UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Efeitos da sinvastatina, α -tocoferol e L-arginina sobre os Inibidores
endógenos da óxido nítrico sintase, metabólitos do óxido nítrico e tióis
em pacientes hipercolesterolêmicos**

Edimar Cristiano Pereira

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientador:
Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla

São Paulo
2002

Edimar Cristiano Pereira

**Efeitos da sinvastatina, α -tocoferol e L-arginina sobre os
inibidores endógenos da óxido nítrico sintase, metabólitos do
óxido nítrico e tlóis em pacientes hipercolesterolêmicos**

**Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

**Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla
Orientador/Presidente**

**Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes
1^a Examinador**

**Dr. Marcelo Chiara Bertolami
2^a Examinador**

São Paulo, 27 de março de 2002

**A Deus por estar sempre iluminando
o meu caminho.**

**Aos meus pais, Luiz e Tereza, que me
educaram com tanto carinho e amor e
que me ajudaram a construir o que sou
hoje.**

**Aos meus irmãos Carlos, Marcos e
Alexandre que me incentivaram a
batalhar por um ideal.**

**À minha orientadora Dulcineia pela
amizade, apoio, compreensão, paciência
e orientação.**

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Dra. Ana Campa pela grande amizade, simpatia, incentivo e convívio desses anos todos (graduação e pós-graduação) no laboratório. Ao Dr. Marcelo Chiara Bertolami o meu muito obrigado de coração por colaborar com esse trabalho que, sem o mesmo, não seria possível e a minha admiração pelo profissional que é, de exercer de forma admirável a medicina. Aos demais médicos (em especial ao Dr. André Arpad Faludi) e residentes do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia e aos funcionários do Ambulatório de Lípidos, Vera, Yara e Beth, que auxiliaram na triagem dos pacientes. À Dra. Marina Tavares pelos valiosos ensinamentos em eletroforese capilar. Agradeço a ótima convivência com todos professores do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP e demais departamentos.

A todos voluntários que confiaram e tiveram a gentileza de participarem desse estudo.

Agradeço também aos alunos de pós-graduação, Isabela, Emersom, Joelma, Alvorita, Elaine Apolinário, Simone, Sueli, Rita, Elaine Atanaka e Cristiane, pela saudável convivência.

Aos alunos de iniciação científica Nadjara e Fernanda e as técnicas do laboratório Lizis e Aline que também colaboraram de forma indireta para realização desse trabalho. As secretárias do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Márcia, Sueli, Ana e Dora e ao secretário Jorge, setor de pós-graduação, pela atenção e amizade.

Devo gratidão à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de seu Diretor, Prof. Titular Jorge Mancini Filho, ao departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo, em nome de sua chefe, Profa. Associada Dulcineia S. P. Abdalla e a

coordenadora de pós-graduação em Farmácia - área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de sua presidente, Profa. Primavera Borelli.

O apoio financeiro da FAPESP e as indústrias farmacêuticas BALDACCI e NOVAQUÍMICA que doaram os medicamentos para a realização desse estudo.

E a todos aqueles que auxiliaram de alguma forma na realização deste trabalho.

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO	01
1.1 - Óxido Nítrico (*NO) vs hipercolesterolemia e disfunção endotelial	01
1.2 - Glutathiona: efeitos na liberação de *NO	05
1.3 - Homocisteína	08
1.4 - Alfa-tocoferol	14
1.5 - Inibidores endógenos da NO sintase	18
1.6 - L-arginina	22
1.7 - Inibidores da HMG-CoA redutase	25
2 - OBJETIVOS	30
2.1 - Objetivo geral	30
2.2 - Objetivos específicos	30
3 - MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 - Pacientes	31
3.1.1 - Critérios de inclusão	31
3.1.2 - Critérios de interrupção do estudo	31
3.1.3 - Critérios de exclusão	32
3.1.4 - Desconfortos e riscos esperados	33
3.1.5 - Origem dos medicamentos	34
3.1.6 - Protocolo	34
3.1.7 - Resumo do protocolo	36
3.2 - Coleta	37
3.3 - Determinação do perfil lipídico	37
3.4 - Determinação da concentração plasmática das vitaminas lipossolúveis (alfa-tocoferol, licopeno, retinol e beta-caroteno)	37

3.5 - Determinação de NOx (nitrato + nitrito)	38
3.6 - Determinação de RSNO (S-nitrosotiol total)	39
3.7 - Determinação da concentração de ADMA, SDMA e L-arginina	40
3.8 - Determinação de tióis (glutathiona, homocisteína, cisteína e metionina)	41
3.9 - Detecção de nitrotirosina total	42
3.10 - Análise Estatística	43
4 - RESULTADOS	44
4.1 - Detecção de ADMA, SDMA e L-arginina	44
4.2 - Detecção de tióis	47
4.3 - Pacientes	52
4.3.1 - Determinação do perfil lipídico dos pacientes	52
4.3.2 - Determinação de antioxidantes lipossolúveis	59
4.3.3 - Determinação de L-arginina, ADMA e SDMA	66
4.3.4 - Determinação de tióis (metionina, cisteína, homocisteína e glutathiona)	70
4.3.5 - Determinação de NOx, nitrotirosina total e RSNO	73
4.4 - Correlações	77
5 - DISCUSSÃO	80
6 - CONCLUSÕES	91
7 - RESUMO	92
8 - ABSTRACT	93
9 - APÊNDICE	94
10 - BIBLIOGRAFIA	96

LISTA DE ABREVIATURAS

*NO - óxido nítrico

*NO₂ - dióxido de nitrogênio

*OH - radical hidroxila

ADMA - dimetilarginina assimétrica

ALBNO - nitroalbumina

Alfa-toc. - alfa-tocoferol

CBS - cistationa-beta-sintetase

cNOS - oxido nítrico sintase constitutiva

DDAH - dimetilarginina dimetilaminohidrolase

DPT - dimetilarginina piruvato transferase

EROs - espécies reativas de oxigênio

GMP - guanilato monofosfato

GSH - glutathiona reduzida

GTP - guanilato trifosfato

HDL - lipoproteína de alta densidade

HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

HPE-LIF - eletroforese capilar de alta performance acoplada ao detector de fluorescência induzida a laser

HPLC - cromatografia líquida de alta performance

iNOS - óxido nítrico sintase indutível

L-arg. - L-arginina

LDL - lipoproteína de baixa densidade

LO^{*} - radical alcóxila

LOO^{*} - radical peróxila

MTHF - metiltetrahidrofolato

NOSc - óxido nítrico sintase constitutiva
NOSi - óxido nítrico sintase indutível
 $O_2^{\bullet -}$ - ânion superóxido
ONOO⁻ - peroxinitrito
oxLDL - lipoproteína de baixa densidade oxidada
PRMT - proteínas metiltransferase
RSNO - S-nitrosotiol
SDMA - dimetilarginina simétrica
SDS - dodecil sulfato de sódio
sGCa - guanilato ciclase solúvel ativa
sGCI - guanilato ciclase solúvel inativa
Sinv. - sinvastatina
SNO-Hb[Fe³⁺] - S-nitroso-hemoglobina
THF - tetraidrofolato
TNF - fator de necrose tumoral
tRNA - ácido ribonucléico transpotador
VLDL - lipoproteína de muito baixa densidade

1. INTRODUÇÃO

1.1 Óxido nítrico (•NO) vs hipercolesterolemia e disfunção endotelial

Existe uma relação inversa entre a produção de •NO e colesterolemia (Hill *et al.*, 1995; Khedara *et al.*, 1996; Kurowska & Carroll, 1998). Em alguns modelos experimentais observa-se que a adição dietética de inibidores da síntese de •NO causa aumento na concentração sérica de triglicerídeos e colesterol total e também uma diminuição na concentração sérica de HDL (Khedara *et al.*, 1996). Estes resultados sugerem que a síntese reduzida de •NO pode ser um dos fatores que levam à hiperlipidemia ou à aterosclerose.

A administração de uma dieta hipercolesterolêmica a coelhos também resulta em menor síntese e/ou atividade do •NO, como observado por uma menor excreção urinária de metabólitos do •NO e uma maior concentração plasmática de inibidores endógenos da •NO sintase nesses animais (Yu *et al.*, 1994; Böger *et al.*, 1995).

A inflamação também está associada à hipocolesterolemia, observando-se uma liberação excessiva de •NO nesta condição. Também existem evidências de que o •NO possa influenciar o metabolismo de lipoproteínas, principalmente da VLDL e da LDL. Verificou-se que o •NO pode reduzir a hipercolesterolemia por afetar o metabolismo de apo B diretamente no fígado, via mecanismo esterol-independente (Kurowska & Carroll, 1998).

A disfunção endotelial inclui a alteração da vasodilatação mediada pelo endotélio. Esse fato se deve à diminuição na síntese ou liberação de •NO e inativação de •NO, principalmente pelo radical superóxido, ou por produtos formados na peroxidação lipídica. O •NO é um radical livre que reage com

outros radicais como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e os radicais peroxila ($LOO^{\bullet}$) e alcóxila ($LO^{\bullet}$), podendo inibir ou potencializar o dano oxidativo causado por estas espécies radicalares (O'Donnell *et al.*, 1997). A reação do $^{\bullet}NO$ com ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) leva à formação de um potente oxidante, o peroxinitrito ($ONOO^-$), que pode se decompor, gerando radicais hidroxila ($^{\bullet}OH$) e dióxido de nitrogênio ($^{\bullet}NO_2$) (Hogg *et al.*, 1993b e 1996; Ohara *et al.*, 1994). Uma importante característica desta reação é que ela não requer a participação de metais de transição (Beckman *et al.*, 1990). Além disso, o peroxinitrito pode reagir com tirosina (livre ou ligada a proteína) e formar a nitrotirosina. Elevadas concentrações de nitrotirosina têm sido detectadas em células espumosas, associadas a lesões ateroscleróticas, em coronárias humanas (Beckman *et al.*, 1990). A exposição da LDL ao peroxinitrito ou, simultaneamente, ao superóxido e óxido nítrico, resulta em várias reações que poderiam contribuir para a oxidação da LDL e a aterogenicidade destas partículas (Hogg *et al.*, 1993a; Graham *et al.*, 1993). A presença de nitrotirosina na urina de indivíduos com aterosclerose e a diminuição do relaxamento das artérias ateroscleróticas de animais e humanos (Minor *et al.*, 1990), são fortes indicadores de que a inativação do óxido nítrico, com a consequente formação de peroxinitrito, possa ocorrer *in vivo*.

Os mecanismos da reação do $^{\bullet}NO$ com radicais lipídicos como o radical peroxila ($LOO^{\bullet}$) ou o radical alcóxila ($LO^{\bullet}$) não estão bem definidos, mas sabe-se que, na ausência de $O_2^{\bullet-}$, esta reação inibe a peroxidação lipídica (Rubbo *et al.*, 1994; O'Donnell *et al.*, 1997). De fato, existe uma correlação entre a maior produção de $^{\bullet}NO$ e a menor suscetibilidade da LDL à oxidação, sugerindo que o $^{\bullet}NO$ tem um importante papel em minimizar a oxidação da LDL (Calo *et al.*, 1998). O poder oxidante ou antioxidante do $^{\bullet}NO$ depende da proporção entre as

concentrações deste radical e as do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A geração simultânea de $O_2^{\bullet-}$ e $\bullet NO$ reduz o potencial antioxidante do $\bullet NO$, uma vez que menos $\bullet NO$ estará disponível para a reação com os radicais $LOO^{\bullet}$ e $LO^{\bullet}$. Uma proporção de $\bullet NO:O_2^{\bullet-} < 1$ aumenta a peroxidação devido à formação de peroxinitrito, mas quando esta proporção é equivalente ou > 1 o $\bullet NO$ inibe a peroxidação lipídica, interrompendo as reações de propagação da cadeia mediada por radicais lipídicos (Rubbo *et al.*, 1994; O'Donnell *et al.*, 1997).

No endotélio, o $\bullet NO$ é sintetizado, a partir da L-arginina, pela óxido nítrico sintase constitutiva (NOSc) (**figura 1**). Esta síntese pode ser inibida pela dimetilarginina assimétrica (ADMA), monometil-L-arginina (L-NMMA) e pelo éster metílico da nitro-L-arginina (L-NAME). Por outro lado, o "shear stress" e alguns agonistas podem estimular a síntese de $\bullet NO$. O óxido nítrico liberado age nas células musculares lisas vasculares, atuando sobre a transformação da forma inativa da guanilato ciclase solúvel (sGCi) para sua forma ativa (sGCa), a qual atua sobre o GTP produzindo cGMP, o que induz o relaxamento muscular. Nas células musculares lisas vasculares, o $\bullet NO$ também pode ser produzido à partir da L-arginina pela óxido nítrico sintase indutível (NOSi), a qual pode ser induzida por estímulos inflamatórios, tais como, TNF (fator de necrose tumoral), IL-1 (interleucina-1) e LPS (lipopolissacarídeo) (Nava *et al.*, 1995). O óxido nítrico liberado do endotélio também inibe a adesão e a agregação plaquetárias.

Figura 1: Síntese do óxido nítrico (•NO) a partir da L-arginina em célula muscular lisa vascular (Nava *et al.*, 1995).

O óxido nítrico, gerado em sistemas biológicos, pode reagir com grupos tióis de proteínas específicas para formar S-nitrosotióis (Stamler *et al.*, 1992). Esta reação pode prolongar a vida média do •NO e preservar sua atividade biológica (Stamler *et al.*, 1992). Os S-nitrosotióis também têm a propriedade de causar relaxamento do endotélio e inibir a agregação plaquetária (Stamler *et al.*, 1992). Outro ponto importante é que os S-nitrosotióis podem sofrer redução e, conseqüentemente, liberar •NO na circulação sistêmica. Nos eritrócitos, o •NO liga-se à desoxi-hemoglobina ($\text{Hb}[\text{Fe}^{2+}]$), formando complexos $\text{Hb}([\text{Fe}^{2+}]\text{NO})$ relativamente estáveis, assim como, converte oxiHb à meta-Hb, convertendo-se em nitrato. O •NO também reage com

grupos sulfidril da hemoglobina formando S-nitroso-hemoglobina (SNO-Hb[Fe³⁺] e SNO-Hb[Fe³⁺]O₂) que, ao contrário da Hb([Fe²⁺]NO), podem liberar •NO durante a passagem dos eritrócitos pela circulação. (Girard *et al.*, 1993).

1.2 Glutathione: efeitos na liberação de •NO

O tripeptídeo L-glutamil-L-cisteinil-glicina (GSH) é o principal tiol encontrado em plantas e animais. A glutathione reduzida (GSH) é sintetizada a partir de L-glutamato, L-cisteína e glicina em 2 etapas catalisadas pela glutamil-cisteina sintase e glutathione sintase. A sua degradação ocorre através da via glutamil-transpeptidase e cisteinil-glicina dipeptidase. A GSH quando oxidada dá origem à glutathione dissulfeto (GSSG), conhecida também por glutathione oxidada. As reações redox são catalisadas por GSH peroxidases, GSSG redutases e glutathione transferases (GST).

A GSH participa em muitos processos biológicos, especialmente na defesa celular contra o estresse oxidativo por redução da ligação dissulfeto de proteínas e outras moléculas ou como captador de radicais livres. A GSH também pode reduzir peróxidos lipídicos, via catálise pela glutathione peroxidase (GPx). Acredita-se que a GSH atue na regulação do estado redox da célula, importante para a modulação da proliferação e diferenciação celular (Gilbert *et al.*, 1995; Creighton *et al.*, 1997).

A GSH tem papel importante na transdução de sinal, na expressão de genes e na apoptose (Arrigo *et al.*, 1999; Sem *et al.*, 1999; Voehringer *et al.*, 1999). Além disso, existe uma relação entre o estado redox dos tióis, a interação glutathione-proteína e a proliferação celular (Cotgreave *et al.*, 1998;

Dröge *et al.*, 1998). Portanto, existem evidências de que a glutathiona pode ter participação no controle de processos que envolvem fosforilases, creatina quinase, anidrase carbônica, ras, glutathiona transferase, GAPDH e outras proteínas (Ziegler *et al.*, 1985; Thomas *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1990; Chai *et al.*, 1991). A família de genes BCL-2, responsável pela apoptose, é influenciada pelo nível de GSH. Vários estudos verificaram correlação positiva entre BCL-2 e GSH (Voehringer *et al.*, 1999). As proteínas de fosforilação têm importante papel na manutenção da cascata de sinalização intracelular. A regulação se baseia nas ações opostas das proteína quinases e proteína fosfatases. Ambas, quinases e fosfatases, apresentam regulação redox. Todas as proteína tirosina fosfatases têm um resíduo cisteína no seu domínio catalítico, que pode ser oxidado. Dessa forma, a inibição das proteína tirosina fosfatases por hidroperóxidos pode resultar na amplificação de sinais intracelulares (Brigelius-Flohé *et al.*, 1999).

O NF- κ B regula uma variedade de genes celulares, particularmente aqueles relacionados às respostas inflamatória e imune. O NF- κ B pode ser ativado por um número variado de agentes (principalmente EROs, IL-1 e TNF). Estudos utilizando N-acetilcisteína, substância que eleva o nível intracelular de glutathiona, verificaram uma inibição do NF- κ B. A AP-1, que está relacionada à proliferação celular e à promoção tumoral, também pode ser modulada pela glutathiona (Arrigo *et al.*, 1999).

A lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox) pode elevar o nível intracelular de GSH. O tratamento de células endoteliais vasculares humanas com LDLox aumenta gradualmente o nível intracelular de GSH (Cho *et al.*, 1999). A LDLox eleva o nível intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) o qual estimula a expressão da gama-glutamylcisteína sintase (gama-GCS), a síntese de GSH, a proteína kinase de ativação mitogênica (MAPK) e

a AP-1-DNA (Cho *et al.*, 1999). A LDLox induz a expressão de γ -glutamylcisteína sintase, mediada por AP-1, resultando no aumento do nível de GSH. A atividade da MAPK, estimulada por EROs, pode estar envolvida na ativação de AP-1. Assim, o aumento de GSH induzido pela LDLox pode fornecer uma proteção contra o estresse oxidativo induzido pela LDLox (Cho *et al.*, 1999).

