hipercolesterolêmicos, observou-se redução similar de CT e LDL-C nos diferentes grupos estudados. Um dado relevante a ser observado neste último estudo é o fato de que o maior consumo de fitoesterol induziu redução da concentração plasmática de HDL (Hendriks et al., 1999). Nossa investigação não observou alteração na HDL, assim como em vários outros estudos (Miettinen et al., 1995; Lottenberg et al., 2002; Hallikainen e Uusitupa, 1999; Allen et al., 2008).

Observamos que houve grande variabilidade na resposta individual da ação dos FE sobre a concentração plasmática de LDL-C nos diferentes graus de hipercolesterolemia (Figura 5). Por este motivo, é importante que na prática clínica, quando recomendados, a eficiência dos fitoesteróis deve

ser avaliada individualmente. As razões biológicas para estas diferenças individuais são desconhecidas, mas algumas hipóteses podem ser levantadas. Além dos artigos já citados com alteração em RNAm para HMGCoA redutase e receptor de LDL, Plat e Mensink (2002b) indicaram que o consumo de FE ativou a expressão de RNAm para ABCA-1 nas células intestinais, potencializando ainda mais a redução da absorção de colesterol. ABCA-1 localiza-se na borda em escova do enterócito promovendo o efluxo de colesterol para o lúmen intestinal. Posteriormente, os mesmos autores evidenciaram a ativação dos genes para liver X receptor (LXR), indutor de transcrição para ABCA-1, com o consumo de esterol e estanol (Plat et al, 2005;). Em ratos alimentados com stigmasterol houve redução, tanto da atividade hepática de HMGCoA redutase, quanto na formação de ácidos biliares (Batta et al., 2006). A mudança na transcrição gênica de ABCA-1, ABCG5, ABCG8 and NPC1L1 tanto no fígado quanto no intestino de ratos apoE -/-, parece não influenciar a redução da absorção do colesterol induzida pelo fitoesterol (Calpe-Berdiel et al., 2005). No nosso estudo, não detectamos alterações no RNAm para HMGCoA redutase e receptor de LDL, sugerindo que mecanismos relacionados a formação da micela devem atuar na redução da colesterolemia pelos fitoesteróis. Corroborando nosso estudo, em pacientes com consumo de FE e uso de estatina não foram também observadas alterações no RNAm para o receptor de LDL (de Jong et al., 2008).

Embora algumas investigações não tenham demonstrado redução dos triglicérides (Miettinen et al., 1995; Hallikainen et al., 2006; Lottenberg et

al., 2000), o nosso estudo mostra redução da trigliceridemia (Tabela 3) com o consumo de FE. Outras investigações (Ebine et al., 2006; Demonty et al., 2006) e recente meta-análise (Naumann et al, 2008) corroboram os nossos dados. Em indivíduos portadores de síndrome metabólica, demonstrou-se que o enriquecimento de fitoestanol adicionado ao iogurte reduziu em 21 % a concentração plasmática de triglicérides, além de ter elevado o HDL-C em 11 % (Plat et al., 2009). Embora outros autores tenham demonstrado maior ação em hipertrigliceridêmicos (Naumann et al, 2008, Plat et al., 2009), os indivíduos do nosso estudo apresentavam concentração normal de triglicérides. A redução da trigliceridemia foi demonstrada em hamsters com o consumo de análogos hidrofílicos de fitostanol (Ebine et al., 2006). No entanto, o resultado obtido não pode ser atribuído ao FE, em razão de os animais terem perdido peso.

A redução dos triglicérides no plasma pode estar relacionada com a diminuição da incidência de DCV, conforme demonstrado em estudo com indivíduos jovens moderadamente hipertrigliceridêmicos (Tirosh et al., 2007). No entanto, não há, até o momento, dados suficientes na literatura, que possam justificar a indicação do FE na redução da trigliceridemia.

Um possível mecanismo de ação dos FE sobre a redução da trigliceridemia é o aumento de expressão do RNAm e da proteína do receptor de LDL descrito em células mononucleares de indivíduos normais (Plat et al., 2002a). Este autores demonstraram aumento tanto da proteína como do RNAm para receptor B/E. No nosso estudo, realizado em

hipercolesterolêmicos, não encontramos alteração no RNAm, porém não avaliamos a proteína total dos receptores.

Além da associação entre a concentração plasmática de colesterol e triglicérides com eventos cardiovasculares, já está bem elucidado na literatura a presença de inflamação no processo aterosclerótico (Steinberg, 2002; Packard e Libby, 2008). Entende-se este processo não apenas como decorrência do acúmulo de lípides na parede dos vasos, mas uma conseqüência da disfunção endotelial e da ativação do sistema inflamatório (Packard e Libby, 2008). A partir de estudos epidemiológicos foram identificados biomarcadores que podem estar associados à DCV. Em 2001, o US National of Health/Food and Drug Administration definiu os biomarcadores como indicadores de processos biológicos normais, processos patológicos ou mesmo respostas farmacológicas decorrentes de intervenção terapêutica (Biomarkers Definitions Working Group, 2001).

Recentemente foi sugerida a ação imunomoduladora dos fitoesteróis tanto “in vitro” (Aherne e O´Brien, 2008) como “in vivo” (Calpe-Berdiel et al., 2007; Acuff et al., 2007; Desai et al., 2009), com a sua eficácia variando em função do tipo de indivíduo estudado. Observou-se, diminuição da secreção de citocinas próinflamatórias pelas células mononucleares periféricas, como a IL-12 e TNF-alfa em indivíduos com esclerose múltipla, bem como aumento da IL-10, citocina antiinflamatória, observada apenas em normais com o consumo de FE (Desai et al., 2009).