O desequilíbrio entre oxidantes/antioxidantes parece estar envolvido nas alterações celulares induzidas pela LDLox no processo da aterogênese. Diversos estudos verificaram que a LDLox aumenta a concentração intracelular de GSH em macrófagos e células de músculo liso, sendo este efeito dependente do grau de oxidação da LDLox (Raitakari *et al.*, 1997; Neunteufl *et al.*, 1998). Altas concentrações de GSH também foram observadas nas lesões ateroscleróticas da aorta. Espécies reativas de nitrogênio (ERNs) estimulam a expressão da γ -glutamylcisteína sintetase, via AP-1, promovendo aumento da síntese de GSH (Cho *et al.*, 1999).

Tem sido sugerido que a S-nitrosoglutathione representaria uma forma de armazenamento de $\bullet$ NO, podendo doar o $\bullet$ NO, em determinadas condições (Ji *et al.*, 1999; Hausladen *et al.*, 1999; Mannick *et al.*, 1999). Observações experimentais sugerem que a S-nitrosoglutathione (GS-NO), sob a ação da γ -glutamyltransferase (γ -GTP), pode decompor-se rapidamente à S-nitrosocisteína (Cys-NO), havendo liberação de $\bullet$ NO de ambas as formas (GS-NO e Cys-NO) (Kashiba *et al.*, 1999). O peroxinitrito (ONOO $\cdot$) também pode reagir com a GSH, formando um produto intermediário, o qual libera $\bullet$ NO (Balazy *et al.*, 1998).

A concentração de homocisteína pode ser modulada através da administração de drogas que estimulam a produção de GSH. Neste sentido,

Overbo *et al.* (2000) demonstraram que, em ratos, a administração de N-acetilcisteína induziu aumento do nível plasmático de GSH e queda significativa da concentração de homocisteína.

1.3 Homocisteína

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido sulfurado, cujo metabolismo está situado entre duas vias metabólicas: remetilação e transulfuração (**figura 2**). Na remetilação a homocisteína adquire um grupo metil da N-5-metiltetraidrofolato (MTHF) ou de betaína para formar a metionina. A reação com MTHF acontece em todos os tecidos e é dependente de vitamina B₁₂, enquanto que a de betaína ocorre principalmente no fígado (e rins, em humanos). Na via de transulfuração a homocisteína se condensa com serina para formar a cistationa por meio de uma reação irreversível, dependente de piridoxal 5 fosfato (vitamina B₆), formando ao final a cisteína (Bostom & Lathrop, 1997). A betaína, trimetilglicina, é o substrato para a enzima betaína-homocisteína metiltransferase, que assim como a enzima metionina sintetase, é capaz de realizar a remetilação de homocisteína e está ativa apenas em fígado e rins, em humanos. Por auxiliar na conversão de homocisteína à metionina, a betaína é considerada um composto de incremento à metilação (Mc Kever *et al.*, 1991).

Os tecidos animais contém alguns tióis na forma livre, mas a maior parte destes compostos ocorrem como homocistina (um dissulfeto da homocisteína), o dissulfeto misto homocisteína-cisteína e a homocisteína ligada a proteínas por ligações dissulfeto (Finkelstein & Martin, 2000).

A hiperhomocisteinemia (HiperHcy) pode ser classificada como leve, moderada e severa, de acordo com as concentrações plasmáticas de 16 a 30, entre 31 e 100 e maiores que 100 μM , respectivamente. As manifestações clínicas da hiperhomocisteinemia severa incluem anormalidades neurológicas, retardo mental, episódios recorrentes de tromboembolismo e doenças vasculares na infância (kang *et al.*, 1996).

Na maioria dos casos a hiperhomocisteinemia em uma população em geral, pode surgir de defeitos genéticos relacionados à codificação de enzimas integrantes do metabolismo da homocisteína ou de deficiências em vitaminas necessárias ao processo. Assim, a concentração de homocisteína vai depender da via metabólica defeituosa: um problema na via de remetilação, que pode ser causado por alteração na codificação da MTHF redutase ou deficiência de folato e vitamina B₁₂, levará a um aumento substancial na concentração plasmática de homocisteína no jejum, enquanto que um problema na via de transulfuração poderá levar a um leve aumento na concentração plasmática de homocisteína, por erros na codificação da cistationa-beta-sintetase (CBS) ou deficiência de vitamina B₆ (Bostom & Lathrop, 1997).

Dentre as causas genéticas da hiperhomocisteinemia, a heterozigose para deficiência de CBS e MTHFR apresentam prevalências de 1 e 0,5% na população em geral, respectivamente. A presença da homozigose para a deficiência de MTHFR, a chamada variante termolábil, está presente em mais de 5% da população em geral e em 14 a 17% dos pacientes com doenças vasculares (kang *et al.*, 1992).

Figura 2: Ciclo da metionina mostrando a relação da homocisteína com as vias de transulfuração e remetilação (Dennis & Robinson, 1996).

Existe um mecanismo celular de exportação de homocisteína que complementa seu catabolismo. Devido a esse mecanismo o plasma normalmente contém uma pequena quantidade de homocisteína (~10 µM). Quando, por alguma razão, o metabolismo de homocisteína é interrompido há uma exportação da substância acumulada no interior da célula para o sangue. Esse processo inibe a toxicidade intracelular, mas expõe o meio vascular aos efeitos deletérios do excesso de homocisteína (Bostom & Lathrop, 1997).

A homocistinúria é uma erro inato do metabolismo da metionina que se caracteriza pelo desenvolvimento prematuro da arteriosclerose. Um dos principais fatores na patogênese da arteriosclerose é a modificação oxidativa da LDL. Estudos verificaram que o grau de oxidação da LDL catalisada pelo ferro era diretamente dependente da concentração de homocisteína, o que explicaria o desenvolvimento prematuro de placa arteriosclerótica nessa patologia (Hirano *et al.*, 1994).

McCully (1969), pioneiro nos estudos sobre homocisteína e doenças cardiovasculares, iniciou a elaboração de sua teoria com a observação do caso de um bebê que morreu com 7^{1/2} semanas de vida com sérias lesões arteriais e que apresentava anormalidades no metabolismo de cobalamina, resultando em homocisteinemia, cistationemia e acidemia metilmalônica. As lesões encontradas lembravam aquelas de pacientes com deficiências em cistationa sintetase e as lesões arteriais encontradas foram relacionadas aos efeitos metabólicos de altas concentrações de homocisteína, homocistina ou seus derivados.

A "Teoria da Homocisteína" relacionada à aterosclerose, elaborada pelo autor a partir de então, foi confirmada por trabalho posterior (McCully *et al.*, 1990) onde 194 autópsias, realizadas em casos de diferentes graus de aterosclerose, mostraram que quase 2/3 dos casos graves se desenvolveu sem evidências de elevações de colesterol sérico, diabetes ou hipertensão e em 3/4 do total de casos, com ou sem diabetes e hipertensão, o colesterol sérico se situava abaixo de 200 mg/dL. Assim, o autor questiona a utilidade do colesterol sérico como marcador da presença de lesões ateroscleróticas na maior parte dos casos e sugere estudos prospectivos, que utilizem substâncias capazes de facilitar o catabolismo de homocisteína, e que possam investigar se o controle dos níveis de homocisteína pode diminuir a mortalidade e morbidade provenientes de complicações ateroscleróticas.

Alem das deficiências enzimáticas e vitamínicas, outros fatores podem levar a hiperhomocisteinemia, tais como: idade, sexo, tabagismo (Kang *et al.*, 1986; Glueck *et al.*, 1995), disfunções renais, lupus eritematoso sistêmico, neoplasia maligna (Charke *et al.*, 1991; Nygard *et al.*, 1995; Ueland *et al.*, 1989), uso de medicamentos (metotrexato, óxido nitroso, fenitoína, carbamazepina, ácido nicotínico, colestipol, diuréticos tiazídicos) e outros. As

anormalidades vasculares e hematológicas, associadas com a hiperhomocisteinemia, são eventos pró-aterogênicos e pró-trombóticos. Estas anormalidades incluem: lesão às células endoteliais (evento inicial no desenvolvimento da aterosclerose), aumento da agregação plaquetária (aumento da síntese de tromboxano A₂ e decréscimo da síntese de prostaciclina), anormalidades da fibrinólise (ativação dos fatores V, X e XII e inibição dos anticoagulantes naturais, tais como trombina III e fator C), níveis alterados de fibrinogênio e outros (Mayer *et al.*, 1996; Rees *et al.*, 1993; Tawakol *et al.*, 1997).

Em pacientes com falha renal crônica, onde as complicações ateroscleróticas são a principal causa de morte, observou-se que os níveis de homocisteína são os mais elevados, quando comparados a outros pacientes com doença coronariana (Bostom *et al.*, 1997). Em pacientes diabéticos com a função renal preservada, os níveis plasmáticos de homocisteína apresentam-se normais ou diminuídos, possivelmente devido à hiperfiltração glomerular observada nesses pacientes (Jones *et al.*, 1995). Em contraste, em pacientes diabéticos com proteinúria originada por doença macrovascular, os níveis de homocisteína estão aumentados (Munshi *et al.*, 1996; Agardh *et al.*, 1994; Araki *et al.*, 1993), o que poderia contribuir para o processo aterosclerótico nestes pacientes.

Níveis fisiológicos de homocisteína podem aumentar a ligação das lipoproteínas à fibrina (Harpel *et al.*, 1992), mas a cisteína e outros tióis têm efeito similar. Altas concentrações de homocisteína *in vitro* ativam o fator C (Rodgers *et al.*, 1986), reduzem a ativação da proteína C (Rodgers *et al.*, 1990; Lentz *et al.*, 1991) inativam o cofator de ativação de trombomodulina (Hayashi *et al.*, 1992), causam supressão da trombomodulina (Rodgers *et al.*, 1990), diminuem a expressão de sulfato de heparina e bloqueiam a ativação

de plasminogênio tissular em células endoteliais (Haijar *et al.*, 1993). Além disto, níveis elevados de homocisteína têm sido relacionados à deficiência da vasodilatação dependente do endotélio (Lentz *et al.*, 1996; Tawakol *et al.*, 1997).

A reatividade do grupo sulfidrila da homocisteína tem sido vista como um dos mecanismos envolvidos na ação da homocisteína na aterosclerose. A S-nitrosação da homocisteína pode alterar sua bioatividade, dependendo dos produtos de reação formados. A exposição de células endoteliais à homocisteína por períodos longos (>3h) diminuiu a liberação de EDRF. Em contraste, o mesmo experimento realizado em um tempo menor (15 min), obteve um aumento na liberação de EDRF. A explicação para esse fato é que no primeiro momento ocorre a formação de S-NO-homocisteína (potente antiplaquetário e vasodilatador). Paralelamente, ocorre a liberação de H₂O₂ que degrada a S-NO-homocisteína, gerando a tiolactona da homocisteína, produto tóxico para o endotélio (Stamler *et al.*, 1993). Outro estudo verificou que, na presença de agonistas que liberam •NO, a homocisteína aumenta a produção de RSNO, de forma tempo e dose dependente, o que reflete o aumento da atividade da óxido nítrico sintase. Esses resultados sugerem que a estimulação endógena da liberação de •NO pode amenizar a lesão aterosclerótica, diminuindo o risco aterotrombótico em estados hiperhomocisteinêmicos. A homocisteína reage rapidamente com o •NO para a formação de S-nitroso-homocisteína, que age como um potente agente antiplaquetário e vasodilatador (Stamler *et al.*, 1996). De acordo com este modelo, a lesão vascular seria causada pelo desequilíbrio entre a produção de •NO, originada pela disfunção endotelial, e os níveis de homocisteína.

Em um estudo recente (Hanratty *et al.*, 2001), no qual indivíduos com disfunção endotelial foram suplementados com metionina e homocisteína,

verificou-se que a suplementação com homocisteína apresentou um efeito negativo sobre a função endotelial, enquanto que a suplementação com metionina não alterou esta função. Esses dados suportam a hipótese de que a homocisteína pode promover a aterosclerose por indução de uma disfunção endotelial

Há indícios de que a elevação plasmática de homocisteína poderia estar associada ao estresse oxidativo. Para isso, analisou-se o estado redox, especificamente a concentração de homocisteína e cisteína, em indivíduos hiperhomocisteinêmicos e normohomocisteinêmicos. Os dados demonstraram que o estresse oxidativo não está diretamente relacionado à citotoxicidade da homocisteína, mas sim, ao baixo nível de cisteína (Moat *et al.*, 2001).

No geral, vários estudos indicam uma correlação positiva entre os níveis de homocisteína e as doenças cardiovasculares, mas os mecanismos envolvidos precisam ser melhor elucidados.

1.4 Alfa-tocoferol

Existem oito formas diferentes de vitamina E: α -, β -, γ -, δ - tocoferóis (os quais diferem no número de grupos metílicos no anel aromático e possuem uma cadeia fitil saturada) e α -, β -, γ -, δ -tocotrienóis (os quais também diferem no número de grupos metílico no anel aromático e possuem uma cadeia fitil insaturada) (Kayden & Traber, 1993).

A vitamina E, por ser lipossolúvel, é transportada no plasma pelas lipoproteínas plasmáticas. Em humanos, a absorção intestinal da vitamina E requer a presença de ácidos graxos para a formação de micelas. A absorção é um processo passivo, onde o tocoferol movimenta-se junto com os lípidos

intestinais. Após a captação da vitamina E pelas células intestinais, a vitamina E é secretada ligada aos quilomícrons. Durante a absorção e a secreção da vitamina E não existe discriminação entre as suas diferentes formas, como o α - e γ - tocoferol, ou entre RRR- e SRR- α -tocopherol, os dois estéreo-isômeros do alfa-tocopherol. Durante o catabolismo do quilomicros, a lipase lipoproteica também transfere vitmina E para os tecidos, juntamente com os ácidos graxos. Provavelmente, a vitamina E é transferida para a HDL, a qual transfere esta vitamina para outras lipoproteínas. Os lípides da dieta e a vitamina E que permaneceu nos remanescentes de quilomícrons são então levados ao fígado. A VLDL nascente secretada pelo fígado contém preferencialmente o RRR- α -tocopherol. Outras formas de tocoferol são provavelmente secretados na bile. O fígado não armazena altas concentrações de vitamina E. Uma vez que a VLDL é secretada na circulação, tanto a lipase lipoproteica como a lipase hepática participam na delipidação da VLDL para LDL. Neste processo, uma parte do RRR- α -tocopherol é transferida da VLDL para a LDL e HDL (Kayden & Traber, 1993). O alfa-tocopherol é o principal antioxidante lipossolúvel e se concentra no interior das membranas celulares ou nas lipoproteínas, onde a proteção contra a peroxidação lipídica é extremamente importante (Chow *et al.*, 1991).

A vitamina E é essencial na dieta de humanos e de outros animais, onde sua falta causa uma série de desordens metabólicas e processos patológicos. Esses efeitos podem ser revertidos pela suplementação com antioxidantes sintéticos, o que demonstra que a vitamina E funciona *in vivo* como protetor contra a peroxidação lipídica (Halliwell, 1989).

O alfa-tocopherol pode reagir com oxigênio singlete, ânion radical superóxido e radical hidroxila, bloqueando a ação deletérea destas espécies sobre os lípides de membrana ou sobre as lipoproteínas. No entanto, sua

maior ação antioxidante está relacionada à sua capacidade de reagir com os radicais peroxila e alcoxila, doando um hidrogênio e interrompendo a propagação da cadeia de reação da lipoperoxidação (Chow *et al.*, 1991).

O alfa-tocoferol é a forma mais ativa entre as vitaminas E, exercendo sua ação como antioxidante por sequestrar radicais superóxido e hidroxila e atuar como *chain-breaker* no processo de peroxidação lipídica (Diplock *et al.*, 1997). Na hipercolesterolemia e na aterosclerose, condições associadas ao estresse oxidativo, a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e de LDL oxidada pode prejudicar a função vasodilatadora dependente do endotélio (Gocke & Frei, 1996).

A administração crônica de alfa-tocoferol melhora a reatividade da artéria braquial em pacientes com diabetes mellitus tipo II. Esse efeito parece ser mediado por redução no estresse oxidativo e na regulação intracelular de cálcio e magnésio (Paolisso *et al.*, 2000).

A hipercolesterolemia familiar (HF) e a hiperlipoproteinemia familiar combinada tem como consequência o prejuízo na vasodilatação endotélio-dependente. Observou-se uma melhora na reatividade vascular durante a administração de vitaminas antioxidantes, sugerindo que as espécies reativas de oxigênio e/ou as lipoproteínas oxidadas podem contribuir para as alterações da vasodilatação, em sujeitos com hiperlipidemia (Mietus-Snyder *et al.*, 1998).

No estresse oxidativo, devido a alterações na produção de radicais livres e deficiência de antioxidantes, a vitamina E pode ter um importante papel na modulação da produção de $\bullet\text{NO}$ e na função do endotélio vascular. Desse modo, acredita-se que uma proteção antioxidante diminuída possa alterar a reatividade vascular devido à maior destruição de $\bullet\text{NO}$ por radicais livres derivados de oxigênio, como por exemplo o radical superóxido (Davidge *et al.*, 1998). Tanto

o $\cdot\text{NO}$ como o alfa-tocoferol reagem com o radical peroxila na fase de propagação da peroxidação lipídica; assim, o $\cdot\text{NO}$ pode efetivamente competir com o alfa-tocoferol para o seqüestro deste radical lipídico (O'Donnell *et al.*, 1997). A efetiva atividade antioxidante do $\cdot\text{NO}$ contra a peroxidação lipídica, *in vivo*, depende da síntese e liberação deste radical. Isto é um processo controlado pela regulação da expressão da NO sintase (NOS), pelo substrato (L-arginina) e disponibilidade de cofatores e pela estimulação dependente de receptores de algumas isoformas da NOS. Já a concentração de alfa-tocoferol nos tecidos, bem como sua utilização durante o estresse oxidativo, dependem exclusivamente da ingestão dietética tanto de alfa-tocoferol como de ascorbato (O'Donnell *et al.*, 1997). Alguns estudos (Gorbunov, 1996) sugerem que ocorra uma possível reação direta entre o $\cdot\text{NO}$ e o α -tocoferol, o que poderia ocasionar a oxidação do alfa-tocoferol à alfa-tocoferolquinona e, possivelmente, a depleção do conteúdo de alfa-tocoferol da LDL. Contrariando esta hipótese, foi demonstrado que não há uma reação direta entre $\cdot\text{NO}$ e alfa-tocoferol (Hogg *et al.*, 1993a e 1996), embora a formação simultânea de $\text{O}_2\cdot$ e $\cdot\text{NO}$, com a posterior formação de peroxinitrito, possa oxidar o conteúdo de alfa-tocoferol da LDL. No entanto, o $\cdot\text{NO}$ liberado gradualmente a partir de doadores, não tem este poder oxidante. Portanto, durante a peroxidação lipídica prevalece o efeito inibitório do $\cdot\text{NO}$ sobre a oxidação do alfa-tocoferol (Hogg *et al.*, 1996).

A apoptose pode ter um papel importante na aterogênese. Verificou-se que a LDL oxidada pode atuar como promotor apoptótico na parede arterial e estudos epidemiológicos têm evidenciado que a suplementação com alfa-tocoferol exerce uma maior proteção contra doenças coronarianas (Nigris *et al.*, 2000). A lipoperoxidação no espaço subendotelial tem sido considerada como um fator importante no desenvolvimento da aterosclerose. Um estudo

realizado com camundongos knockout para apo E e com deficiência de alfa-tocoferol, causada pela alteração do gene da proteína de transferência do alfa-tocoferol (Ttpa), demonstrou um aumento de isoprostanos (marcadores de peroxidação lipídica) no tecido aórtico destes animais, associado a uma maior severidade das lesões ateroscleróticas, reforçando a hipótese de que a deficiência de vitamina E favorece a lipoperoxidação, contribuindo para a progressão da aterosclerose (Terasawa *et al.*, 2000).

1.5 Inibidores endógenos da NO sintase

A síntese de $\bullet$ NO pode ser inibida experimentalmente por alguns análogos da arginina, incluindo a dimetilarginina assimétrica (ADMA). Esta é sintetizada endogenamente, possui potente ação vasoconstritora (Vallance *et al.*, 1992 a ; Fickling *et al.*, 1993) e está presente em concentrações nanomolares no plasma humano e em concentrações micromolares na urina humana (Kakimoto & Akasawa, 1970; Vallance *et al.*, 1992 b). O enantiômero do ADMA, o SDMA (dimetilarginina simétrica), também é sintetizado endogenamente e está presente em fluidos biológicos em concentrações equivalentes às de ADMA, mas o SDMA é inativo e não inibe a síntese de $\bullet$ NO (Tojo *et al.*, 1997).

A ADMA é uma substância reguladora da atividade das NOS, competindo com a L-arginina pelas NO sintases (Cooke *et al.*, 1997). Ela tem sido isolada a partir do plasma e urina e os estudos quanto à sua origem ainda não são definitivos, porém indicam que ela é sintetizada e liberada por células endoteliais (Fickling *et al.*, 1993 a; MacAllister *et al.*, 1994).

Em humanos saudáveis, os níveis circulantes de ADMA não são suficientes para inibir a síntese do $\bullet$ NO. Contudo, altas concentrações de ADMA

têm sido implicadas em diversas patologias, tais como: hipertensão (Matsuoka *et al.*, 1997), insuficiência renal crônica (Vallance *et al.*, 1992 b), aterosclerose (Miyazaki *et al.*, 1999) e insuficiência cardíaca (Usui *et al.*, 1998).

Diversos estudos em animais e em humanos mostram que as concentrações plasmáticas de ADMA estão elevadas na hipercolesterolemia e aterosclerose, o que pode explicar, em parte, a diminuição da vasodilatação dependente do endotélio evidente nestas condições patológicas. (Yu *et al.*, 1994; Azuma *et al.*, 1995; Böger *et al.*, 1996; Böger *et al.*, 1998a e 1998b; Miyazaki *et al.*, 1999). As concentrações plasmáticas elevadas de ADMA podem ser explicadas por uma maior síntese endógena ou por uma menor degradação (Böger *et al.*, 1997 a). Sugere-se que a ADMA seja produzida pelas células endoteliais; assim sendo, a síntese aumentada pode ser consequência da disfunção endotelial observada na aterosclerose. Por outro lado, a hidrólise aumentada de proteínas metiladas intracelulares também contribui para a elevação plasmática de ADMA, uma vez que McDermott (1976) demonstrou que as dimetilargininas surgem principalmente da degradação dessas proteínas metiladas (Miyazaki *et al.*, 1999). A peroxidação lipídica *in vivo* resulta em dano oxidativo a proteínas tissulares e pode acelerar a proteólise dessas proteínas metiladas (Chan *et al.*, 2000).

Recentemente, estudos em mamíferos identificaram a atividade de 2 proteínas metiladas diferentes, as arginina metiltransferases do tipo I e II. Quatro isoformas diferentes dessas proteínas foram caracterizadas, aos níveis protéico ou genômico, em células ou tecidos humanos: a PRMT1, a PRMT2, a PRMT3 e a HMRT1L2. Todas elas contribuem para a atividade da metiltransferase tipo I, mas diferem na oligomerização, localização subcelular, especificidade do substrato e regulação (Böger *et al.*, 2000 a).

A maior fonte de grupos metila usados para várias reações é a S-adenosilmetionina, responsável pela conversão da metionina à homocisteína (**figura 3**). Esses grupos metila provenientes da S-adenosilmetionina são incorporados ao ADMA por células endoteliais humanas; portanto, a S-adenosilmetionina é um doador de grupos metila na síntese de ADMA. A inibição das metiltransferases dependentes de S-adenosilmetionina resulta em uma menor formação endotelial de ADMA. Também tem-se observado que a expressão das proteínas arginina N-metiltransferases é regulada na presença de LDL nativa ou oxidada e este efeito é baseado em uma maior atividade da metiltransferase (Böger *et al.*, 2000 a).

Outros estudos indicam que a ADMA altera o comportamento de adesão ao endotélio de células mononucleares circulantes, especialmente monócitos e linfócitos T, em indivíduos hipercolesterolêmicos. A inibição da NOS endotelial pelo ADMA pode contribuir para a maior adesividade destas células, o que pode predispor esses indivíduos à aterosclerose (Chan *et al.*, 2000).

HOMOCISTEÍNA x ADMA

Figura 3: Representação esquemática das vias bioquímicas da demetilação da metionina para a forma homocisteína com a geração de ADMA (Boger *et al.*, 2000b).

A ADMA pode ser excretada pelos rins ou metabolizada à citrulina pela enzima intracelular dimetilarginina dimetilaminohidrolase (DDAH) (**figura 4**), que pode regular a via L-arginina-NO, controlando a degradação de ADMA (Tojo *et al.*, 1997; Miyazaki *et al.*, 1999). Ito *et al.* (1999) revelam que a LDL oxidada ou o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) aumentam a elaboração de ADMA por células endoteliais. Este efeito está associado à diminuição da atividade da DDAH, pois encontrou-se uma menor atividade desta enzima em células endoteliais incubadas com LDL oxidada ou TNF- α . Portanto, pode-se concluir que lipoproteínas ou citocinas podem aumentar a síntese endotelial de ADMA pela atividade reduzida da DDAH. Isto pode levar à acúmulo local ou à liberação de ADMA intracelular e inibição da NOS na hipercolesterolemia (Ito *et al.*, 1999).

METABOLISMO DA ADMA

Figura 4: Metabolismo do ADMA. As argininas metiladas são derivadas das proteínas sob a ação da PRMT (proteína metiltransferase). A DPT (dimetilarginina piruvato transferase) é expressa no rim e pode utilizar o ADMA e SDMA originando α -cetoácidos. Os derivados metilados são encontrados na urina, embora os mecanismos envolvidos na sua formação não estejam esclarecidos (Cooke *et al.*, 2000).

1.6 L-arginina

A L-arginina é o substrato para a NO sintase, enzima responsável pela síntese de $\bullet$ NO. O efeito benéfico da suplementação com L-arginina sobre a produção de $\bullet$ NO e, consequentemente, sobre o aumento na vasodilatação dependente do endotélio, tem sido relatado em vários estudos (Cooke *et al.*, 1992; Lerman *et al.*, 1998).

Os mecanismos de ação da L-arginina ainda não estão bem definidos. Acredita-se que um mecanismo possível para o efeito benéfico da suplementação com L-arginina relaciona-se com a maior produção de $\bullet$ NO

pelo endotélio (Wascher *et al.*, 1997). A suplementação com L-arginina também pode melhorar a função endotelial por mecanismo indireto, através da diminuição da concentração plasmática de endotelina-1, substância vasoconstritora presente em doses elevadas em pacientes com disfunção endotelial (Boulanger & Luscher, 1990). O desequilíbrio entre a produção e a liberação de $\bullet$ NO e endotelina pode alterar a vasodilatação coronariana. O aumento na atividade do $\bullet$ NO, devido à maior oferta de L-arginina, pode inibir ou reduzir a produção de endotelina por uma via dependente de GMP cíclico (Boulanger & Luscher, 1990). Outro mecanismo sugerido para o efeito da L-arginina na vasodilatação independe da síntese de $\bullet$ NO. Sugere-se que a L-arginina possa induzir uma maior liberação de insulina, glucagon e hormônio de crescimento, que podem aumentar o fluxo sanguíneo e a vasodilatação (Böger *et al.*, 1996). Além disso, a L-arginina poderia reduzir a liberação de ânion superóxido, o que favoreceria uma maior biodisponibilidade de $\bullet$ NO (Böger *et al.*, 1995). Sugere-se também que a L-arginina teria uma propriedade antioxidante, que consistiria no sequestro de radicais superóxido, o que reduziria a oxidação da LDL (Wascher *et al.*, 1997).

Um estudo utilizando L-arginina e alfa-tocoferol, em coelhos hipercolesterolêmicos, reduziu a formação de lesões e o espessamento da camada íntima arterial, aumentando o relaxamento dependente do endotélio e reduzindo a progressão das placas ateroscleróticas (Böger *et al.*, 1995).

O processo de isquemia/reperfusão também pode ter seus efeitos deletérios reduzidos com a suplementação de L-arginina. Este efeito protetor foi demonstrado durante a isquemia-reperfusão hepática onde verificou-se um

aumento na liberação de $\bullet\text{NO}$ e uma redução de MDA, além da correção da relação entre TXA(2)/PGI(2) (Wang *et al.*, 2000).

Adicionalmente, em camundongos previamente tratados com lipopolissacárideo (LPS), verificou-se que a suplementação com L-arginina preveniu a disfunção endotelial e a lesão nas artérias dos animais, não havendo nenhum efeito na ativação da coagulação e na expressão do fator tissular (Wiel *et al.*, 2000).

Recentes observações indicam que a L-arginina pode competir com a ADMA, o inibidor endógeno das NO sintases. Provavelmente, esta interação entre L-arginina e ADMA é uma competição direta pela enzima NO sintase. Portanto, em pacientes hipercolesterolêmicos, outro mecanismo pelo qual a suplementação dietética com L-arginina aumenta a síntese endotelial de $\bullet\text{NO}$, pode estar relacionado com a inibição da ação da ADMA sobre as NO sintases (Böger *et al.*, 1998 b).

A associação da L-arginina e um antioxidante tem demonstrado resultados satisfatório sobre a função endotelial em pacientes com hipercolesterolemia e aterosclerose (**figura 5**) (Napoli *et al.*, 2001). O tratamento experimental com L-arginina em animais e em humanos hipercolesterolêmicos eleva a proporção plasmática L-arginina/ADMA. Isso ocorre devido ao aumento das concentrações plasmáticas de L-arginina, pois as concentrações plasmáticas e a depuração renal de ADMA não são afetadas. A maior oferta de L-arginina também repercute em uma maior excreção urinária de nitrato (NO_3^-), o principal metabólito do $\bullet\text{NO}$, indicando sua maior síntese (Bode-Böger *et al.*, 1996; Böger *et al.*, 1998 b). É importante salientar que a suplementação com L-arginina restaura a excreção urinária de nitrato apenas parcialmente, indicando que outros fatores, além de níveis elevados de ADMA, podem contribuir para a menor formação e/ou atividade do $\bullet\text{NO}$ na hipercolesterolemia. A presença de LDL

oxidada pode ser um desses fatores, pois tem-se demonstrado que ela diminui a expressão da NO sintase em células endoteliais. Além disso, um defeito na expressão desta enzima pode explicar a resistência parcial à suplementação com L-arginina (Bode-Böger *et al.*, 1996).

Figura 5: A administração exógena de L-arginina melhora a reatividade vascular na aterosclerose e na hipercolesterolemia. Similarmente, um antioxidante pode reduzir o mecanismo sensível à oxidação e prolongar a ação do NO[•]. O aumento da expressão da eNOS pode melhorar a função endotelial na aterosclerose (Napoli *et al.*, 2001).

1.7 Inibidores da HMG-CoA redutase

Os inibidores da 3-hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase (estatinas), formam o mais novo e mais potente grupo de drogas hipocolesterolemiantes (Grundy *et al.*, 1988; Endo *et al.*, 1992; Dairou *et al.*, 1994 Grundy *et al.*; 1995). Endo *et al.* (1976) descobriram a ação inibitória da mevastatina (ou compactina), extraída de uma cultura do fungo *Penicillium*

citrinum, sobre a HMG-CoA redutase. Quase que simultaneamente, Brown *et al.* (1976) isolaram o mesmo composto, a partir do *Penicillium brevicompactum*. Apesar do efeito hipocolesterolemizante, a mevastatina foi abandonada devido a seus efeitos colaterais (Dairou *et al.*, 1994). Com o passar do tempo, foram desenvolvidos vários compostos de ação semelhante, com menos efeitos tóxicos. A lovastatina (ou mevinolina), extraída do *Aspergillus terreus* (Albers *et al.*, 1980), a sinvastatina (epistatina; sinvinolina; MK 733), derivado semi-sintético obtido a partir da lovastatina (Todd & Goa, 1990), a pravastatina, obtida por transformação microbiana da mevastatina e a fluvastatina, que é um composto totalmente sintético (Tsujita *et al.*, 1986).

Suas moléculas, muito parecidas umas com as outras, apresentam-se muito similares à HMG-CoA, que é a base de seu modo de ação. As estatinas inibem a HMG-CoA redutase, que modula a redução da HMG-CoA ao mevalonato na biossíntese do colesterol (Todd & Goa, 1990). Esta reação química é o passo limitante da síntese do colesterol hepático, seus produtos finais: colesterol, dolicol, ubiquinona e isoprenil tRNA, suprimem a HMG-CoA redutase por um mecanismo de "feed-back" (**figura 6**) (Brown & Goldstein, 1980).

A sinvastatina, droga escolhida para o nosso estudo, compete com a HMG-CoA, inibindo-a irreversivelmente a HMG-CoA redutase. A constante de dissociação para o complexo inibidor-enzima foi reportado como sendo de $1,2 \text{ a } 2,0 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$ (Hoeg & Brewer, 1987; Todd & Goa, 1990). A sinvastatina é mais potente que a lovastatina, mevastatina e pravastatina (Illingworth *et al.*, 1994). Apesar disso, todas estas drogas apresentam uma grande capacidade de inibição enzimática, quando comparadas com a

constante de ligação (K_M) de 4×10^{-6} mol/L para o substrato HMG-CoA (Todd & Goa, 1990).

A hipercolesterolemia está associada com disfunção endotelial e diversos estudos, em animais e em humanos, indicam que a função endotelial melhora com a redução do colesterol sérico (O'Driscoll *et al.*, 1997). Estudos têm sugerido que as estatinas (especialmente a sinvastatina) apresentam um efeito protetor em relação à formação da placa aterosclerótica por outros mecanismos, além daqueles atribuídos à redução do colesterol. A sinvastatina pode prevenir a oxidação de lipoproteínas como a LDL e a HDL (Girona *et al.*, 1999). O mecanismo da ação antioxidante da sinvastatina ainda é desconhecido. Além disso, sabe-se que a sinvastatina altera a composição química da LDL, tornando-a uma partícula relativamente rica em proteína e pobre em colesterol (Girona *et al.*, 1999).

Figura 6: Regulação por "feed-back" da HMG-CoA redutase (Brown & Goldstein, 1980). As linhas tracejadas indicam inibição.

A sinvastatina poderia também atuar na prevenção e no tratamento da aterosclerose por regular a expressão da eNOS, aumentando a atividade desta enzima e, consequentemente, aumentando a produção endotelial de $\bullet\text{NO}$. Os mecanismos pelos quais a sinvastatina aumenta a expressão da eNOS, podem envolver um aumento na estabilidade do RNAm da eNOS e/ou a reversão do efeito inibitório da LDL oxidada sobre a expressão da eNOS (Laufs *et al.*, 1998). As estatinas podem prevenir a ação inibitória exercida pela LDL sobre o mRNA da eNOS e outras proteínas, modulando o tônus vascular através da expressão de fatores vasoativos (Hernandez-Perera *et al.*, 1998). Os eventos obstrutivos vasculares (trombooses) também podem ser minimizados pelo uso

de estatinas por inibição da agregação plaquetária e a manutenção do equilíbrio favorável entre os eventos protrombótico e fibrinolítico (Rosenson *et al.*, 1998).

A inibição da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) redutase resulta em diminuição do processo inflamatório, além da diminuição dos níveis de colesterol e, conseqüentemente, da incidência de infarto do miocárdio. Em camundongos, submetidos a um modelo clássico de processo inflamatório (indução de edema na pata por carragenina), constatou-se uma diminuição do edema após a administração de sinvastatina. Esses dados suportam a hipótese de que a sinvastatina tem uma atividade anti-inflamatória (Sotiriou *et al.*, 2000). Ferro *et al.* (2000) sugeriram que a ação anti-inflamatória da sinvastatina se deve à inibição da expressão de citocinas pro-inflamatórias, como o TNF e a IL-1beta, pelos monócitos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo é avaliar o efeito da sinvastatina, α -tocoferol e L-arginina sobre os inibidores endógenos da óxido nítrico sintase, metabólitos do óxido nítrico e tióis em pacientes hipercolesterolêmicos.