Não encontramos alteração na concentração de IL-6, TNFα, PCR, SAA e fibrinogênio. Corroborando os nossos dados, não se observou em

hipercolesterolêmicos diferença na PCR com FE (1,3 g/dia) administrado em cápsulas (Acuff et al., 2007). Já em camundongos apoE-KO, houve diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNFα e IL-6) e aumento nas citocinas anti-aterogênicas (IL-10) e conseqüente redução de 60 % do tamanho da lesão aterosclerótica com o fitoesterol (Nashed et al., 2005).

Embora no nosso estudo não tenhamos encontrado alteração na resposta inflamatória (Tabela 3), o campesterol e o sitosterol plasmáticos correlacionaram-se inversamente com a IL-6 (Figura 7C e 7D). Este resultado pode ser explicado tanto por ação direta dos FE na modulação deste biomarcador, como, por um mecanismo indireto, via redução de LDL-colesterol. Os FE reduzem a absorção de colesterol e, consequentemente, induzem sua maior síntese. A possibilidade de o aumento de síntese ter influenciado na redução da IL-6, é evidenciada pela correlação positiva entre a concentração de latosterol e TNF-alfa (Figura 7E).

Apesar de estar sendo explorada a ação dos FE na inflamação, poucos estudos avaliaram a sua ação sobre biomarcadores endoteliais e plaquetários (de Jong et al., 2008, Nashed et al., 2005).

As moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1) são biomarcadores iniciais da disfunção vascular. Há evidências de que a sua concentração plasmática pode ser considerada forte preditor de risco cardiovascular (Blankenberg et al., 2003). Esforços têm sido feitos para identificar compostos químicos ou componentes alimentares com potencial efeito

modulador da expressão destas moléculas de adesão (Bellido et al., 2006; Baer et al., 2004; Han et al., 2002).

No nosso estudo os fitoesteróis não alteraram a concentração plasmática da VCAM-1, resultado que corrobora dados de uma investigação realizada com indivíduos hipercolesterolêmicos (de Jong et al., 2008). Nesse mesmo estudo não foram também observadas alterações na PCR e proteínas quimiotáticas de monócitos (MCP-1) com o consumo de FE (de Jong et al., 2008). Da mesma forma, em pacientes com síndrome metabólica, o consumo de FE não alterou E-selectina, ICAM-1, VCAM-1, MCP-1 e IL-6 (Plat et al., 2009).

O estudo prospectivo (CARDIA- 13 anos) realizado em indivíduos jovens constatou que a concentração elevada de fibrinogênio associou-se independentemente com DCV subclínica (Green et al.,2009). Nashed (2005) observou redução na concentração plasmática de fibrinogênio em camundongos apoE-KO, sugerindo efeito antitrombótico do fitoesterol. No entanto, no nosso estudo, não observamos alteração do fibrinogênio com o FE. Porém, uma limitação pode no nosso estudo ter sido o pequeno número de indivíduos avaliados para este parâmetro.

Além da ação do FE sobre os biomarcadores, tem sido investigado seu efeito sobre função endotelial e os resultados ainda são inconclusivos (Moghadasian et al.,1999; Hallikainen et al., 2006; Raitakari et al., 2008). Demonstrou-se redução do diâmetro da artéria braquial com o consumo de FE em indivíduos hipercolesterolêmicos (Hallikainen et al., 2006). Já em indivíduos diabéticos tipo 1, os FE não alteraram a função endotelial

(Hallikainen et al, 2008), nem foram observadas alterações na elasticidade da artéria carótida e na vasodilatação da artéria braquial em 200 indivíduos hipercolesterolêmicos com o consumo de 2 g/dia de estanóis (Raitakari et al., 2008). A análise dos resultados destes estudos deve ser feita com cautela, uma vez que há grande variabilidade nos métodos empregados. A

Ações desfavoráveis do FE estão sendo realmente apontadas. Observou-se aumento de tamanho da lesão cerebral após isquemia em camundongos selvagens tratados com FE. (Weingärtner et al, 2008). Entretanto, a quantidade de FE utilizada nesse animal experimental foi 100 vezes superior à suplementação usada em humanos. Neste mesmo estudo, demonstrou-se que os FE em associação com ezetimibe induziram maior formação da placa aterosclerótica, em comparação ao uso da droga isoladamente (Weingärtner et al, 2008). Uma explicação poderia ser o fato de os FE serem mais oxidados em relação ao colesterol, induzindo maior processo inflamatório (Li e Przybyski, 1995). Observou-se ainda aumento das concentrações de sitosterol e campesterol no plasma e no tecido valvar em portadores de DCV (Helske et al., 2008; Weingärtner et al., 2008) e em pacientes que sofreram endoarterectomia de carótida, mas não se sabe a relevância desse fato (Miettinen et al., 2005). Não obstante, alguns estudos encontraram associação da concentração de fitoesterol no plasma com eventos cardiovasculares. O “Finnish 4S Investigation” que avaliou 868 pacientes com doença coronariana, constatou que pacientes em uso de estatina com recorrência de DCV apresentavam maior concentração plasmática de FE (Miettinen et al., 1998). Uma possível explicação poderia