2.2 Objetivos específicos

Estudar nas 4 etapas do estudo, a saber: 1) basal (sem medicação); 2) sinvastatina (20 mg/dia); 3) sinvastatina (20 mg/dia) + alfa-tocoferol (400 UI/dia) e 4) sinvastatina (20 mg/dia) + L-arginina (7 g/dia), as seguintes variáveis:

- As concentrações plasmáticas de tióis (glutathiona, homocisteína, cisteína e metionina);
- As alterações dos níveis de antioxidantes lipossolúveis (α -tocoferol, licopeno, beta-caroteno e retinol) no plasma;
- As concentrações plasmáticas de L-arginina, ADMA (dimetilarginina assimétrica) e SDMA (dimetilarginina simétrica);
- A concentração plasmática de NO_x (nitrato + nitrito);
- A concentração plasmática de RSNO (S-nitrosotiol total);
- O perfil lipídico (colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol e triglicérides);
- A formação de nitrotirosina no plasma.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Pacientes

Os pacientes do estudo (pacientes hipercolesterolêmicos) foram triados no Ambulatório de Lípidos do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia pelo Dr. Marcelo Chiara Bertolami e acompanhados pelo mesmo no decorrer da pesquisa. Todos os pacientes foram previamente informados sobre a utilização do material biológico para realização do trabalho e participaram como voluntários. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo e pelo Comitê de Ética do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (Apêndice).

3.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo todos aqueles pacientes que apresentarem uma ou mais das seguintes características:

- Sexos: masculino e feminino;
- Raça: sem distinção;
- Faixa etária: 21 a 60 anos;
- Colesterol total > 200 mg/dL;
- LDL-colesterol > 130 mg/dL;
- Não fumante.

3.1.2 Critérios de interrupção do estudo:

Foram retirados do estudo todos aqueles pacientes que:

- Não desejavam mais participar do estudo;

- Foram hospitalizados, neste caso a causa principal do internamento foi informada;
- Sofreram eventos adversos sérios, definidos como:
 - a) inesperados, em termos da história do paciente, dos achados físicos e dos fatores de risco;
 - b) sérios, que podem causar a morte, ameaçam a vida e provocam incapacidade permanente ou significativa, levam à hospitalização ou ao prolongamento dessa hospitalização ou provocam câncer.

3.1.3 Critérios de Exclusão:

Os critérios de exclusão estão relacionados primeiramente com as contra-indicações absolutas para o uso de sinvastatina, L-arginina ou vitamina E, e com a presença de outros problemas médicos que poderiam interferir com a participação no ensaio, ou, levar à impossibilidade de se completar o ensaio. Dessa forma, foram excluídos do estudo todos os pacientes que apresentarem as seguintes características:

- Diabetes Mellitus;
- Obesidade IMC >30;
- Doença coronariana;
- Insuficiência renal ou hepática;
- Consumo de álcool superior a 10 doses/semana;
- TG >350 mg/dl;
- Uso atual de L-arginina ou de vitamina E e a impossibilidade de interromper estes medicamentos por 30 dias, ou, hipersensibilidade conhecida à sinvastatina, à L-arginina ou à vitamina E;

- Qualquer outra doença importante não cardíaca que possa reduzir a expectativa de vida ou interferir com a participação no estudo.

3.1.4 Desconfortos e riscos esperados

1. Alfa-tocoferol: de acordo com a literatura pesquisada, dosagens inferiores a 4 g/dia (o que corresponde a aproximadamente 6000 UI/dia) não constituem risco algum para os pacientes (Goodman & Gilman, 1991).
2. L-arginina: não há relato de riscos com o uso deste medicamento.
3. Sinvastatina: A sinvastatina é, em geral, bem tolerada. A maioria dos efeitos colaterais é leve e transitória. Menos de 2% dos pacientes foram retirados dos estudos clínicos controlados devido a efeitos colaterais atribuíveis à sinvastatina. Em uma etapa preliminar destes estudos controlados, os efeitos adversos que ocorreram com frequência de 1% ou mais, considerados pelo investigador como possível, provável ou definitivamente relacionados ao medicamento foram: dor abdominal, constipação e flatulência. Outros efeitos colaterais que ocorreram em 0,5% a 0,9% dos pacientes foram astenia e cefaléia. Miopatia foi relatada raramente. Os seguintes efeitos colaterais adicionais foram relatados em estudos clínicos não controlados ou no uso rotineiro da sinvastatina: náusea, diarreia, erupção cutânea, dispepsia, alopecia, tontura, câibra muscular, mialgia, pancreatite, parestesia, neuropatia periférica, vômitos, prurido e anemia. Raramente ocorreu rabdomiólise e hepatite/icterícia. Uma síndrome de hipersensibilidade aparente que inclui alguns dos achados a seguir, foi raramente relatada: angioedema, síndrome do tipo lúpus, polimialgia reumática, vasculite, trombocitopenia, eosinofilia, aumento do VHS, artrite, artralgia, urticária, fotosensibilidade, febre,

vermelhidão, dispnéia e mal estar (Dicionário de Especialidade Farmacêuticas (DEF) - 24^o edição 95/96).

4. Sinvastatina + alfa-tocoferol: não há relato de riscos com o uso dessa associação.
5. Sinvastatina + L-arginina: não há relato de riscos com o uso dessa associação.
6. Coleta: A coleta de sangue por via endovenosa pode causar hematoma, tromboflebite, tontura, desmaio e dor local (Roberto A. A. Moura Colheita de Material para Exames de Laboratório *Livraria Aheneu* 1987).

3.1.5 Origem dos medicamentos:

A sinvastatina, nome comercial Sinvascor[®], e a L-arginina foram fornecidas pela indústria farmacêutica BALDACCI. O alfa-tocoferol, nome comercial *E-Radicaps*[®], foi fornecida pela indústria farmacêutica NOVAQUÍMICA.

3.1.6 Protocolo

O estudo consta de 16 pacientes hipercolesterolêmicos e as coletas de sangue foram realizadas após cada etapa (quatro etapas no total):

1^o etapa: Sem medicação hipolipemiante (basal);

2^o etapa: Medicação hipolipemiante (sinvastatina);

3^o etapa: Medicação hipolipemiante (sinvastatina) associada ao suplemento de alfa-tocoferol;

4^o etapa: Medicação hipolipemiante (sinvastatina) associada ao suplemento de L-arginina

Cada etapa do estudo, com exceção da 1ª etapa, teve a duração de 2 meses. A duração do "wash out" entre as etapas 3 e 4 foi de 30 dias, mantendo-se somente o uso da sinvastatina nesse período.

3.1.7 Resumo do protocolo

Número de pacientes hipercolesterolêmico: n = 16

3.2 Coleta

O sangue foi coletado, após 12 horas de jejum, em tubos Vacutainer[®] contendo EDTA como anticoagulante (1 mg/mL). Em seguida, o sangue foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos, a 4°C, para a obtenção do plasma e armazenado em freezer -80°C até a realização das análises.

3.3 Determinação do perfil lipídico

As determinações plasmáticas do colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol e triglicérides, bem como as enzimas hepáticas (TGO, TGP e gama-GT), fosfatase alcalina, ácido úrico, uréia, CPK, sódio, potássio e glicose foram realizadas no Laboratório Clínico do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

3.4 Determinação da concentração plasmática das vitaminas lipossolúveis (alfa-tocoferol, licopeno, retinol e beta-caroteno)

As concentrações de alfa-tocoferol, licopeno, retinol e beta-caroteno nas amostras de plasma dos pacientes foram determinadas por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). A extração dos antioxidantes lipossolúveis do plasma foram realizada pela adição de 0,25 ml de SDS 4 mM a 0,25 ml de amostra (plasma) em um tubo de extração protegido da luz, agitando-se por 10 segundos no vortex; em seguida adicionou-se 1 ml de metanol, agitando-se novamente por 1 minuto. A seguir, adicionou-se 1,5 ml de hexano contendo

BHT (0,5 g/l) e agitou por 2,5 minutos; o material foi centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm e o sobrenadante retirado (hexano) para evaporação no nitrogênio. Após secagem, ressuspendeu-se com 0,25 ml de fase móvel, com filtração em filtro Millex 0,22µm (Millipore) e foram injetadas no cromatógrafo. A determinação dos antioxidantes lipossolúveis foram feitas utilizando o sistema cromatográfico com detector eletroquímico com potencial de +600mV (detecção de alfa-tocoferol) e UV (detecção de licopeno, retinol e beta-caroteno). A coluna utilizada foi a de fase reversa C18 CG Nucleosil (CG do Brasil S/A) com fluxo de 1,0 mL por minuto da fase móvel composta por metanol:acetonitrila:clorofórmio (35:35:30, v/v/v) contendo perclorato de lítio 20 mM (necessária para a detecção eletroquímica). A curva de calibração dos antioxidantes lipossolúveis e a quantificação das amostras foram estabelecida com injeção de 20 µL (Thurnhan *et al.*, 1988).

3.5 Determinação de NOx (nitrato + nitrito)

Utilizou-se o equipamento NOATM280 (Sievers, USA), um detector de alta sensibilidade para determinação de •NO baseado na reação de quimioluminescência entre •NO e ozônio (fase gasosa):

A redução do nitrato com cloreto de vanádio, em ácido clorídrico, foi usado para converter nitrato em $\bullet\text{NO}$. A redução foi feita a 90°C.

As curvas de calibração com níveis múltiplos foram realizadas com padrão externo (nitrato de sódio, Aldrich cod. 22,134-1), utilizando-se o software Bag Program (versão 2.2, Sievers, USA). As amostras foram extraídas com etanol gelado (0,5 mL de amostra e 1,0 mL de etanol a 0°C). Após agitação no vortex, a solução foi deixada trinta minutos no gelo e então centrifugada a 14.000 RPM por cinco minutos. O sobrenadante foi retirado e analisado no equipamento NOATM280 (Sievers, USA).

3.6 Determinação de RSNO (S-nitrosotiol total)

Para a determinação de S-nitrosotiol total utilizou-se como padrão o S-nitroso-albumina (SNO-Alb).

Preparação do padrão de SNO-Alb.

A síntese de NOS-Alb foi obtida através da reação de 1 mM de nitrito com albumina humana a 47,4 mg/mL (140-280 uM de tiol) em HCl 0,1 M. Incubou-se por 2 horas no escuro e em seguida mediu-se a absorbância diluído 1:10 em 336 nm ($\epsilon = 3874 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Park & Kostka, 1996).

Cálculo da concentração de SNO-Alb: $C = \text{Abs} \times \text{diluição} / \epsilon$

A curva de calibração foi feita com 10, 50, 100, 250 e 500 nM de SNO-Alb.

Preparo da amostra:

Em 1,0 mL de plasma (EDTA) adicionou-se 10 uL de NEM 500 nM, Após homogeneizar, adicionou-se 100 uL de sulfanilamida 1% e agitou-se. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em gelo até a análise.

Injeção das curvas e amostras no analisador de NO:

Utilizou-se o equipamento NOATM280 (Sievers, USA). A solução de reação foi composta por 8 mL de ácido acético glacial, 2 mL de KI 50 mg/mL, 300 uL de decanol e 200 uL de CuSO₄ 200 mM a 70 °C. As curvas e as amostras foram analisadas em triplicatas e o volume injetado foi de 500 µl (Marley et al., 2000).

3.7 Determinação da concentração de ADMA, SDMA e L-arginina

O ADMA, SDMA e L-arginina foram determinados pela técnica de Eletroforese Capilar por Fluorescência Induzida a Laser (HPE-LIF). O sangue foi coletado com EDTA (1 mg/ml) e centrifugado a 1.000 g por 10 minutos a 4 °C. Adicionou-se ao plasma L-homoarginina como padrão interno. A curva de calibração foi realizada pela adição dos padrões de ADMA, SDMA e L-arginina em um pool de plasma. As amostras e o padrão foram precipitados com etanol e em seguida derivatizados com 5-isotiocionato fluoresceína. A injeção foi feita sob pressão (1 psi.seg), sendo a corrida realizada em um capilar de sílica fundida (85 cm comprimento e 50 µm (diâmetro interno) a 20

kV. O tampão de corrida foi composto por 50 mM de ácido bórico e 20 mM ácido 3-(ciclohexilamino)1-propanosulfônico. O detector de fluorescência induzida por laser operou em 488 nm (excitação) e 515 nm (emissão) (Caussé *et al.*, 2000).

3.8 Determinação de tióis (glutathiona, homocisteína, cisteína e metionina)

Os tióis foram determinados pela técnica de Eletroforese Capilar por Fluorescência Induzida a Laser (HPE-LIF). O sangue foi coletado com EDTA (1 mg/ml) e centrifugado a 1000g por 10 minutos a 4°C para a obtenção do plasma. Em 200 µL de plasma adicionou-se 2 µL de padrão interno (1 mM n-(2-mercaptopropionil)-glicine) e 20 µL de tri-n-butilfosfine 10% (v/v em dimetilformamida). Homogeneizou-se a preparação e incubou-se por 30 minutos a 4 °C. A seguir, adicionou-se 200 µL de ácido tricloroacético 10% contendo 1mM de EDTA dissódico. Homogeneizou-se vigorosamente e centrifugou-se as amostras a 13000 x g por 5 minutos a 4 °C. A 100 µL do sobrenadante, acrescentou-se 100 µL de tampão fosfato 0,5M e ajustou-se o pH para 7,5 com Na₃PO₄ 1M. O derivatizador (5-bromometilfluoresceína) foi adicionado às amostras em um excesso molar de 5 a 10 vezes, incubando-se as preparações por 15 minutos a 60 °C. Após a derivatização, diluiu-se as amostras 1/10 (20 µL do derivatizado em 180 µL de tampão fosfato 0,25 M pH 7,6), injetando-as com uma pressão de 0,5 psi por 1,5 segundo em um capilar de 67 cm, 75 µm de diâmetro interno. A corrida eletroforética foi realizada a 25° C, em 30 kV e polaridade positiva na injeção. O detector de

fluorescência induzida por laser operou em 488 nm (excitação) e 520 nm (emissão). A cada corrida o capilar foi lavado com NaOH 1M (Vecchione *et al.*, 1999).

3.9 Detecção de nitrotirosina total

A nitrotirosina total foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA competitivo) padronizado em nosso laboratório. O anticorpo utilizado foi o anticorpo policlonal anti-nitrotirosina produzido em coelho (Upstate, cod.:06-284). O padrão utilizado foi a albumina bovina nitrada (nitro-albumina), preparada por adição alcalina de peroxinitrito em uma concentração final de 1mM (Radi *et al.*, 1991) à uma solução de albumina bovina (ALB – 1mg/mL). A concentração de nitrotirosina na nitro-ALB foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar $4300\text{ m}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 438 nm, pH 9,0 (Khan *et al.*, 1998). A placa foi sensibilizada com 0,5 µg/mL de ALBNO (100 µL) (concentração aproximada de nitrotirosina de 40 a 60 µM) diluída em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M em pH 9,4 a 37°C, overnight. A placa foi então lavada com 300 µL de tampão TBS (TRIS-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH7,4) contendo Tween 20 (0,6%). Para bloqueio, incubou-se a placa por duas horas a 37°C com 200 µL de tampão TBS contendo 0,05% de Tween 20 e 5% de leite desnatado (longa vida) por poço. Após lavagem da placa com o tampão de lavagem previamente descrito, a placa foi incubada com 100 µL por poço do anticorpo anti-nitrotirosina (diluído 1:1000 em TBS contendo 1% de leite desnatado) mais 100 µL de amostra (as amostras de plasma e albumina nitrada utilizada na curva de calibração devem ser diluídas em TBS

contendo 0,1% de leite) por duas horas a 37°C. A placa foi então lavada e incubada com 100 µL por poço do conjugado (IgG anti-coelho produzido em camundongo conjugado com peroxidase (Stressgen Biotchnologies Corp., diluído 1:5000 em TBS contendo 1% de leite)) por 1 hora a 37°C. Após lavagem, adicionou-se luminol (2,3mM), p-iodofenol (0,9mM) (200µL/poço) e peróxido de hidrogênio (3,9nM) (50µL/poço). A leitura da quimiluminescência produzida foi realizada imediatamente, utilizando-se uma leitora de placas de ELISA para quimioluminecência (LumiCount, Packard, Meriden, USA). Todas as lavagens foram realizadas com o mesmo tampão descrito anteriormente, lavando-se a placa pelo menos quatro vezes. As concentrações da nitrotirosina presente na amostra foram estimadas através da curva de calibração utilizando a albumina nitrada e expressas como equivalentes de nitro-Albumina. Todas as amostras e a curvas de calibração foram realizados em triplicatas. (Chakmakjian *et al*, 1982).

3.10 Análise Estatística

Os resultados foram calculados como média $\pm$ desvio padrão. As comparações das medidas dos pacientes nas diferentes situações foram feitas através da Análise de Variância com medidas repetidas. As comparações de Bonferroni foram utilizadas quando detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes tratamentos.

4 RESULTADOS

4.1 Detecção de ADMA, SDMA e L-arginina

As análises foram feitas com base na metodologia descrita no item 3.5. A **Figura 7** representa o eletroferograma obtido para uma amostra de plasma, na qual detectaram-se ADMA, SDMA e L-arginina por HPE-LIF. O tempo de migração de cada substância foi determinado pela análise de cada padrão separadamente. As curvas de calibração foram feitas com concentrações passíveis de serem encontradas no plasma humano. Nas **Figuras 8, 9 e 10** mostram-se as curvas de calibração com suas respectivas equações de reta e coeficientes de regressão linear (R^2).

Eletroferograma

Figura 7: Eletroferograma de uma amostra de plasma. Condições eletroforéticas: tensão 20 kV; tampão de corrida: 50 mM ácido bórico e 20 mM CAPS, pH 10,0; detector de fluorescência (excitação: 488 nm e emissão: 515 nm)

Curva de calibração da L-arginina

Figura 8: Gráfico da curva de calibração da L-arginina

Curva de calibração do ADMA

Figura 9: Gráfico da curva de calibração do ADMA

Curva de calibração do SDMA

Figura 10: Gráfico da curva de calibração do SDMA

Os coeficientes de regressão linear (R^2) obtidos para L-arginina (0,991), ADMA (0,997) e SDMA (1,000) foram satisfatórios.

4.2 Detecção de tióis

As análises foram feitas com base na metodologia descrita no item 3.7 (**figura 11**). Utilizou-se o equipamento de eletroforese capilar com detector de Fluorescência Induzida por Laser, BioFocus[®], produzido pela Bio-Rad Laboratories Inc. (California - EUA).

Figura 11: Esquema para a determinação de tióis em plasma por HPE-LIF.

Inicialmente, determinamos o tempo de migração para cada tiol. Para isso, cada tiol foi analisado separadamente. A **figura 12** representa o eletroferograma de um plasma onde foram identificados quatro tiois: metionina, homocisteína, cisteína e glutathiona mais o padrão interno (n-2-mercaptopropionil-glicina).

Figura 12: Eletroferograma do plasma. Condições eletroforéticas: tensão 30 kV; tampão de corrida: fosfato 0,25 M, pH 7,6; detector de fluorescência (excitação: 488 nm e emissão: 520 nm)

A seguir, estão os gráficos da curva de calibração dos tiois (metionina, homocisteína, cisteína e GSH) (**figuras 13, 14, 15 e 16**).

Figura 13: Gráfico da curva de calibração da homocisteína

Figura 14: Gráfico da curva de calibração da cisteína

Figura 15: Gráfico da curva de calibração da metionina

Figura 16: Gráfico da curva de calibração do GSH

Em todas as curvas de calibração dos tióis calculou-se a regressão linear para a obtenção da equação da reta e do coeficiente linear. As curvas de calibração mostraram R^2 satisfatórios (metionina: 0,9972 homocisteína:

0,9738 cisteína: 0,9989 GSH: 0,9985), indicando sua validade para a análise de amostras com valores dentro dos intervalos de concentração das curvas.

4.3 Pacientes

Participaram do estudo um total de 16 pacientes hipercolesterolêmicos.

Na **tabela 1** encontram-se a idade média e o sexo dos pacientes estudados.

Tabela 1 - Idade média e sexo dos pacientes estudados.

n = 16	
idade	46,6 ± 8,2
sexo (M/F)	7/9

Os resultados expressam a média ± desvio padrão.

4.3.1 Determinação do perfil lipídico dos pacientes

Na **tabela 2** e nos **gráficos 1 a 6** encontram-se os dados referentes às determinações de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, VLDL-colesterol, LDL-colesterol/HDL-colesterol e triglicérides nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Tabela 2 – Perfil lipídico dos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

	Tratamento	N	Média**	Mediana	Desvio-padrão	Assimetria*	Curtose*
Colesterol Total	Basal	16	284	279	42	1,22	5,51
	Sinvastatina	16	202	189	37	0,49	2,06
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	16	218	207	40	0,32	2,18
	Sinvastatina + L-arginina	15	229	213	40	0,76	2,47
LDL Colesterol	Basal	16	195	188	44	1,59	6,60
	Sinvastatina	16	117	113	27	0,61	3,02
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	16	129	117	36	1,10	3,45
	Sinvastatina + L-arginina	15	137	128	42	1,14	3,86
HDL Colesterol	Basal	16	58	58	8	0,20	2,58
	Sinvastatina	16	57	55	7	1,16	4,04
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	16	61	59	11	1,45	5,76
	Sinvastatina + L-arginina	15	59	58	6	0,32	2,88
Triglicérides	Basal	16	151	153	48	-0,22	2,54
	Sinvastatina	16	137	139	61	1,22	4,52
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	16	142	126	64	0,91	3,41
	Sinvastatina + L-arginina	15	160	154	76	1,22	4,53
VLDL Colesterol	Basal	16	30	31	9	-0,23	2,56
	Sinvastatina	16	27	27	12	1,23	4,51
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	16	28	25	12	0,91	3,42
	Sinvastatina + L-arginina	15	32	31	15	1,21	4,52
LDL/HDL Colesterol	Basal	16	3,38	3,18	0,85	1,39	5,80
	Sinvastatina	16	2,07	2,04	0,50	0,34	2,43
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	16	2,17	1,94	0,66	0,80	2,46
	Sinvastatina + L-arginina	15	2,35	2,02	0,83	1,36	4,13

*Coeficientes utilizados na verificação da veracidade da Distribuição Normal dos dados

** Média = mg/dl

Gráfico 1 - Concentração do colesterol total (mg/dl) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Gráfico 2 - Concentração do LDL-colesterol (mg/dl) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Gráfico 3 - Concentração do HDL-colesterol (mg/dl) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Gráfico 4 - Concentração do triglicérides (mg/dl) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Gráfico 5 - Concentração do VLDL-colesterol (mg/dl) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Gráfico 6 - Relação entre LDL-colesterol e HDL-colesterol nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Em relação às determinações do lipídeos plasmáticos, observamos que as medidas de HDL-colesterol ($p=0,299$), triglicérides ($p=0,615$) e VLDL-colesterol ($p=0,600$) apresentaram valores médios estatisticamente iguais nos diferentes tratamentos. Houve uma diminuição significativa para os valores do colesterol total ($p<0,001$), LDL-colesterol ($p<0,001$) e da relação LDL-colesterol/HDL-colesterol ($p<0,001$) após a administração da sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina. As **tabelas 3 a 5**, resumem as comparações, duas a duas, dessas variáveis nos diferentes tratamentos.

Tabela 3 - Comparações das concentração do colesterol total entre os diferentes tratamentos. (teste de Bonferroni)

Grupos	Nível descritivo (p)	Conclusão
Basal e Sinv.	< 0,001	Basal > Sinv.
Basal e Sinv. + Alfa-toc.	< 0,001	Basal > Sinv. + Alfa-toc.
Basal e Sinv. + L-arg.	< 0,001	Basal > Sinv. + L-arg.
Sinv. e Sinv. + Alfa-toc.	0,348	Sinv. = Sinv. + Alfa-toc.
Sinv. e Sinv. + L-arg.	0,026	Sinv. < Sinv. + L-arg.
Sinv. + Alfa-toc e Sinv. + L-arg.	> 0,999	Sinv. + Alfa-toc = Sinv. + L-arg.

Na tabela acima observa-se que os pacientes apresentaram valores médios basais de colesterol total mais elevados em comparação àqueles encontrados após os três tratamentos. A média dos valores de colesterol total dos pacientes submetidos à sinvastatina + L-arginina foi estatisticamente maior no período em que fizeram uso somente da sinvastatina. As demais comparações entre os diferentes tratamentos não se mostraram estatisticamente significantes.

Tabela 4 - Comparações das concentração do LDL-colesterol entre os diferentes tratamentos. (teste de Bonferroni)

Grupos	Nível descritivo (p)	Conclusão
Basal e Sinv.	< 0,001	Basal > Sinv.
Basal e Sinv. + Alfa-toc.	< 0,001	Basal > Sinv. + Alfa-toc.
Basal e Sinv. + L-arg.	< 0,001	Basal > Sinv. + L-arg.
Sinv. e Sinv. + Alfa-toc.	0,779	Sinv. = Sinv. + Alfa-toc.
Sinv. e Sinv. + L-arg.	0,260	Sinv. = Sinv. + L-arg.
Sinv. + Alfa-toc e Sinv. + L-arg.	> 0,999	Sinv. + Alfa-toc = Sinv. + L-arg.

Os valores médios de LDL-colesterol diminuíram significativamente após os três tratamentos realizados. As demais comparações entre os diferentes tratamentos não se mostraram estatisticamente significantes.

Tabela -5 - Comparações das razão entre LDL-colesterol e HDL-colesterol entre os diferentes tratamentos. (teste de Bonferroni)

Grupos	Nível descritivo (p)	Conclusão
Basal e Sinv.	< 0,001	Basal > Sinv.
Basal e Sinv. + Alfa-toc.	< 0,001	Basal > Sinv. + Alfa-toc.
Basal e Sinv. + L-arg.	< 0,001	Basal > Sinv. + L-arg.
Sinv. e Sinv. + Alfa-toc.	> 0,999	Sinv. = Sinv. + Alfa-toc.
Sinv. e Sinv. + L-arg.	> 0,999	Sinv. = Sinv. + L-arg.
Sinv. + Alfa-toc e Sinv. + L-arg.	> 0,999	Sinv. + Alfa-toc = Sinv. + L-arg.

Na tabela acima, observa-se que os valores médios da razão LDL-colesterol/HDL-colesterol foram menores após os três tratamentos realizados.

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes tratamentos.

4.3.2 Determinação de antioxidantes lipossolúveis

Na **tabelas 6** e nos **gráficos 7 a 10** encontram-se os dados referentes às determinações dos antioxidantes lipossolúveis (α -tocoferol, retinol, licopeno e beta-caroteno) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Tabela 6 - Antioxidantes lipossolúveis nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

	Tratamento	N	Média**	Mediana	Desvio-padrão	Assimetria*	Curtose*
Alfa-tocoferol	Basal	15	29,45	31,40	8,27	-1,32	5,85
	Sinvastatina	16	20,89	21,65	7,66	0,07	4,71
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	15	42,23	40,80	25,32	0,72	3,99
	Sinvastatina + L-arginina	15	25,73	26,40	12,02	0,74	3,85
Retinol	Basal	15	2,49	2,36	0,50	0,83	3,39
	Sinvastatina	15	2,27	2,43	0,69	-0,60	2,39
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	15	2,39	2,19	0,81	0,67	2,30
	Sinvastatina + L-arginina	15	2,62	2,93	0,75	-0,45	1,91
Licopeno	Basal	15	0,93	0,84	0,56	1,79	5,72
	Sinvastatina	16	0,64	0,61	0,26	0,00	3,21
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	15	0,67	0,71	0,30	-0,54	3,06
	Sinvastatina + L-arginina	15	0,81	0,82	0,35	0,05	2,75
Beta-caroteno	Basal	15	0,60	0,46	0,30	0,22	1,50
	Sinvastatina	16	0,55	0,51	0,23	0,64	2,93
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	15	0,64	0,39	0,54	2,44	10,05
	Sinvastatina + L-arginina	15	0,59	0,54	0,18	0,71	2,82

*Coeficientes utilizados na verificação da veracidade da Distribuição Normal dos dados.** Média = μ M

Gráfico 7 - Concentração do α -tocoferol (μM) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Gráfico 8 - Concentração do retinol (μM) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Gráfico 9 - Concentração do licopeno (µM) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Gráfico 10 - Concentração do beta-caroteno (µM) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

As comparações realizadas através da análise de variância, mostraram que não houve diferença estatística para os valores médios das concentrações de retinol ($p=0,615$), licopeno ($p=0,062$) e beta-caroteno ($p=0,602$) em decorrência dos tratamentos. A concentração de α -tocoferol apresentou uma diminuição ($p=0,008$) nos pacientes submetidos ao tratamento com sinvastatina em relação ao basal. As demais comparações não se mostraram estatisticamente significantes (**tabela 7**).

Tabela 7 - Comparações das concentração de α -tocoferol entre os diferentes tratamentos. (teste de Bonferroni)

Grupos	Nível descritivo (p)	Conclusão
Basal e Sinv.	0,008	Basal > Sinv.
Basal e Sinv. + Alfa-toc.	0,769	Basal = Sinv. + Alfa-toc.
Basal e Sinv. + L-arg.	>0,999	Basal = Sinv. + L-arg.
Sinv. e Sinv. + Alfa-toc.	0,116	Sinv. = Sinv. + Alfa-toc.
Sinv. e Sinv. + L-arg.	0,480	Sinv. = Sinv. + L-arg.
Sinv. + Alfa-toc e Sinv. + L-arg.	0,518	Sinv. + Alfa-toc = Sinv. + L-arg.

Na **tabela 8** e nos **gráficos 11 a 14** encontram-se os dados referentes às determinações dos antioxidantes lipossolúveis (α -tocoferol, retinol, licopeno e beta-caroteno) corrigida pela concentração de colesterol total nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Tabela 8 – Concentração dos antioxidantes lipossolúveis, normalizada pela concentração do colesterol total, nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

	Tratamento	N	Média**	Mediana	Desvio-padrão	Assimetria*	Curtose*
Alfa-tocoferol corrigido	Basal	15	10,47	11,31	3,04	-1,32	4,85
	Sinvastatina	16	10,28	10,20	3,21	-0,55	4,81
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	15	20,75	18,13	16,06	1,78	7,48
	Sinvastatina + L-arginina	15	11,04	11,38	4,23	0,06	2,53
Retinol corrigido	Basal	15	0,90	0,91	0,25	0,50	2,68
	Sinvastatina	15	1,18	1,17	0,43	-0,10	1,74
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	15	1,13	1,09	0,44	0,76	2,72
	Sinvastatina + L-arginina	15	1,20	1,26	0,44	-0,36	1,84
Licopeno corrigido	Basal	15	0,32	0,30	0,16	1,32	4,49
	Sinvastatina	16	0,32	0,30	0,16	0,89	5,45
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	15	0,32	0,34	0,15	-0,63	2,71
	Sinvastatina + L-arginina	15	0,36	0,38	0,15	-0,05	2,76
Beta-caroteno corrigido	Basal	15	0,21	0,19	0,10	0,32	2,35
	Sinvastatina	16	0,27	0,26	0,11	0,89	3,19
	Sinvastatina e alfa-tocoferol	15	0,30	0,24	0,26	2,51	10,50
	Sinvastatina e L-arginina	15	0,26	0,26	0,09	0,40	2,64

*Coeficientes utilizados na verificação da veracidade da Distribuição Normal dos dados

** Média = nmol/ mg de colesterol total

Gráfico 11 - Concentração do α -tocoferol (nmol/mg de colesterol) corrigida pela concentração do colesterol total nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Gráfico 12 - Concentração do retinol (nmol/mg de colesterol) corrigida pela concentração do colesterol total nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Gráfico 13 - Concentração do licopeno (nmol/mg de colesterol) corrigida pela concentração do colesterol total nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Gráfico 14 - Concentração do beta-caroteno (nmol/mg de colesterol) corrigida pela concentração do colesterol total nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

As concentrações dos antioxidantes lipossolúveis normalizadas pela concentração de colesterol total, α -tocoferol ($p=0,061$), retinol ($p=0,548$), licopeno ($p=0,495$) e beta-caroteno ($p=0,107$) apresentaram valores médios estatisticamente iguais nos diferentes tratamentos.

4.3.3 Determinação de L-arginina, ADMA e SDMA

Na **tabela 9** e nos **gráficos 15 a 18** encontram-se os dados referentes às determinações da L-arginina, ADMA e SDMA nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Tabela 9 - Determinações de L-arginina, ADMA, SDMA e L-arginina/ADMA nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

	Tratamento	N	Média**	Mediana	Desvio-padrão	Assimetria*	Curtose*
SDMA	Basal	15	0,46	0,42	0,12	1,21	4,51
	Sinvastatina	16	0,45	0,41	0,12	0,79	2,87
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	15	0,42	0,43	0,09	-0,28	1,46
	Sinvastatina + L-arginina	15	0,43	0,37	0,13	0,45	1,64
ADMA	Basal	14	0,56	0,55	0,09	1,11	4,25
	Sinvastatina	15	0,56	0,55	0,08	-0,91	5,36
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	14	0,54	0,51	0,12	1,20	4,38
	Sinvastatina + L-arginina	14	0,51	0,52	0,10	0,85	4,13
L-arginina	Basal	15	28,09	28,29	11,02	-0,24	2,72
	Sinvastatina	16	29,01	31,55	10,84	-0,13	1,55
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	15	32,33	30,08	11,11	0,82	3,39
	Sinvastatina + L-arginina	15	38,48	38,60	14,68	-0,02	2,63
L-arginina/ADMA	Basal	13	50,53	57,96	21,87	0,20	2,45
	Sinvastatina	15	55,14	59,40	24,40	0,20	2,06
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	14	60,53	53,39	23,36	2,35	9,36
	Sinvastatina + L-arginina	14	78,90	75,02	34,13	0,58	3,98

*Coeficientes utilizados na verificação da veracidade da Distribuição Normal dos dados

** Média = μ M

Gráfico 15 - Concentração do SDMA (μM) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Gráfico 16 - Concentração do ADMA (μM) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Gráfico 17 - Concentração da L-arginina (μM) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Gráfico 18 - Razão da concentração da L-arginina e ADMA nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Não houve diferenças para os valores médios das concentrações de SDMA ($p=0,651$), ADMA ($p=0,306$), L-arginina ($p=0,135$) e L-arginina/ADMA ($p=0,220$) entre os diferentes tratamentos.

4.3.4 Determinação de tióis (metionina, cisteína, homocisteína e glutathiona)

Na **tabela 10** e nos **gráficos 19 a 22** encontram-se os dados referentes às determinações dos tióis (metionina, cisteína, homocisteína e glutathiona) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Tabela 10 - Determinações dos tióis nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

	Tratamento	N	Média**	Mediana	Desvio-padrão	Assimetria*	Curtose*
Metionina	Basal	15	26,96	25,59	11,20	1,24	5,32
	Sinvastatina	16	25,17	27,00	9,82	-0,26	1,67
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	15	24,16	24,04	5,59	-0,02	2,84
	Sinvastatina + L-arginina	15	22,68	24,21	9,18	-0,36	2,52
Homocisteína	Basal	15	11,22	11,05	3,28	-0,35	3,20
	Sinvastatina	16	10,45	10,27	3,63	0,12	2,41
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	15	10,18	9,43	3,76	0,57	2,25
	Sinvastatina + L-arginina	15	9,56	8,05	3,63	0,28	1,80
Cisteína	Basal	15	238,62	212,02	59,26	1,38	3,54
	Sinvastatina	16	216,53	212,49	57,38	1,10	4,45
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	15	205,65	190,21	44,17	1,11	3,96
	Sinvastatina + L-arginina	15	207,05	212,11	35,62	0,32	2,12
Glutathiona	Basal	15	9,66	9,69	4,11	0,50	3,47
	Sinvastatina	16	9,01	8,83	4,15	-0,07	2,51
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	15	7,99	8,56	3,60	-0,01	1,43
	Sinvastatina + L-arginina	15	8,14	7,57	3,60	1,37	5,74

*Coeficientes utilizados na verificação da veracidade da Distribuição Normal dos dados

** Média = μ M

Gráfico 19 - Concentração da homocisteína (µM) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Gráfico 20 - Concentração da cisteína (µM) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Gráfico 21 - Concentração da glutatona (µM) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Gráfico 22 - Concentração da metionina (µM) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Não houve diferença estatística para as concentrações de metionina (p=0,460), homocisteína (p=0,687), cisteína (p=0,346) e glutatona (p=0,666) em decorrência dos diferentes tratamentos.

4.3.5 Determinação de NOx, nitrotirosina total e RSNO

Na **tabela 11** e no **gráfico 23** encontram-se os dados referentes às determinações de NOx em todos os grupos estudados.