ser a diminuição da síntese de colesterol em decorrência do uso estatinas com concomitante aumento da absorção de fitoesteróis, o que elevaria sua concentração plasmática (Gylling et al, 2009). Os resultados do PROCAM (Prospective Cardiovascular Münster) também mostraram associação entre a concentração plasmática de FE com o risco cardiovascular (Assmann et al., 2006). Por outro lado, dados do EPIC-Norfolk e LASA, não demonstraram relação entre a concentração plasmática de FE com DCV em indivíduos saudáveis (Pinedo et al., 2007; Fassbender et al., 2008). Estudo multicêntrico Italiano, não demonstrou haver alterações nas concentrações plasmáticas de marcadores de absorção como o campesterol e sitosterol, com o uso de FE (Mannarino et al., 2009). Em resumo, a associação da concentração plasmática de FE com a ocorrência de eventos cardiovasculares não se encontra bem elucidada até o momento (Miettinen et al., 1998).

Com relação ao efeito dos FE sobre a calcificação de placa arterial, os resultados também são controversos (Mellies et al., 1976). O consumo de fitoesterol e fitoestanol aumenta a expressão gênica de RNAm para enzima conversora de angiotensina I, óxido nítrico sintase 1 e 3 e cicloxigenases, associados ao aumento da pressão diastólica em ratos hipertensivos (Chen et al., 2009).

Obtivemos redução da ET-1, sendo que não há investigação até o momento associando os fitoesteróis com a sua modulação no plasma. Demonstrou-se apenas a influência de drogas sobre este marcador. Neste sentido, um estudo demonstrou redução de ET-1 no plasma com o consumo

de fenofibrato em pacientes com hiperlipidemia familiar combinada. (Arca et al 2007). No entanto, o mesmo resultado não foi observado com a atorvastatina (Hernández-Perera et al., 1998; Economides et a ., 2004; Lam et al., 2006).

Antagonistas de ET-1 e inibidores de IL-6 atenuam o efeito pró-aterogênico da PCR (Verma et al., 2002). Entretanto não observamos associação entre estes biomarcadores. Pacientes hipercolesterolêmicos apresentam aumento de LDL oxidada, condição que induz ao aumento de ET-1 (Boulanger et al., 1992). Embora este mecanismo não tenha sido ainda totalmente explicado, parece que espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico estão envolvidas nesta regulação (Tan et al., 1997).

Sabe-se que existe forte associação da colesterolemia com a concentração plasmática de ET-1 (Lerman e Zeiher, 2005). Por este motivo, com o objetivo de avaliar se a redução da ET-1 ocorreu independentemente da diminuição do colesterol observada com o uso de FE, os pacientes foram divididos em responsivos ou não ao tratamento com fitoesterol. Observou-se redução da ET-1 mesmo entre os pacientes com elevação de LDL-C ao final do tratamento. Pode-se concluir, portanto, que os FE reduziram a ET-1 de forma independente da diminuição da colesterolemia, porém os mecanismos envolvidos necessitam ser elucidados. Os nossos dados indicam que tanto os marcadores de síntese, quanto os de absorção (Figura 7A e 7B) correlacionaram-se inversamente com as concentrações de ET-1.

6. CONCLUSÕES

Os fitoesteróis são eficientes na redução do colesterol, triglicérides e LDL-C. Diminuem a concentração de endotelina-1 e esta ação foi independente da redução do colesterol, podendo contribuir desta forma para a melhora de disfunção endotelial associada à aterotrombose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuff RV, Cai DJ, Dong ZP e Bell D. The lipid lowering effect of plant sterol ester capsules in hypercholesterolemic subjects. *Lipids Health Dis* 2007;6:11-21.
- Agapitov AV, Haynes WG. Role of endothelin in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2002;3(1):1-15.
- Aherne SA, O´Brien NM. Modulation of cytokine production by plant sterols in stimulated human Jurkat T cells. *Mol Nutr Food Res* 2008;52(6):664-73.
- Allen RR, Carson L, Kwik-Uribe C, et al. Daily consumption of a dark chocolate containing flavanols and added sterol esters affects cardiovascular risk factors in a normotensive population with elevated cholesterol. *J Nutr* 2008;138(4):725-31.
- Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004;303(5661):1201-4.
- Andreozzi F, Laratta E, Procopio C, et al. Interleukin-6 impairs the insulin signaling pathway, promoting production of nitric oxide in human umbilical vein endothelial cells. *Mol Cell Biol* 2007;27(6):2372-83.
- Arai H, Hori S, Aramori I, et al. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348(6303):730-2.
- Arant CB, Wessel TR, Ridker PM, et al. Multimarker approach predicts adverse cardiovascular events in women evaluated for suspected ischemia: results from the national heart, lung, and blood institute-sponsored women's ischemia syndrome evaluation. *Clin Cardiol* 2009; 32(5): 244–50.

- Arca M, Montali A, Pigna G, et al. Comparison of atorvastatin versus fenofibrate in reaching lipid targets and influencing biomarkers of endothelial damage in patients with familial combined hyperlipidemia. *Metabolism* 2007;56(11):1534-41.
- Assmann G, Cullen P, Erbey J, et al. Plasma sitosterol elevations are associated with an increased incidence of coronary events in men: results of a nested case-control analysis of the Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16(1):13-21.
- Bachorik PS, Albers JJ. Precipitation methods for quantification of lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986;129:78-100.
- Baer DJ, Judd JT, Clevidence BA,Tracy RP. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. *Am J Clin Nutr* 2004;79(6):969-73.
- Banka CL. High density lipoprotein and lipoprotein oxidation. *Curr Opin Lipidol* 1996;7(3):139-42.
- Barter PJ, Ballantyne CM, Carmena R, et al. Apo B versus cholesterol in estimating cardiovascular risk and in guiding therapy: report of the thirty-person/ten-country panel. *J Intern Med* 2006;259(3):247-58.
- Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, et al. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004; 15;95(8):764-72.
- Batta AK, Xu G, Honda A, et al. Stigmasterol reduces plasma cholesterol levels and inhibits hepatic synthesis and intestinal absorption in the rat. *Metabolism* 2006: 55(3):292-9.

- Bays HE, Neff D, Tomassini JE, Tershakovec AM. Ezetimibe: cholesterol lowering and beyond. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008;6(4):447-70.
- Bellido C, López-Miranda J, Pérez-Martínez P, et al. The Mediterranean and CHO diets decrease VCAM-1 and E-selectin expression induced by modified low-density lipoprotein in HUVECs. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16(8):524-30.
- Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69(3):89–95.
- Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;170(2):191-203.
- Borst SE, Conover CF. High-fat diet induces increased tissue expression of TNF-alpha. *Life Sci* 2005;77(17):2156-65.
- Boulanger CM, Tanner FC, Béa ML, et al. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* 1992;70(6):1191-7.
- Bousette N, Giaid A. Endothelin-1 in atherosclerosis and other vasculopathies. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81(6):578-87.
- Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008;214(2):149-60.
- Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 1981;212(4495):628-35.
- Calpe-Berdiel L, Escolà-Gil JC, Benítez S, et al. Dietary phytosterols modulate T-helper immune response but do not induce apparent anti-

inflammatory effects in a mouse model of acute, aseptic inflammation. *Life Sci* 2007;80(21):1951-6.

- Calpe-Berdiel L, Escolà-Gil JC, Blanco-Vaca F. New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis* 2009; 203(1):18-31.
- Calpe-Berdiel L, Escolà-Gil JC, Ribas V, et al. Changes in intestinal and liver global gene expression in response to a phytosterol-enriched diet. *Atherosclerosis* 2005;181(1):75-85.
- Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO 3rd, Panza JA. Increased activity of endogenous endothelin in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2000;36(5):1483-8.
- Casas JP, Shah T, Hingorani AD, et al. C-reactive protein and coronary heart disease: a critical review. *J Intern Med* 2008;264(4):295-314.
- Castro Cabezas M, de Vries JH, Van Oostrom AJ, et al. Effects of a stanol-enriched diet on plasma cholesterol and triglycerides in patients treated with statins. *J Am Diet Assoc* 2006;106(10):1564-9.
- Charakida M, Tousoulis D, Skoumas I, et al. Inflammatory and thrombotic processes are associated with vascular dysfunction in children with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2009;204(2):532-7.
- Chen Q, Gruber H, Swist E, et al. Influence of dietary phytosterols and phytostanols on diastolic blood pressure and the expression of blood pressure regulatory genes in SHRSP and WKY inbred rats. Br J Nutr 2009;102(1):93-101.

- Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 15(11):1987-94.
- Compassi S, Werder M, Boffelli D, et al. Cholesteryl ester absorption by small intestinal brush border membrane is protein-mediated. *Biochemistry* 1995;(34950):16473-82.
- Connor WE, Hodges RE, Bleiler RE. The serum lipidis in men receiving high cholesterol and cholesterol-free diets. *J Clin Invest* 1961;40:894-901.
- Connor WE. Dietary cholestrol and the pathogenesis of atherosclerosis. *Geriatrics* 1961;16:407-415.
- Cui R, Iso H, Toyoshima H, et al. Serum cholesterol levels and risk of mortality from stroke and coronary heart disease in Japanese: The JACC study. *Atherosclerosis* 2007;194:415-20.
- Davis WW. Symposium on sitosterol. III. The physical chemistry of cholesterol and β-sitosterol related to the intestinal absorption of cholesterol. *Trans N Y Acad Sci* 1955;18(2):123-8.
- De Jong A, Plat J, Bast A, et al. Effects of plant sterol and stanol ester consumption on lipid metabolism, antioxidant status and markers of oxidative stress, endothelial function and low-grade inflammation in patients on current statin treatment. *Eur J Clin Nutr* 2008;62(2):263-73.
- De Maat MP. Effects of diet, drugs, and genes on plasma fibrinogen levels.
- Demonty I, Chan YM, Pelled D, Jones PJ. Fish-oil esters of plant sterols improve the lipid profile of dyslipidemic subjects more than do fish-oil or sunflower oil esters of plant sterols. Am J Clin Nutr 2006;84(6):1534-1542.