Tabela 11- Determinações de NOx nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

	Tratamento	N	Média**	Mediana	Desvio-padrão	Assimetria*	Curtose*
NOx	Basal	15	26,37	22,80	12,94	1,00	3,60
	Sinvastatina	16	21,35	16,94	8,97	0,89	2,76
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	15	18,96	17,94	5,44	1,36	5,16
	Sinvastatina + L-arginina	14	17,40	14,42	6,35	0,45	1,49

*Coeficientes utilizados na verificação da veracidade da Distribuição Normal dos dados

** Média = μ M

Gráfico 23 - Concentração de NOx (μM) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Na **tabela 12** e no **gráfico 24** encontram-se os dados referentes às determinações de nitrotirosina total nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Tabela 12 - Determinações de nitrotirosina total nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

	Tratamento	N	Média**	Mediana	Desvio-padrão	Assimetria*	Curtose*
Nitrotirosina	Basal	15	477,38	401,05	242,90	1,62	6,18
	Sinvastatina	16	372,31	349,85	176,45	1,46	6,33
	Sinvastatina + alfa-tocoferol	15	383,71	381,93	140,14	1,06	3,79
	Sinvastatina + L-arginina	15	351,17	351,08	162,88	0,06	1,68

*Coeficientes utilizados na verificação da veracidade da Distribuição Normal dos dados

** Média = nM

Gráfico 24 - Concentração de nitrotirosina (nM) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Na **tabela 13** e no **gráfico 25** encontram-se os dados referentes às determinações de RSNO nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Tabela 13 - Determinação dos S-nitrosotióis (RSNO) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

	Tratamento	N	Média**	Mediana	Desvio-padrão	Assimetria*	Curtose*
RSNO	Basal	13	114,12	100,50	48,76	0,97	3,64
	Sinvastatina	14	71,00	69,50	23,96	0,26	1,62
	Sinvastatina e alfa-tocoferol	13	70,12	70,00	28,83	0,35	2,17
	Sinvastatina e L-arginina	13	80,77	75,50	39,41	-0,15	1,58

*Coeficientes utilizados na verificação da veracidade da Distribuição Normal dos dados

** Média = nM

Gráfico 25 - Concentração de RSNO (nM) nos pacientes tratados com sinvastatina, sinvastatina + α -tocoferol e sinvastatina + L-arginina.

Não se observou diferença estatística para os valores médios de nitrotirosina ($p=0,239$) e NOx ($p=0,055$) em consequência dos tratamentos. No entanto, para os nitrosotióis (RSNO) os pacientes tratados com sinvastatina ($p=0,009$) e sinvastatina + α -tocoferol ($p=0,009$) apresentaram uma diminuição significativa em relação ao basal (**tabela 14**). As demais comparações não se mostraram estatisticamente significantes.

Tabela 14 - Comparações das concentração de RSNO entre os diferentes tratamentos. (teste de Bonferroni)

Grupos	Nível descritivo (p)	Conclusão
Basal e Sinv.	0,009	Basal > Sinv.
Basal e Sinv. + Alfa-toc.	0,009	Basal > Sinv. + Alfa-toc.
Basal e Sinv. + L-arg.	0,078	Basal = Sinv. + L-arg.
Sinv. e Sinv. + Alfa-toc.	> 0,999	Sinv. = Sinv. + Alfa-toc.
Sinv. e Sinv. + L-arg.	> 0,999	Sinv. = Sinv. + L-arg.
Sinv. + α -toc e Sinv. + L-arg.	> 0,999	Sinv. + Alfa-toc = Sinv. + L-arg.

4.4 Correlações

Nas **tabelas 15 a 18** são mostrados os valores dos coeficientes de correlação de Pearson calculados para as variáveis estudadas e os respectivos níveis de significância. Observou-se uma correlação negativa ($r=-0.554$ $p=0.032$) entre as concentrações de L-arginina e nitrotirosina no basal e uma correlação positiva ($r=0.575$ $p=0.020$) entre as concentrações dos metabólitos do óxido nítrico (NOx) e de homocisteína no período de tratamento com sinvastatina.

Tabela 15 - Correlações das variáveis analisadas nos pacientes antes na etapa basal.

	L-arg.	ADMA	C. T.	α-toc.	Homoc.	NOx	Nitrot.	RSNO
L-arg.		r=0.200 p=0.494	r=-0.227 p=0.417					r=0.398 p=0.178
ADMA				r=0.395 p=0.163	r=0.404 p=0.152		r=-0.044 p=0.882	
C. T.		r=-0.210 p=0.472				r=-0.171 p=0.543		r=0.133 p=0.664
α-toc.			r=-0.286 p=0.301		r=0.220 p=0.431			r=-0.271 p=0.370
Homoc.	r=-0.061 p=0.830		r=-0.175 p=0.549			r=-0.175 p=0.533	r=0.173 p=0.537	r=-0.452 p=0.121
NOx		r=-0.476 p=0.085		r=0.303 p=0.272	r=-0.175 p=0.533			
Nitrot.	r=-0.554 p=0.032			r=0.054 p=0.847				

C.T.= Colesterol Total

Tabela 16 - Correlações das variáveis analisadas nos pacientes na etapa de tratamento com sinvastatina.

	L-arg.	ADMA	C. T.	α-toc.	Homoc.	NOx	Nitrot.	RSNO
L-arg.		r=-0.135 p=0.631	r=-0.402 p=0.123					r=-0.318 p=0.267
ADMA				r=0.324 p=0.239	r=-0.159 p=0.571		r=-0.084 p=0.765	
C. T.		r=-0.241 p=0.387				r=0.087 p=0.749		r=0.188 p=0.519
α-toc.			r=0.042 p=0.878		r=0.307 p=0.248			r=-0.397 p=0.160
Homoc.	r=-0.187 p=0.489		r=0.233 p=0.386			r=0.575 p=0.02	r=-0.362 p=0.169	r=0.224 p=0.441
NOx		r=-0.232 p=0.406		r=-0.257 p=0.336	r=0.575 p=0.020			
Nitrot.	r=-0.178 p=0.509			r=0.034 p=0.900				
RSNO								

C.T.= Colesterol Total

Tabela 17 - Correlações das variáveis analisadas nos pacientes na etapa de tratamento com sinvastatina + α -tocoferol.

	L-arg.	ADMA	C. T.	α-toc.	Homoc.	NOx	Nitrot.	RSNO
L-arg.		r=0.247 p=0.395	r=-0.328 p=0.233					r=0.097 p=0.753
ADMA				r=0.098 p=0.739	r=0.474 p=0.087		r=0.024 p=0.935	
C. T.		r=-0.185 p=0.526				r=0.013 p=0.963		r=0.201 p=0.510
α-toc.			r=-0.479 p=0.071		r=-0.026 p=0.925			r=0.313 p=0.297
Homoc.	r=-0.153 p=0.587		r=0.299 p=0.279			r=-0.281 p=0.310	r=-0.110 p=0.696	r=0.164 p=0.593
NOx		r=0.156 p=0.595		r=-0.294 p=0.287	r=-0.281 p=0.310			
Nitrot.	r=0.157 p=0.577			r=0.164 p=0.559				

C.T.= Colesterol Total

Tabela 18 - Correlações das variáveis analisadas nos pacientes na etapa de tratamento com sinvastatina + L-arginina.

	L-arg.	ADMA	C. T.	α-toc.	Homoc.	NOx	Nitrot.	RSNO
L-arg.		r=0.540 p=0.046	r=-0.064 p=0.821					r=0.386 p=0.193
ADMA				r=0.474 p=0.102	r=0.048 p=0.871		r=-0.280 p=0.311	
C. T.		r=0.099 p=0.737				r=-0.151 p=0.621		r=-0.459 p=0.115
α-toc.			r=-0.248 p=0.372		r=0.366 p=0.106			r=0.521 p=0.667
Homoc.	r=-0.185 p=0.509		r=0.274 p=0.324			r=-0.099 p=0.746	r=0.097 p=0.740	r=-0.435 p=0.138
NOx		r=0.402 p=0.174		r=0.402 p=0.203	r=-0.099 p=0.746			
Nitrot.	r=0.084 p=0.766			r=0.211 p=0.441				
RSNO								

C.T.= Colesterol Total

5 DISCUSSÃO

A hipercolesterolemia é um fator de risco importante para a aterosclerose. Apesar de estar bem estabelecido que a alta concentração de colesterol total e da LDL-colesterol é um dos fatores para o desenvolvimento da aterosclerose, os mecanismos relacionados ao desenvolvimento e à progressão da aterosclerose não estão totalmente esclarecidos. Dessa forma, é de extrema importância avaliar-se não apenas o perfil lipídico dos indivíduos, mas também outros parâmetros que poderiam estar relacionados à aterosclerose, tais como: tióis (homocisteína, cisteína, metionina e glutatona), óxido nítrico, antioxidantes lipossolúveis (α -tocoferol, licopeno, beta-caroteno e retinol), inibidores endógeno da óxido nítrico sintase (ADMA), S-nitrosotióis (RSNO) e nitrotirosina.

O uso das estatinas, grupo de fármacos hipocolesterolemiantes utilizado no mundo todo, que têm como ação farmacológica a inibição da enzima 3-hidroxiacetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima limitante para a produção de colesterol endógeno, tem se tornado uma medicação efetiva para a redução do colesterol plasmático (Girona *et al.*, 1999; Sotiriou *et al.*, 2000; Ferro *et al.*, 2000). A sinvastatina (20 mg/dia), fármaco pertencente ao grupo das estatinas que foi escolhida para o estudo, apresentou uma ação redutora da concentração do colesterol total, LDL-colesterol e da relação LDL-colesterol/HDL-colesterol, independente das suplementações. Em contraposição, não se verificou um aumento na concentração do HDL-colesterol. O aumento do HDL-colesterol pela sinvastatina é bastante contraditório. Estudos anteriores também não constataram aumento do HDL-colesterol com a administração de 5 mg/dia de sinvastatina (Itoh *et al.*, 1997) e

com 20 mg/dia sinvastatina (Tomas *et al.*, 2000), em pacientes hipercolesterolêmicos. Entretanto, outros estudos verificaram um aumento significativo com a administração de 10 e 20 mg/dia de sinvastatina (Human *et al.*, 1997) e de 80 mg/dia (Luftjohann *et al.*, 2001). Em contraste, a redução do colesterol total e do LDL-colesterol ocorre com baixas doses de sinvastatina (2,5 mg/dia) (Perreault *et al.*, 2000).

A sinvastatina pode atuar na redução do VLDL-colesterol por estimular o catabolismo e a captação desta lipoproteína pelas células, via receptor, levando à alteração das partículas formadas e na redução dos triglicérides (Sehayek *et al.*, 1994). Sehayek *et al.* (1994), constataram a diminuição do VLDL-colesterol e triglicérides em pacientes hipercolesterolêmicos com o uso de 10 e 40 mg/dia. O mesmo resultado foi obtido utilizando-se 5 mg/dia de sinvastatina (Itoh *et al.*, 1997). No presente estudo, não constatamos uma diminuição significativa nos níveis de VLDL-colesterol e triglicérides pelo tratamento com sinvastatina.

A associação da sinvastatina (20 mg/dia) com a L-arginina (7 g/dia), resultou em um aumento significativo do colesterol total, em relação ao uso da sinvastatina isoladamente. Não há dados anteriormente descritos sobre uma ação hipercolesterolemizante da L-arginina, ou, da sua ação inibitória sobre a sinvastatina ou no catabolismo dos lipídeos. Poderia estar ocorrendo uma certa tolerância à sinvastatina, tendo em vista que a suplementação com a L-arginina foi iniciada após 7 meses de uso contínuo da sinvastatina. No entanto, os possíveis mecanismos envolvidos nesta interação ainda devem ser elucidados.

A hiperhomocisteinemia tem sido considerada como um fator de risco para a aterosclerose (Hirano *et al.*, 1994). A deficiência de ácido fólico, vitaminas do complexo B (B₆ e B₁₂) e a deficiência enzimática relacionada à

via bioquímica da homocisteína, podem ocasionar o acúmulo de homocisteína no plasma (Bostom & Lathrop, 1997). A "Teoria da Homocisteína" relacionada à aterosclerose, desenvolvida por Mc Cully e confirmada pelo mesmo em 1990, levantou o questionamento sobre a utilidade da homocisteína sérica como marcador da presença de lesões ateroscleróticas.

Em nosso estudo, a concentração de homocisteína permaneceu constante durante o tratamento com sinvastatina, em relação ao basal. Recentemente, demonstrou-se que pacientes hipercolesterolêmicos tratados com sinvastatina (20 mg/dia e 40 mg/dia), não apresentaram redução do nível de homocisteína após o tratamento (Sinzinger *et al.*, 2000). No entanto, no estudo de Luftjohann *et al.* (2001), no qual utilizou-se 80 mg/dia de sinvastatina em pacientes hipercolesterolêmicos, verificou-se uma redução significativa na concentração de homocisteína. A associação da sinvastatina com α -tocoferol também não promoveu diferença significativa na concentração de homocisteína plasmática, em relação ao basal e à sinvastatina isolada. Houve uma tendência de diminuição de homocisteína no grupo sinvastatina + L-arginina, em relação ao basal. Não há estudos relatando a diminuição de homocisteína devido à ação direta da L-arginina, ou, em associação com a sinvastatina. O que pode estar ocorrendo é a formação de S-nitrosohomocisteína devido à maior disponibilidade de L-arginina para a formação de $\bullet$ NO que, por sua vez, poderia estar reagindo com a homocisteína para a formação do S-nitrosohomocisteína (Stamler *et al.*, 1992). Isto é reforçado pelo fato de ter havido uma correlação positiva entre as concentrações dos metabólitos de $\bullet$ NO e de homocisteína.

A suplementação com metionina pode aumentar a concentração de homocisteína plasmática (Constans *et al.*, 1999), salientando-se que a sobrecarga de metionina é um teste para se avaliar o risco de doença

cardiovascular (van Guldener *et al.*, 2001). Defeitos genéticos do ciclo "cisteína e homocisteína" são outros fatores que podem aumentar ou diminuir os níveis plasmáticos, tanto da homocisteína como da metionina. No presente estudo, os níveis de metionina não apresentaram diferenças significativas para todos os tratamentos avaliados.

A homocisteína se caracteriza por ter um grupo sulfidríla reativo e, portanto, passível de sofrer oxidação à dissulfeto na presença de oxigênio. Tem-se sugerido que este efeito pró-oxidante seja responsável pela oxidação do LDL-colesterol e um efeito danoso às células vasculares (Parthasarathy *et al.*, 1987). A cisteína também contém um grupo sulfidríla e tem algumas propriedades similares às da homocisteína. A concentração da cisteína no plasma é 25 a 30 vezes maior que a da homocisteína, podendo gerar um estresse oxidativo mais intenso que a homocisteína (Jacobsen *et al.*, 2000), como demonstrado em estudos *in vitro* pela redução de 90% da produção de $O_2^{\bullet-}$, após depleção de cisteína (Heinecke *et al.*, 1987).

Poucos estudos têm analisado a relação entre a cisteína e as doenças cardiovasculares e os que existem são contraditórios. Araki *et al.* (1989), Mansoor *et al.* (1995) e Verhoef *et al.* (1997) mostraram alta concentração de cisteína plasmática em pacientes com doenças cardiovasculares, quando comparados aos controles. Jacob *et al.* (1999) observaram um aumento no nível de cisteína plasmática em pacientes hipercolesterolêmicos sintomáticos com doença cardiovascular, quando comparados aos pacientes assintomáticos, concluindo que a cisteína é um fator de risco para doenças cardiovasculares. Outro estudo polêmico foi realizado por El-Khairi *et al.* (1999), no qual se observou que o nível de cisteína plasmática estava associado com fatores de risco para doenças cardiovasculares, tais como, índice de massa corpórea, idade e pressão arterial. Em um estudo recente, van

den Brandhof *et al.* (2001) avaliaram o efeito da cisteína, mediante eventuais ajustes de outros fatores, principalmente homocisteína, que pudessem confundir os resultados. Neste estudo, realizado com pacientes com oclusão coronariana severa e indivíduos controle (sem doença coronariana), concluiu-se que a associação entre homocisteína e doenças cardiovasculares foi independente da concentração plasmática de cisteína, não oferecendo suporte à hipótese de que a cisteína plasmática seria um fator de risco independente para a aterosclerose coronariana (van den Brandhof *et al.*, 2001). Em nosso estudo, não verificamos diferenças significativas da concentração de cisteína plasmática para os diferentes tratamentos.

A hipercolesterolemia tem como uma das características o aumento do estresse oxidativo. Consequentemente, pode haver o aumento da produção de glutatona devido à presença de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais estimulam a expressão da gama-glutamylcisteína sintase (gama-GCS), enzima essencial para a síntese de GSH (Cho *et al.*, 1999). Através do uso da sinvastatina, devido à redução do colesterol plasmático, e/ou do α -tocoferol, devido à ação antioxidante, poderia haver uma diminuição da geração de EROs que, conseqüentemente, diminuiria a concentração de glutatona. Além disso, a formação de S-nitrosoglutationa (GSNO), a partir da reação do GSH com o $\bullet$ NO (proveniente da suplementação de L-arginina), poderia resultar também na diminuição do nível de glutatona. No entanto, no presente estudo, não verificamos diferenças significativas dos níveis de glutatona para os diferentes tratamentos.

As óxido nítrico sintases são um grupo de enzimas responsáveis pela síntese de $\bullet$ NO a partir da L-arginina. Os inibidores endógenos da óxido nítrico sintase, ADMA (dimetilarginina assimétrica) e SDMA (dimetilarginina simétrica, forma inativa do ADMA), têm se tornado alvo de pesquisas para

algumas patologias, principalmente hipertensão, hipercolesterolemia (Matsuoka *et al.*, 1997), insuficiência renal crônica (Vallance *et al.*, 1992), aterosclerose (Miyazaki *et al.*, 1999) e insuficiência cardíaca (Usui *et al.*, 1998). O ADMA compete com a L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase, apesar da concentração plasmática da L-arginina estar acima do K_M (constante de Michaelis-Menten) da óxido nítrico sintase e em uma concentração bem superior ao do ADMA. Mas mesmo assim, em algumas patologias, o aumento do ADMA pode contribuir para a disfunção endotelial. (Tojo *et al.*, 1993; Cooke *et al.*, 1997). O ADMA se liga à óxido nítrico sintase mas não catalisa a formação de $\bullet NO$ a partir da L-arginina.