- Denault JB, Claing A, D'Orléans-Juste P, et al. Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett* 1995;362(3):276-80.
- Desai F, Ramanathan M, Fink CS, et al. Comparison of the immunomodulatory effects of the plant sterol β-sitosterol to simvastatin in peripheral blood cells from multiple sclerosis patients. *Int Immunopharmacol* 2009;9(1):153-7.
- Ebine N, Demonty I, Jia X, Jones PJ. Plant stanol ascorbate esters reduce body weight gain through decreased energy absorption in hamsters. *Int J Obes (Lond)* 2006;30(5):751-7.
- Economides PA, Caselli A, Tiani E, et al. The effects of atorvastatin on endothelial function in diabetic patients and subjects at risk for type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(2);740-7.
- Elovson J, Chatterton JE, Bell GT, et al. Plasma very low density lipoproteins contain a single molecule of apoliprotein B. *J Lipid Res* 1988;29(11):1461-73.
- Fassbender K, Lütjohann D, Dik MG, et al. Moderately elevated plant sterol levels are associated with reduced cardiovascular risk – The LASA study. *Atherosclerosis* 2008;196(1):283-8.
- Fatah K, Hamsten A, Blombäck B, Blombäck M. Fibrin gel network characteristics and coronary heart disease: relations to plasma fibrinogen concentration, acute phase protein, serum lipoproteins and coronary atherosclerosis. *Thromb Haemost* 1992;68(2):130-5.
- Fernández-Real JM, Broch M, Vendrell J, Ricart W. Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition. *Diabetes Care* 2003;26(5):1362-8.

- Field JF, Born E, Mathur SN. Effect of micellar beta-sitoesterol on cholesterol metabolism in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 1997;38(2):348-60.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18(6):499-502.
- Goetschel R, Bar R. Formation of mixed crystals in microbial conversion of sterols and steroids. *Enzyme Microb Technol* 1992;14(6):462-9.
- Goldie RG, Henry PJ. Endothelins and asthma. *Life Sci* 1999;65(1):1-15.
- Goldstein JL, Brown MS. The LDL Receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:431-8.
- Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989;79(1):8-15.
- Gotto AM Jr, Pownall HJ, Havel RJ. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986:128;3-41.
- Green D, Foiles N, Chan C, et al. Elevated fibrinogen levels and subsequent subclinical atherosclerosis: The CARDIA Study. *Atherosclerosis* 2009;202(2):623-31.
- Guilbert JJ. The search for HR continues: WHO's General Programme of Work 2002-2005 and the World Health Report 2001 on mental health. *Educ Health (Abingdon)* 2001;14(3):452-3.
- Gylling H e Miettinen TA. Cholesterol absorption and synthesis related to low density lipoprotein metabolism during varying cholesterol intake in men with different apoE phenotypes. *J Lipid Res* 1992;33(9):1361-71.

- Gylling H, Kontula K, Miettinen TA. Cholesterol absorption and metabolism and LDL kinetics in healthy men with different apoprotein E phenotypes and apoliprotein B Xba I and LDL receptor Pvu II genotypes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(2):208-13.
- Gylling H, Kuusi T, Miettinen TA. Apoliprotein E phenotype and cholesterol metabolism in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1989;80(1):27-32.
- Gylling H, Hallikainen M, Rajaratnam RA, et al. The metabolism of plant sterols is disturbed in postmenopausal women with coronary artery disease. *Metabolism* 2009;58:401-7.
- Hallikainen MA , Uusitupa MI. Effects of 2 low-fat stanol ester-containing margarines on serum cholesterol concentrations as part of a low –fat diet in hypercholesterolemic subjects. *Am J Clin Nutr* 1999;69(3):403-10.
- Hallikainen MA, Lyyra-Laitinen T, Laitinen T, et al. Effects of plant stanol esters on serum cholesterol concentrations, relative markers of cholesterol metabolism and endothelial function in type 1 diabetes. *Atherosclerosis* 2008;199(2):432-9.
- Hallikainen MA, Lyyra-Laitinen T, Laitinen T, et al. Endothelial function in hypercholesterolemic subjects: Effects of plant stanol and sterol esters. *Atherosclerosis* 2006;188(2):425-32.
- Hamsten A, Iselius L, de Faire U, Blombäck M. Genetic and cultural inheritance of plasma fibrinogen concentration. Lancet 1987;2(8566):988-91.
- Han SN, Leka LS, Lichtenstein AH, et al. Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsatured, fat on immune and inflammatory

responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2002;43(3):445-52.

- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N *Engl J Med* 2005;352(16):1685-95.
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990;265(3):621-36.
- Helske S, Miettinen T, Gylling H, et al. Accumulation of cholesterol precursors and plant sterols in human stenotic aortic valves. *J Lipid Res* 2008;49(7):1511-8.
- Hendriks HFJ, Weststrate JA, van Vliet T, Meijer GW. Spreads enriched with three different levels of vegetable oil sterols and degree of cholesterol lowering in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur J Clin Nutr* 1999;53(4):319-27.
- Hernández-Perera O, Pérez-Sala D, Navarro-Antolín J, et al. Effects of the 3-hydroxy-3-methylgutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1998;101(12):2711-9.
- Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1985;248:C550-6.
- Humphries SE, Cook M, Dubowitz M, Stirling Y, Meade TW. Role of genetic variation at the fibrinogen locus in determination of plasma fibrinogen concentrations. Lancet 1987;1(8548):1452-5.