O aumento plasmático de ADMA pode ser explicado por uma maior síntese endógena ou por uma menor degradação (Böger *et al.*, 1997 a). Além disso, a hidrólise aumentada de proteínas metiladas intracelulares também contribui para a elevação plasmática de ADMA (Miyazaki *et al.*, 1999). A peroxidação lipídica *in vivo*, fato que ocorre com grande intensidade na hipercolesterolemia, resulta em dano oxidativo a proteínas tissulares e pode acelerar a proteólise dessas proteínas metiladas (Chan *et al.*, 2000). A maior fonte de metila utilizada para várias reações é a S-adenosilmetionina que, entre outras funções, participa na conversão da metionina à homocisteína. A inibição das metiltransferases dependentes de S-adenosilmetionina resulta em uma menor formação endotelial de ADMA. Também tem-se observado que a expressão das proteínas arginina N-metiltransferases é regulada na presença de LDL nativa ou oxidada e este efeito é baseado em uma maior atividade da metiltransferase (Böger *et al.*, 2000 a).

A concentração de ADMA em nosso estudo não apresentou diferença significativa, em relação aos níveis basais, devido aos diferentes tratamentos, embora tenha havido uma tendência de diminuição no grupo sinvastatina + L-

arginina. Apesar de alguns estudos demonstrarem que na hipercolesterolemia ocorre um aumento de ADMA (Tsao *et al.*, 1998; Bode-Boger *et al.* 1996), não existem relatos na literatura sobre um possível efeito inibitório das estatinas ou do alfa-tocoferol sobre a produção ou degradação de ADMA, em pacientes hipercolesterolêmicos. Sabe-se que a suplementação da L-arginina aumenta a relação das concentrações de L-arginina e ADMA (Bode-Boger *et al.*, 1996). Isto promoveria uma maior biodisponibilidade de L-arginina para a sua utilização pela óxido nítrico sintase, em relação ao ADMA (Bode-Böger *et al.*, 1996; Böger *et al.*, 1998 b). O nível elevado de ADMA plasmático em pacientes hipercolesterolêmicos está relacionado com a alteração da reatividade vascular e a suplementação com a L-arginina, poderia promover um melhora na vasodilatação desses pacientes (Boger *et al.*, 1998b).

Para avaliarmos a biodisponibilidade/síntese do $\bullet$ NO determinamos as concentrações plasmáticas de nitrato + nitrito (NOx), S-nitrosotióis e nitrotirosina total. O óxido nítrico, em presença do oxigênio, é rapidamente oxidado à nitrito (Kelm *et al.*, 1988). O nitrito tem sido utilizado como um marcador de produção de $\bullet$ NO. Contudo, o nitrito pode ser convertido à nitrato (> 95 % em 1 hora) (Moshage *et al.*, 1995; Wennmalm *et al.*, 1993; Kelm *et al.*, 1996). A determinação de nitrato + nitrito, comumente chamado de NOx, tem sido utilizada como um marcador da atividade da óxido nítrico sintase e da produção endógena de $\bullet$ NO. Em nosso trabalho, a concentração de NOx apresentou uma tendência de diminuição nos grupos tratados com sinvastatina independente das suplementações em relação ao basal.

A suplementação com L-arginina melhora a relação L-arginina/ADMA (Wascher *et al.*, 1997). É importante salientar que a suplementação com L-arginina restaura a excreção urinária de nitrato apenas parcialmente, indicando que outros fatores, além de níveis elevados de ADMA, podem contribuir para

a menor formação e/ou atividade do $\bullet\text{NO}$ na hipercolesterolemia. A presença de LDL oxidada poder ser um desses fatores, pois tem-se demonstrado que esta diminui a expressão da NO sintase em células endoteliais. Além disso, um defeito na expressão da NO sintase também poderia explicar a resistência parcial à suplementação com L-arginina (Bode-Böger *et al.*, 1996).

Além da redução da concentração do colesterol, as estatinas também reduzem as concentrações dos seus intermediários (isoprenóides). Entre eles se destacam o geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), farnesil pirofosfato e isopentil pirofosfato. Essas moléculas não são simplesmente precursores do colesterol; elas são importante também na sinalização celular. Por exemplo, o GGPP e o farnesil pirofosfato são usados para ancorar muitas proteínas de membranas, dentre elas a proteína G. A ativação da sinalização celular por Rho, a qual se liga à proteína G, desestabiliza o RNAm da eNOS, resultando na redução da sua expressão e na diminuição da produção de $\bullet\text{NO}$. As estatinas previnem a ativação de Rho por interromper a produção de GGPP (Laufs *et al.*, 1998).

A caveolina-1 é uma proteína localizada na cavéola, microdomínio transmembrânico em forma de invaginações, onde também se localizam várias proteínas de sinalização. Uma das principais funções da caveolina-1 é o efluxo do colesterol intracelular para a circulação. Estudos recentes verificaram que a caveolina-1 está relacionado ao alto nível plasmático de LDL-colesterol e que o uso de atorvastatina reduz a expressão dessa proteína. Além disso, a caveolina-1 pode, potencialmente, inibir a eNOS por impedir a interação da eNOS com a calmodulina, mecanismo imprescindível para a formação de $\bullet\text{NO}$ (Ju *et al.*, 1997). Dessa forma, a interação de caveolina-1/eNOS poderia estar relacionada à alteração da produção de $\bullet\text{NO}$ na hipercolesterolemia (Davis & Harrison, 2001; Feron *et al.*, 2001).

A elevação de espécies reativas de nitrogênio, fato que ocorre na hipercolesterolemia, poderia induzir o aumento de nitrotirosina (Balint *et al.*, 2001). Evidências recentes indicam que, quando os níveis de $O_2^{\bullet-}$ e $^{\bullet}NO$ estão aumentados, pode ocorrer a formação de um poderoso oxidante, o peroxinitrito ($ONOO^-$). Este por sua vez pode reagir com a tirosina (livre ou ligada à proteína) e formar a nitrotirosina. Alguns estudos verificaram que os níveis de nitrotirosina estavam aumentados em pacientes hipercolesterolêmicos com aterosclerose, o que indicaria que os níveis elevados de nitrotirosina seriam um indicativo da presença de placas ateroscleróticas já formadas e em progressão (Beckman *et al.*, 1996). No entanto, não constatamos diferenças significativas na concentração plasmática de nitrotirosina total em decorrência dos diferentes tratamentos, havendo apenas uma tendência de diminuição nos pacientes tratados em relação aos níveis basais. No entanto, observou-se uma correlação negativa entre as concentrações de L-arginina e nitrotirosina, o que sugere uma tendência para a inibição da formação de espécies nitrantes decorrente da suplementação com este aminoácido.

Estudos experimentais, comparando coelhos hipercolesterolêmicos (grupo 1), coelhos com uma dieta hipercolesterolêmica (grupo 2) e coelhos com dieta hipercolesterolêmica mais sinvastatina (grupo 3), verificaram que o tratamento com sinvastatina reduziu os níveis de nitrotirosina e a liberação de $O_2^{\bullet-}$ e aumentaram a liberação de $^{\bullet}NO$ (Thakur *et al.*, 2001). Esses dados reforçam o trabalho de Beckman *et al.* (1996), em relação ao fato de que o $^{\bullet}NO$ atuaria como um scavenger para o $O_2^{\bullet-}$, podendo gerar peroxinitrito e, conseqüentemente, a formação de nitrotirosina. A nitrotirosina pode ser formada não somente pela reação da tirosina com o $ONOO^-$, mas também pela reação entre o ácido hipocloroso ($HOCl$) e $NO_2^{\bullet}$. O $HOCl$ pode ser produzido

pela mieloperoxidase, a qual tem sido detectada em lesões ateroscleróticas (Daughery *et al.*, 1994).

O óxido nítrico, gerado em sistemas biológicos, pode reagir com grupos tióis de proteínas específicas para formar S-nitrosotióis (RSNO) (Stamler *et al.*, 1992). Esta reação pode prolongar a vida média do $\bullet\text{NO}$ e preservar sua atividade biológica (Stamler *et al.*, 1992). Os RSNO também têm a propriedade de causar relaxamento do endotélio e inibir a agregação plaquetária (Stamler *et al.*, 1992). Outro ponto importante é que os RSNO podem sofrer redução e, conseqüentemente, liberar $\bullet\text{NO}$ na circulação sistêmica. O $\bullet\text{NO}$ é rapidamente liberado do RSNO via redução por metais de transição, tióis e ascorbato (Jourdeuil *et al.*, 1999).

A concentração de RSNO apresentou uma diminuição significativa nos grupos tratados com sinvastatina e sinvastatina + α -tocoferol, em relação ao grupo basal. Na hipercolesterolemia, a produção de $\bullet\text{NO}$ está aumentada mas a sua biodisponibilidade está prejudicada (Somers *et al.*, 1999). Desse modo, pode haver um aumento na geração de RSNO devido à reação de $\bullet\text{NO}$ com os tióis. Neste estudo, o uso de sinvastatina indicou uma tendência à normalização tanto dos níveis lipídicos, quanto dos metabólitos do $\bullet\text{NO}$ e RSNO.

O α -tocoferol é o principal antioxidante presente nas lipoproteínas que tem como propriedade a inibição da fase de iniciação e propagação da peroxidação lipídica (Traber *et al.*, 1992). O α -tocoferol pode reagir com oxigênio singlete, ânion radical superóxido e radical hidroxila, bloqueando a ação deletérea destas espécies sobre os lípidos de membrana ou sobre as lipoproteínas. No entanto, sua maior ação antioxidante está relacionada à sua capacidade de reagir com os radicais peroxila e alcóxila, doando um

hidrogênio e interrompendo a propagação da cadeia de reação da lipoperoxidação (Chow *et al.*, 1991). Na hipercolesterolemia e na aterosclerose, condições associadas ao estresse oxidativo, a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e de LDL oxidada pode prejudicar a função vasodilatadora dependente do endotélio (Gocke & Frei, 1996). Em nosso estudo, a sinvastatina promoveu uma diminuição da concentração de α -tocoferol plasmático, em relação aos níveis basais. Como o α -tocoferol é transportado quase que na sua totalidade pelas lipoproteínas, esta menor concentração observada com a sinvastatina deve ter ocorrido devido à diminuição das partículas de LDL circulantes. Isto é reforçado pelo fato da concentração de α -tocoferol, corrigida pela concentração de colesterol total, não ter sido modificada.

Estudos complementares deverão ser realizados para se verificar os possíveis efeitos dos tratamentos com sinvastatina, isolada e associado ao α -tocoferol e L-arginina, sobre a reatividade vascular deste grupo de pacientes hipercolesterolêmicos.

6 CONCLUSÕES

- 1 A sinvastatina reduziu significativamente as concentrações do colesterol total e LDL-colesterol e a razão LDL-colesterol/HDL-colesterol.
- 2 O tratamento com sinvastatina, isolada e associada ao α -tocoferol, promoveu diminuição nas concentrações de S-nitrosotióis.
- 3 O tratamento com sinvastatina, isolada ou associada à L-arginina e ao α -tocoferol, não alterou as concentrações plasmáticas dos inibidores endógenos da óxido nítrico sintase, dos metabólitos do óxido nítrico, da nitrotirosina e dos tióis.
- 4 A suplementação com L-arginina não resultou em alteração das concentrações dos metabólitos do óxido nítrico e dos inibidores da óxido nítrico sintase (ADMA e SDMA), embora tenha havido uma tendência de aumento na relação L-arginina/ADMA. O tratamento com sinvastatina associada a L-arginina, aumentou os níveis de colesterol total quando comparada com a sinvastatina isoladamente.
- 5 As suplementações com L-arginina e α -tocoferol não resultaram no aumento das concentrações plasmáticas de L-arginina e α -tocoferol, respectivamente, devido à grande dispersão dos dados obtidos, embora as medianas das concentrações plasmáticas de L-arginina e α -tocoferol tenham sido mais elevadas após as suplementações.
- 6 A correlação negativa entre as concentrações de L-arginina e nitrotirosina, sugere que este aminoácido exerça ação inibitória sobre a formação de espécies nitrantes endógenas.

7 RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da sinvastatina, isolada e associada ao α -tocoferol e à L-arginina, sobre os inibidores endógenos da óxido nítrico sintase, os metabólitos do óxido nítrico e tióis, em pacientes hipercolesterolêmicos. Analisou-se um grupo de 16 pacientes hipercolesterolêmicos que seguiram o seguinte protocolo: período de *washout* (sem medicação), 1 mês; sinvastatina (20mg/dia), 2 meses; sinvastatina (20mg/dia) + α -tocoferol (400U/dia), 2 meses; sinvastatina (20mg/dia, *washout*), 1 mês; sinvastatina (20mg/dia) + L-arginina (7g/dia), 2 meses. A sinvastatina reduziu significativamente as concentrações do colesterol total e LDL-colesterol e a razão LDL-colesterol/HDL-colesterol. O tratamento com sinvastatina, isolada e associada ao α -tocoferol, promoveu diminuição nas concentrações de S-nitrosotióis. A L-arginina associada à sinvastatina, aumentou os níveis de colesterol total quando comparada com a sinvastatina isoladamente. As concentrações plasmáticas de α -tocoferol e L-arginina não aumentaram em decorrência da suplementação, devido à grande dispersão dos dados obtidos, embora as medianas das concentrações plasmáticas de L-arginina e α -tocoferol tenham sido mais elevadas após as suplementações. O tratamento com sinvastatina, isolada ou associada à L-arginina e ao α -tocoferol, não alterou as concentrações dos inibidores endógenos da óxido nítrico sintase (ADMA e SDMA), dos metabólitos do óxido nítrico, da nitrotirosina total e dos tióis analisados.

8 ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of simvastatin, isolated and associated to α -tocopherol and to L-arginine, on the endogenous inhibitors of nitric oxide synthase, on nitric oxide metabolites and thiols, in hypercholesterolemic patients. A group of 16 hypercholesterolemic patients were analysed, according to the protocol: a washout period (without medication) of 1 month, simvastatin (20 mg/day) for 2 months; simvastatin (20 mg/day) + α -tocopherol (400U/day) for 2 months; simvastatin (20 mg/day) for 1 month (washout period), simvastatin (20 mg/day) + L-arginine (7g/day) for 2 months. Simvastatin significantly reduced the concentrations of total cholesterol and LDL-cholesterol, as well as the LDL-cholesterol/HDL-cholesterol ratio. The treatment with simvastatin, alone and associated to α -tocopherol, resulted in a reduction of RSNO concentration. The L-arginine associated with simvastatin, increase the level of total cholesterol as compared with simvastatin alone. The plasma concentrations of α -tocopherol and L-arginine did not increase following supplementation due to the large dispersion of the data obtained, even though the median plasma concentrations of L-arginine and α -tocopherol were elevated after supplementation. Treatment with simvastatin, alone or associated to L-arginine and α -tocopherol did not alter the concentrations of the endogenous inhibitors of nitric oxide synthase (ADMA and SDMA), or that of nitric oxide metabolites, total nitrotyrosine or the thiols analysed.

9 APÊNDICE

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - CEP: 05508-900
Tel. (011) 818-3677 - Fax: (011) 211-8986

Assistência Acadêmica
Of. CEP nº 43

São Paulo, 12 de junho de 2000.

Prezado Senhor

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião de 29/5/2000, resolveu **aprovar** o projeto "Tióis, s-nitrosotóis, LDL oxidada e reatividade vascular em pacientes hipercolesterolêmicos que fazem uso de estatinas, L-arginina e α tocoferol", apresentado por V.Sa, desde que sejam alterados, no Termo de Consentimento, "benefícios aos participantes", lembrando sobre os benefícios sociais que podem resultar de um projeto de pesquisa.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno
Vice-Coordenador do CEP/FCF

Ilmo. Sr.
Edimar Cristiano Pereira
Pós-Graduando do FBC

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SAÚDE DA REGIÃO
METROPOLITANA DA GRANDE SÃO PAULO
INSTITUTO "DANTE PAZZANESE" DE CARDIOLOGIA

Av. Dante Pazzanese, 500 (Ibirapuera) - Cx. Postal, 215 - São Paulo
Telefone: 5085-4000

FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA

INSTITUTO "DANTE PAZZANESE" DE CARDIOLOGIA
Av. Dante Pazzanese, 500 , Ibirapuera, São Paulo, SP

Data da Aprovação: 13 de Março de 2000

Título do Protocolo: "TIÓIS, S-NITROSOTIÓIS, LDL OXIDADA E REATIVIDADE VASCULAR EM PACIENTES HIPERCOLESTEROLÊMICOS QUE FAZEM USO DE ESTATINAS, L-ARGININA E α -TOCOFEROL"

Nomes dos Investigadores: Dr. Marcelo Bertolami

Aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia avaliou o Protocolo de Estudo: "INIBIDORES ENDÓGENOS DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NA HIPERCOLESTEROLEMIA: EFEITO DA SINVASTATINA, L-ARGININA E α -TOCOFEROL", e o Consentimento Livre e Esclarecido em 13/março/2000 e o aprovou.