- Ikeda I, Tanaka K, Sugano M, et al. Inhibition of colestherol absortion in rats by plant sterols. *J Lipid Res* 1988;29(12):1573-82.
- Innerarity TL, Pitas RE e Mahley RW. Binding of arginine-rich (E) apoliprotein after recombination with phospholipid vesicles to the low density lipoprotein receptors of fibroblasts. *J Biol Chem* 1979;254(10):4186-90.
- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura A, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86(6):2863-7.
- Introma M, Mantovani A. Early activation signals in endothelial cells. Stimulation by cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(3):423-8.
- Jacobson TA. The safety of aggressive statin therapy: how much can low-density lipoprotein cholesterol be lowered? *Mayo Clin Proc* 2006;81(9):1225-31.
- Jing Q, Shen Q, Zhang GY, et al. Involvement of endothelin subtype A receptor (ETA) in vascular smooth muscle cells proliferation evoked by oxidized low-density lipotrotein. *J Am Coll Cardiol* 1998;31(suppl 2):461A.
- Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(3):472-84.
- Kannel WB, Castelli WP, Gordon T. Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham study. *Ann Intern Med* 1979;90(1):85-91.
- Kannel WB. Overview of hemostatic factors involved in atherosclerotic cardiovascular disease. *Lipids* 2005;40(12):1215-20.

- Kassis AN, Vanstone CA, AbuMweis SS, Jones PJ. Efficacy of plant sterols is not influenced by dietary cholesterol intake in hypercholesterolemic individuals. *Metabolism* 2008;57(3):339-46.
- Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, et al. Efficacy and safety of plant stanols and sterol in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc* 2003;78(8):965–78.
- Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280(5):E745-51.
- Keys A, Grande F. Role of dietary fat in human nutrition. III. Diet and the epidemiology of coronary heart disease. *Am J Public Health Nations Health* 1957;47(12):1520-30.
- Konlande JE, Fisher H. Evidence for a nonabsorptive antihypercholesterolemic action of phytosterols in the chicken. *J Nutr* 1969;98(4):435-42.
- Kowala MC, Rose PM, Stein PD, et al. Selective blockade of the endothelin subtype A receptor decreases early atherosclerosis in hamsters fed cholesterol. *Am J Pathol* 1995;146(4):819-26.
- Kromhout D, Menotti A, Bloemberg B, et al. Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Prev Med* 1995;24(3):308-15.
- Kuller LH. Hyperlipidaemia and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:661-5.

- Kuvin JT, Karas RH. The effects of LDL reduction and HDL augmentation on physiologic and inflammatory markers. *Curr Opin Cardiol* 2003;18(4):295-300.
- Lam HC, Chu CH, Wei MC, et al. The effects of different doses of atorvastatin on plasma endothelin-1 levels in type 2 diabetic patients with dyslipidemia. *Exp Biol Med* 2006;231(6):1010-15.
- Law M. Plant sterol and stanol margarines and health. BMJ 2000;320(7238):861-4.
- Lerman A, Holmes DR Jr, Bell MR, et al. Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation* 1995;92(9):2426-31.
- Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. *Circulation* 2005;111(3):363-8.
- Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* 1993;13(2):197-204.
- Li W, Przybyski R. Oxidation products formed from phytosterols. *Inform* 1995;6:499-500.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420(6917):868-74.
- Lottenberg AM, Nunes VS, Nakandakare ER, et al. Food phytosterol ester efficiency on the plasma lipid reduction in moderate hypercholesterolemic subjects. *Arq Bras Cardiol* 2002;79(2):139-42.

- Luc G, Bard JM, Juhan-Vague I, et al. C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen as predictors of coronary heart disease: the PRIME Study. *Arterioscler Thomb Vasc Biol* 2003;23(7):1255-61.
- Ma Y, Hébert JR, Li W, et al. Association between dietary fiber and markers of systemic inflammation in the Women´s Health Initiative Observational Study. *Nutrition* 2008;24(10):941-9.
- Mahley RW, Huang Y. Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. *J Clin Invest* 2007; 117(1):94-8 .
- Maier W, Altwegg LA, Corti R, et al. Inflammatory markers at the site of ruptured plaque in acute myocardial infarction: locally increased interleukin-6 and serum amyloid A but decreased C-reactive protein. *Circulation* 2005;111(11):1355-61.
- Mannarino E, Pirro M, Cortese C, et al. Effects of a phytosterol-enriched dairy product on lipids, sterols and 8-isoprostane in hypercholesterolemic patients: A multicenter Italian study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009;19(2):84-90.
- Meade TW, Mellows S, Brozovic M, et al. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet* 1986;2 (8506):533-7.
- Mel´nikov SM, Seijen ten Hoorn JW, Bertrand B. Can cholesterol absorption be reduced by phytosterols and phytostanols via a cocrystallization mechanism? *Chem Phys Lipids* 2004;127(1):15-33.

- Mellies MJ, Ishikawa TT, Glueck CJ, et al. Phytosterols in aortic tissue in adults and infants. J Lab Clin Med 1976;88(6):914-21.
- Menotti A, Lanti M, Kromhout D, Blackburn H, et al. Forty-year coronary mortality trends and changes in major risk factor in the first 10 years of follow-up in the seven countries study. *Eur J Epidemiol* 2007;22:747-54.
- Miettinen TA, Gylling H, Strandberg T, Sarna S. Baseline serum cholestanol as predictor of recurrent coronary events in subgroup of Scandinavian simvastatin survival study. Finnish 4S Investigators. *BMJ*. 1998;316(7138):1127-30.
- Miettinen TA, Puska P, Gylling H, et al. Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hipercholesterolemic population. *N Engl J Med* 1995;333(20):1308-12.
- Miettinen TA, Railo M, Lepäntalo M, Gylling H. Plant sterols in serum and in atherosclerotic plaques of patients undergoing carotid endarterectomy. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(11):1794-801.
- Mitani H, Takimoto M, Bandoh T, Kimura M. Increases of vascular endothelin-converting enzyme activity and endothelin-1 level on atherosclerotic lesions in hyperlipidemic rabbits. *Eur J Pharmacol* 2000;387(3):313-9.
- Moghadasian MH, Frohlich JJ. Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: clinical and experimental evidence. *Am J Med* 1999;107(6):588-94.

- Moghadasian MH, Godin DV, McManus BM, Frohlich JJ. Lack of regression of atherosclerotic lesions in phytosterol-treated apo E-deficient mice. *Life Sci* 1999;64(12):1029-36.
- Moghadasian MH, McManus BM, Pritchard PH, Frohlich JJ. "Tall oil"-derived phytosterols reduce atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(1):119-26.
- Moghadasian MH. Dietary phytosterols reduce cyclosporine-induced hypercholesterolemia in apolipoprotein E-knockout mice. *Transplantation* 2006;81(2):207-13.
- Mok HY, von Bergmann K, Grundy SM. Effects of continuous and intermittent feeding on biliary lipid outputs in man: application for measurements of intestinal absorption of cholesterol and bile acids. *J Lipid Res* 1979;20(3):389-98.
- Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997;349:1436–42.
- Nappo F, Esposito K, Cioffi M, et al. Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. *J Am Coll Cardiol* 2002;39(7):1145-50.
- Nashed B, Yeganeh B, HayGlass KT, Moghadasian MH. Antiatherogenic effects of dietary plant sterols are associated with inhibition of proinflammatory cytokine production in Apo E-KO mice. *J Nutr* 2005;135(10):2438-44.
- Naumann E, Plat J, Kester AD, Mensink RP. The baseline serum lipoprotein profile is related to plant stanol induced changes in serum lipoprotein

cholesterol and triacylglycerol concentrations. *J Am Coll Nutr* 2008;27(1):117-26.

- NCEP: National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106(25):3143-421.
- Nissen SE, Tuzcu EM, Schoechagen P, et al. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352(1):29-38.
- Norata GD, Catapano AL. Molecular mechanisms responsible for the antiinflammatory and protective effect of HDL on the endothelium. *Vasc Health Risk Manag* 2005;1(2):119-29.
- Opgenorth TJ, Wu-Wong JR, Shiosaki K. Endothelin-converting enzymes. *FASEB J* 1992;6(9):2653-9.
- Ostlund RE Jr. Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr* 2002;22:533-49.
- Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 2008;54(1):24-38.
- Papanicolaou DA, Vgontzas NA. Interleukin-6: the endocrine cytokine. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(3):1331-3.

- Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* 2001;103(21):2531–4.
- Patel MD, Thompson PD. Phytosterols and vascular disease. *Atherosclerosis* 2006;186(1):12-9.
- Peterson DW. Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks. *Proc Soc Exp Biol Med* 1951;78(1):143-7.
- Phillips KM, Ruggio DM, Bailey JA. Precise quantitative determination of phytosterols, stanols, and cholesterol metabolites in human serum by capillary gas-liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;732(1):17-29.
- Pinedo S, Vissers MN, von Bergmann K, et al. Plasma levels of plant sterol and the risk of coronary artery disease: the prospective EPIC-Norfolk Population Study. *J Lipid Res* 2007;48(1):139-44.
- Plat J, Beugels I, Gijbels MJ, et al. Plant sterol or stanol esters retard lesion formation in LDL receptor-deficient mice independent of changes in serum plant sterols. *J Lipid Res* 2006;47(12):2762-71.
- Plat J, Brufau G, Dallinga-Thie GM, et al. A plant stanol yogurt drink alone or combined with a low-dose statin lowers serum triacylglycerol and non-HDL cholesterol in metabolic syndrome patients. *J Nutr* 2009;139(6):1143-9.
- Plat J, Mensink RP. Effects of plant stanol esters on LDL receptor protein expression and on LDL receptor and HMG-CoA reductase mRNA expression in mononuclear blood cells of healthy men and women. *FASEB J* 2002;16(2):258-60a.

- Plat J, Mensink RP. Increased intestinal ABCA-1 expression contributes to the decrease in cholesterol absorption after plant stanol consumption. *FASEB J* 2002;16(10):1248-53b.
- Plat J, Nichols JA, Mensink RP. Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J Lipid Res* 2005; 46(11): 2468-76.
- Pollak OJ. Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation* 1953;7(5):702-6.
- Prasad VS, Palaniswamy C, Frishman WH. Endothelin as a clinical target in the treatment of systemic hypertension. *Cardiol Rev* 2009;17(4):181-91.
- Raitakari OT, Salo P, Gylling H, et al. Plant stanol ester consumption and arterial elasticity and endothelial function. *Br J Nutr* 2008;100(3):603-8.
- Ray BK, Chatterjee S, Ray A. Mechanism of minimally modified LDL-mediated induction of serum amyloid A gene in monocyte/macrophage cells. *DNA Cell Biol* 1999;18(1):65-73.
- Redgrave TG. Formation and metabolism of chylomicron. *Int Rev Physiol* 1983;28:103-30.
- Ridker PM, Fonseca FA, Genest J, et al - JUPITER Trial Study Group. Baseline characteristics of participants in the JUPITER trial, a randomized placebo-controlled primary prevention trial of statin therapy among individuals with low low-density lipoprotein cholesterol and elevated high-sensitivity C-reactive protein. *Am J Cardiol* 2007;100(11):1659-64.
- Rosenthal RL. Effectiveness of altering serum cholesterol levels without drugs. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2000;13(4):351-5.

- Sabeti S, Exner M, Mlekusch W, et al. Prognostic impact of fibrinogen in carotid atherosclerosis: nonspecific indicator of inflammation or independent predictor of disease progression? *Stroke* 2005;36(7):1400-4.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, et al. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990;348(6303):732-5.
- Schuetz P, Stolz D, Mueller B, et al. Endothelin-1 precursor peptides correlate with severity of disease and outcome in patients with community acquired pneumonia. *BMC Infect Dis* 2008;8:22.
- Shah PK, Kaul S, Nilsson J, Cercek B. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, part I *Circulation* 2001;104(19): 2376-83 part II. *Circulation* 2001;104(24):2967-74.
- Shah R. Endothelins in health and disease. *Eur J Intern Med* 2007;18(4):272-82.
- Shai I, Pischon T, Hu FB, et al. Soluble intercellular adhesion molecules, soluble vascular cell adhesion molecules, and risk of coronary heart disease. *Obesity* 2006;14(11):2099- 106.
- Shelburne F, Hanks J, Meyers W, Quarfordt S. Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat. *J Clin Invest* 1980;65(3):652-8.
- Shimada K, Fujita M, Tanaka A, et al. Elevated serum C-reactive protein levels predict cardiovascular events in the Japanese coronary artery disease (JCAD) study. *Circ J* 2009;73(1):78-85.

- Siperstein MD, Chaikoff IL, Reinhardt WO. C14 – cholesterol. V. Obligatory function of bile in intestinal absorption of cholesterol. *J Biol Chem* 1952;198(1):111-4.
- Skålén K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, Borén J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. Nature 2002;417(6890):750-4.
- Song C, Shen Y, Yamen E, et al. Serum Amyloid A may potentiate prothrombotic and proinflammatory events in acute coronary syndromes. *Atherosclerosis* 2009;202(2):569-604.
- Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* 2002;8(11): 1211-7.
- Takahashi K, Takeya M, Sakashita N. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Med Electron Microsc* 2002;35(4):179-203.
- Tan MS, Lee YJ, Shin SJ e Tsai JH. Oxidized low-density lipoprotein stimulates endothelin-1 release and mRNA expression from rat mesangial cells. *J Lab Clin Med* 1997;129(2):224-30.
- The Scandinavian Simvastatin Survival Study. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. *Lancet* 1994;344(8934):1383-9.
- Tirosh A, Rudich A, Shochat T, et al. Changes in triglyceride levels and risk for coronary heart disease in young men. *Ann Intern Med* 2007;147(6):377-85.

- Tostes RC, Fortes ZB, Callera GE, et al. Endothelin, sex and hypertension. *ClinSci* 2008;114(2):85-97.
- Tracy RP. Thrombin, inflammation, and cardiovascular disease: an epidemiologic perspective. *Chest* 2003;124(3 Suppl):49S-57S.
- Trujillo ME, Sullivan S, Harten I, et al. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(11):5577-82.
- Tschaikowsky K, Sägner S, Lehnert N, et al. Endothelin in septic patients: effects on cardiovascular and renal function and its relationship to proinflammatory cytokines. *Crit Care Med* 2000;28(6):1854-60.
- Valero R, Lorec AM, Paganelli F, et al. Fasting apoprotein B-48 level and coronary artery disease in a population without frank fasting hypertriglyceridemia. *Metabolism* 2005; 54(11):1442-7.
- Vanstone CA, Raeini-Sarjaz M, Jones PJ. Injected phytosterols/stanol suppress plasma cholesterol levels in hamsters. *J Nutr Biochem* 2001;12(10):565-74.
- Verma S, Li SH, Badiwala MV, et al. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation* 2002;105(16):1890-6.
- Von Bergmann K, Sudhop T, Lütjohann D. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *Am J Cardiol* 2005;96(1A):10D-14D.
- Walldius G, Jungner I. Apoliprotein B and apoliprotein A-1: risk indicators of coronary heart disease and targets for lipid-modifyind therapy. *J Intern Med* 2004;255(2):188-205.

- Wanecek M, Weitzberg E, Rudehill A, Oldner A. The endothelin system in septic and endotoxim shock. *Eur J Pharmacol* 2000;407(1-2):1-15.
- Weihrauch JL, Gardner JM. Sterol content of foods of plant origin. *J Am Diet Assoc* 1978;73(1):39-47.
- Weingärtner O, Lütjohann D, Ji S, et al. Vascular effects of diet supplementation with plant sterols. *J Am Coll Cardiol* 2008;51(16):1553-61.
- Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998;97:1837-47.
- Xu D, Emoto N, Giaid A, et al. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyses the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 1994;78(3):473-85.
- Xu H, Uysal KT, Becherer JD, Arner P, Hotamisligil GS. Altered tumor necrosis factor-alfa (TNF-alpha) processing in adipocytes and increased expression of transmembrane TNF-alpha in obesity. *Diabetes* 2002;51(6):1876-83.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332(6163):411-5.
- Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, et al. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(25):16237-42.
- Zilversmit DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* 1979;(3):473-85.

- Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation* 2001;103(9):1194-7.