Membros do Comitê de Ética em Pesquisa

Dr. Pedro Silvio Farsky
Enfermeira Fernanda Anajas Caldas Farias
Dra. Claudia Grazina Taddeo
Dra. Clarisse Ogawa Índio do Brasil
Dr. João Manuel Rossi Neto
Enfermeira Ana Aparecida Sanches Bersusa
Engenheiro Eddie Luis Alonso Júnior
Sr. Perterney Neves da Silva

Cargo
Presidente
Secretária
Membro Efetivo
Membro Efetivo
Membro Efetivo
Membro Efetivo
Membro Efetivo
Membro Efetivo

Dr. Pedro Silvio Farsky
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
CRM: 55.073

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARDH, C.D., AGARDH, E., ANDERSSON, A. Lack of association between plasma homocysteine levels and microangiopathy in type 1 diabetes mellitus. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, Oslo, v.54, p.637-641, 1994.
- ALBERTS, A.W., CHEN, J., KURON, G., HUNT, V., HUFF, J., HOFFMAN, C., ROTHROCK, J., LOPEZ, M., JOSHUA, H., HARRIS, E., PATCHETT, A., MONAGHAN, R., CURRIE, S., STAPLEY, E., ALBERS-SCHONBERG, G., HENSENS, O., HIRSHFIELD, J., HOOGSTEN, K., LIESCH, J., SPRINGER, J. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme: a reductase and a cholesterol-lowering agent. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.77, n.7, p.3957-3961, 1980.
- ARAKI, A., SAKO, Y., ITO, H. Plasma homocysteine concentrations in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of parenteral methylcobalamin treatment. **Atherosclerosis**, Shannon, v.103, p.149-57, 1993.
- ARRIGO, A.P. Gene expression and thiol redox state. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.27, p.936-944, 1999.
- AZUMA, H., SATO, J., HAMASAKI, H., SUGIMOTO, A., ISOTANI, E., OBAYASHI, S. Accumulation of endogenous inhibitors for nitric oxide synthesis and decreased content of L-arginine in regenerated endothelial cells. **Br. J. Pharmacol.**, Basingstoke, v.115, p.1001-1004, 1995.
- BALAZY, M., KAMINSKI, P.M., MAO, K., TAN, J., WOLIN, M.S. S-Nitroglutathione, a product of the reaction between peroxynitrite and glutathione that generates nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, p.273, n.48, p.3209-3215, 1998.
- BALINT, B., DONNELLY, L.E., HANAZAWA, T., KHARITONOV, S.A., BARNES, P.J. Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke. **Thorax**, London, v.56, n.6, p.456-461, 2001.
- BECKMAN, J.S., BECKMAN, T.W., CHEN, J., MARSHALL, P.A., FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.87, n.4, p.1620-1624, 1990.

- BECKMAN, J.S., KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.271, n.5, p.C1424-C1437, 1996.
- BLOM, H.J., ENGELEN, D.P.E., BOERS, G.H.J. Lipid peroxidation in homocysteinemia. **J. Inherited Metab. Dis.**, Dordrecht, v.15, p.419-422, 1992.
- BODE-BÖGER, S.M., BÖGER, R.H., KIENKE, S., JUNKER, W., FRÖLICH, J.C. Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.219, p.598-603, 1996.
- BÖGER, R.H., BODE-BÖGER, S.M., MÜGGE, A., KIENKE, R.B., DWENGER, A., FRÖLICH, J.C. Supplementation of hypercholesterolemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. **Atherosclerosis**, Shannon, v.117, p.273-284, 1995.
- BÖGER, R.H., BODE-BÖGER, S.M., FRÖLICH, J.C. The L-arginine - nitric oxide pathway: role in atherosclerosis and therapeutic implications. **Atherosclerosis**, Shannon, v.127, p.1-11, 1996.
- BÖGER, R.H., BODE-BÖGER, S.M., THIELE, W., JUNKER, W., ALEXANDER, K., FRÖLICH, J.C. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. **Circulation**, Baltimore, v.95, p.2068-2074, 1997.
- BÖGER, R.H., BODE-BÖGER, S.M., PHIVTHONG-NGAM, L., BRANDES, R.P., SCHWEDHELM, E., MÜGGE, A., BÖHME, M., TSIKAS, D., FRÖLICH, J.C. Dietary L-arginine and α -tocopherol reduce vascular oxidative stress and preserve endothelial function in hypercholesterolemic rabbits via different mechanisms. **Atherosclerosis**, Shannon, v.141, p.31-43, 1998a.
- BÖGER, R.H., BODE-BÖGER, S.M., SZUBA, A., TSAO, P.S., CHAN, J.R., TANGPHAO, O., BLASCHKE, T.F., COOKE, J.P. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction - its role in hypercholesterolemia. **Circulation**, Baltimore, v.98, p.1842-1847, 1998b.

- BÖGER, R.H., SYDOW, K., BORLAK, J., THUM, T., LENZEN, H., SCHUBERT, B., TSIKAS, D., BODE-BÖGER, S.M. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells – involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. **Circ. Res.**, Baltimore, v.87, p.99-105, 2000a.
- BÖGER, R.H., BODE-BÖGER, S.M., SYDOW, K., HEISTAD, D.D., LENTZ, S.R. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocysteinemia or hypercholesterolemia. **Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.**, Baltimore, v.20, p.1557-1564, 2000b.
- BOSTOM, A.G., LATHROP, L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease (ESRD): prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. **Kidney Int.**, Malden, v.52, p.10-20, 1997.
- BOULANGER, C., LÜSCHER, T.F. Release of endothelin from the porcine aorta: inhibition by endothelium-derived nitric oxide. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.85, p.587-590, 1990.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.27, p.9-10, 1999.
- BROWN, A.G., SMALE, T.C., KING, T.J., HASENKAMP, R., THOMPSON, R.H., Crystal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabolite from *Penicillium brevicompactum*. **J. Chem. Soc.**, London, v.11, p.1165-1170, 1976.
- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.21, n.5, p.505-517, 1980.
- CALO, L., SARTORE, G., BASSI, A., BASSO, C., BERTOCCO, S., MARIN, R., ZAMBON, S., CANTARO, S., D'ANGELO, A., DAVIS, P.A., MANZATO, E., CREPALDI, G. Reduced susceptibility to oxidation of low-density lipoprotein in patients with overproduction of nitric oxide (Bartter's and Gitelman's syndrome). **J. Hypertens.**, Hagerstown, v.16, n.7, p.1001-1008, 1998.

- CAUSSE, E., SIRI, N., ARNAL, J.F., BAYLE, C., MALATRAY, P., VALDIGUIE, P., SALVAYRE, R., COUDERC, F. Determination of asymmetrical dimethylarginine by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence. **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.741, n.1, p.77-83, 2000.
- CHAI, Y.C., JUNG, C.H., LII, C.K., ASHRAF, S.S., HENDRICH, S., WOLF, B., SIES, H., THOMAS, J.A. Identification of an abundant S-thiolated rat liver protein as carbonic anhydrase III: characterization of S-thiolation and dethiolation reactions. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.284, p.270-278, 1991.
- CHAKMAKJIAN, G.J. Endocrinology. In: RACE, G.J., ed. **Laboratory medicine**. Philadelphia: Haper & Row, 1982. p.1-3.
- CHAN, J.R., BÖGER, R.H., BODE-BÖGER, S.M., TANGPHAO, O., TSAO, P.S., BLASCHKE, T.F., COOKE, J.P. Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans. **Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.**, Baltimore, v.20, p.1040-1046, 2000.
- CHARKE, R., DALY, L., ROBINSON, K. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.324, p.1149-1155, 1991.
- CHO, S., HAZAMA, M., URATA, Y., HOTO, S., HORIUCHI, S., SUMIKAWA, K., KONDO, T. Protective role of glutathione synthesis in response to oxidized low density lipoprotein in human vascular endothelial cells. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.26, n.5/6, p.589-602, 1999.
- CHOW, C.K. Vitamin E and oxidative stress. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.11, n.2, p.215-232, 1991.
- CONSTANS, J., BLANN, A.D., RESPLANDY, F., PARROT, F., SEIGNEUR, M., RENARD, M., AMIRAL, J., GUERIN, V., BOISSEAU, M.R., CONRI, C. Endothelial dysfunction during acute methionine load in hyperhomocysteinaemic patients. **Atherosclerosis**, Shannon, v.147, n.2, p.411-413, 1999.
- COOKE, J.P. Does ADMA cause endothelial dysfunction? **Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.**, Baltimore, v.20, n.9, p.2032-2037, 2000.
- COOKE, J.P., DZAU, V.J. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular disease. **Circulation**, Baltimore, v.96, p.379-382, 1997.

- COOKE, J.P., SINGER, A.L., TSAO, P., ZERA, P., ROWAN, R.A., BILLINGHAM, M.E. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.90, p.1168-1172, 1992.
- COTGREAVE, I.A., GERDES, R.G. Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.242, p.1-9, 1998.
- CREIGHTON, T.E. Protein folding coupled to disulphide bond formation. **Biol. Chem.**, Berlin, v.378, p.731-744, 1997.
- DAIROU, F. Hypocholesterolemic statins: evaluation and prospects. **Presse Med.**, Vineuil, v.23, n.28, p.1304-1310, 1994.
- DAUGHERTY, A., DUNN, J.L., RATERI, D.L., HEINECKE, J.W. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.94, n.1, p.437-444, 1994.
- DAVIDGE, S.T., OJIMBA, J., McLAUGHLIN, M.K. Vascular function in the vitamin E-deprived rat: an interaction between nitric oxide and superoxide anions. **Hypertension**, Baltimore, v.31, p.830-835, 1998.
- DAVIS, M.E., HARRISON, D.G. Cracking down on caveolin: role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in modulating endothelial cell nitric oxide production. **Circulation**, Baltimore, v.103, n.1, p.2-4, 2001.
- DENNIS, V.W., ROBINSON, K. Homocysteinemia and vascular disease in end-stage renal disease. **Kidney Int.**, Malden, v.57, p.S11-S17, 1996.
- DIPLOCK, A.T. Will the "good fairies" please prove to us that vitamin E lessens human degenerative disease? **Free Radical Res.**, Jersey, v.26, p.565-583, 1997.
- DRÖGE, W., HACK, V., BREITKREUTZ, R., HOLM, E., SHUBINSKY, G., SHMID, E., GALTER, D. Role of cysteine and glutathione in signal transduction, immunopathology and cachexia. **BioFactors**, Amsterdam, v.8, p.97-102, 1998.
- EL-KHAIRY, L., UELAND, P.M., NYGARD, O., REFSUM, H., VOLLSET, S.E. Lifestyle and cardiovascular disease risk factors as determinants of total cysteine in plasma: the Hordaland Homocysteine Study. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.70, n.6, p.1016-1024, 1999.

- ENDO, A., KURODA, M., TSUJITA, Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. **J Antibiot.**, Tokyo, v.29, n.12, p.1346-1348, 1976.
- ENDO, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.33, n.11, p.1569-1582, 1992.
- FERON, O., DESSY, C., DESAGER, J.P., BALLIGAND, J.L. Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. **Circulation**, Baltimore, v.103, n.1, p.113-118, 2001.
- FERRO, D., PARROTTO, S., BASILI, S., ALESSANDRI, C., VIOLI, F. Simvastatin inhibits the monocytes expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v.36, n.2, p.427-431, 2000.
- FICKLING, S.A., WILLIAMS, D., VALLANCE, P., NUSSEY, S.S., WHITLEY, G.St.J. Plasma concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in normal pregnancy and pre-eclampsia. **Lancet**, London, v.342, p.242-243, 1993.
- FINKELSTEIN, J.D., MARTIN, J.J. Homocysteine **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, Oxford, v.32, n.4, p.385-389, 2000.
- FORTI, N., RAMIRES, J.A. Effects of lovastatin and probucol on lipoprotein fractions in patients with hypercholesterolemia: a Brazilian multicenter study. **Arq. Bras. Cardiol.**, Rio de Janeiro, v.57, n.3, p.253-261, 1991.
- GILBERT, H.F. Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.251, p.8-28, 1995.
- GIRARD, P., POTIER, P. NO, thiols and disulfides. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.320, p.7-8, 1993.
- GIRONA, J., LA VILLE, A.E., SOLA, R., PLANA, N., MASANA, L. Simvastatin decreases aldehyde production derived from lipoprotein. **Am. J. Cardiol.**, Philadelphia, v.83, n.6, p.846-851, 1999.
- GLUECK, C.J., SHAW, P., LANG, J.E., TRACY, T., SIEVE-SMITH, L., WANG, Y. Evidence that homocysteine is an independent risk factor for atherosclerosis in hyperlipidemic patients. **Am. J. Cardiol.**, Philadelphia, v.75, p.132-136, 1995.

- GOCKE, N., FREI, B. Basic research in antioxidant inhibition of steps in atherogenesis. **J. Cardiovasc. Risk**, London, v.3, p.352-357, 1996.
- GRAHAM, A., HOGG, N., KALYANARAMAN, B., O'LEARY, V., DARLEY-USMAR, V., MONCADA, S. Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.330, n.2, p.181-185, 1993.
- GRUNDY, S.M. Atherogenic dyslipidemia: lipoprotein abnormalities and implications for therapy. **Am. J. Cardiol.**, Philadelphia, v.75, n.6, p.45B-52B, 1995.
- GRUNDY, S.M. HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.319, n.1, p.24-33, 1988.
- HAIJAR, K.A. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.91, p.2873-2879, 1993.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 2.ed. New York: Oxford University Press, 1989.
- HANRATTY, C.G., Mc GRATH, L.T., Mc AULEY, D.F., YOUNG, I.S., JOHNSTON, G.D. The effects of oral methionine and homocysteine on endothelial function. **Heart**, London, v.85, n.3, p.326-330, 2001.
- HARPEL, P.C., CHANG, V.T., BORTH, W. Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhances the binding of lipoprotein (a) to fibrin: a potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis, and sulfhydryl compound metabolism. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.89, p.10193-10197, 1992.
- HAUSLADEN, A., STAMLER, J.S. Nitrosative stress. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.300, p.389-395, 1999.
- HAYASHI, T., HONDA, G., SUZUKI, K. In atherogenic stimulus homocysteine inhibits cofactor activity of thrombomodulin and enhances thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells. **Blood**, Orlando, v.79, p.2930-2936, 1992.
- HEINECKE, J.W., ROSEN, H., SUZUKI, L.A., CHAIT, A. The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v.262, n.21, p.10098-10103, 1987.

- HERMANDEZ, P.O., PEREZ, S.D., NAVARRO, A.J. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.101, n.12, p.2711-2719, 1998.
- HILL, C.H., PULLMAN, E.P., STARCHER, B., SHIH, J.C.H. Dietary nitroprusside alleviates atherosclerosis in hypercholesterolemic Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Compar. Biochem. Physiol. A**, v.112A, p.151-154, 1995.
- HIRANO, K., OGIHARA, T., MIKI, M., YASUDA, H., TAMAI, H., KAWAMURA, N., MINO, M. Homocysteine induces iron-catalyzed lipid peroxidation of low-density lipoprotein that is prevented by alpha-tocopherol. **Free Radical Res.**, Jersey, v.21, n.5, p.267-276, 1994.
- HOEG, J.M., BREWER, H.B. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme: a reductase inhibitors in the treatment of hypercholesterolemia. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.258, n.24, p.3532-3536, 1987.
- HOGG, N., DARLEY-USMAR, V.M., WILSON, M.T., MONCADA, S. The oxidation of α -tocopherol in human low-density lipoprotein by the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.326, n.1/3, p.199-203, 1993a.
- HOGG, N., DARLEY-USMAR, V.M., GRAHAM, A., MONCADA, S. Peroxynitrite and atherosclerosis. **Biochem. Soc. Trans.**, Colchester, v.21, n.2, p.358-362, 1993b.
- HOGG, N., SINGH, R.J., GOSS, S.P.A., KALYANARAMAN, B. The reaction between nitric oxide and α -tocopherol: a reappraisal. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.224, p.696-702, 1996.
- HUMAN, J.A., UBBINK, J.B., JERLING, J.J., DELPORT, R., VERMAAK, W.J., VORSTER, H.H., LAGENDIJK, J., POTGIETER, H.C. The effect of Simvastatin on the plasma antioxidant concentrations in patients with hypercholesterolaemia. **Clin. Chim. Acta**, Oxford, v.263, n.1, p.67-77, 1997.
- ILLINGWORTH, D.R., TOBERT, J.A. A review of clinical trials comparing HMG-CoA reductase inhibitors. **Clin. Ther.**, Belle Mead, v.16, n.3, p.366-385, 1994.

- ITO, A., TSAO, P.S., ADIMOOLAN, S., KIMOTO, M., OGAWA, T., COOKE, J.P. Novel mechanism for endothelial dysfunction (dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase). **Circulation**, Baltimore, v.99, p.3092-3095, 1999.
- ITOH, T., MATSUMOTO, M., HOUGAKU, H., HANDA, N., TSUBAKIHARA, Y., YAMADA, Y., IMAIZUMI, M., HOSHI, M., SHIMAZU, Y., HORI, M., KAWAMORI, R., UEDA, N., FUSAMOTO, H., KAMADA, T. Effects of low-dose simvastatin therapy on serum lipid levels in patients with moderate hypercholesterolemia: a 12-month study: the Simvastatin Study Group. **Clin. Ther.**, Belle Mead, v.19, n.3, p.487-497, 1997.
- JACOB, N., BRUCKERT, E., GIRAL, P., FOGLIETTI, M.J., TURPIN, G. Cysteine is a cardiovascular risk factor in hyperlipidemic patients. **Atherosclerosis**, Shannon, v.146, n.1, p.53-59, 1999.
- JACOBSEN, D.W. Hyperhomocysteinemia and oxidative stress: time for a reality check? **Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.**, Baltimore, v.20, n.5, p.1182-1184, 2000.
- Ji, Y., ACKERBOOM, T.P.M., SIES, H., THOMS, J.A. S-Nitrosylation and S-glutathiolation of protein sulfhydryls by S-nitrosoglutathione. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.362, p.67-78, 1999.
- JIN, L., ABOU-MOHAMED, G., CALDWELL, R.B., CALDWELL, R.W. Endothelial cell dysfunction in a model of oxidative stress. **Med. Sci. Monit.**, Warszawa, v.7, n.4, p.585-591, 2001.
- JONES, S.L., VIBERTI, G. Renal functional reserve in subjects with diabetes mellitus. **Semin. Nephrol.**, Orlando, v.15, p.475-481, 1995.
- JU, H., ZOU, R., VENEMA, V.J., VENEMA, R.C. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v.272, n.30, p.18522-18525, 1997.
- KAKIMOTO, Y., AKASAWA, S. Isolation and identification of N^G , N^G - and N^G , N^G -dimethylarginine, N^G -mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl- δ -hydroxylysine from human urine. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v.245, p.5751-5758, 1970.

- KANG, S.S. Treatment of hyperhomocyst(e)inemia: physiological basis. **J. Nutr.**, Bethesda, v.126, n.4, Suppl., p.1273S-1275S, 1996.
- KANG, S.S., WONG, P.W., MALINOW, M.R. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. **Annu. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v.12, p.279-298, 1992.
- KASHIBA, M., KASAHARA, E., CHIEN, K.C., INOUE, M. Fates and vascular action of S-nitrosoglutathione and related compounds in the circulation. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.363, n.2, p.213-218, 1999.
- KAYDEN, H.J., TRABER, M.G. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.34, n.3, p.343-358, 1993.
- KHAN, J., BRENNAN, D.M., BRADLEY, N., GAO, B., RCKDORFER, R., JACOBS, M. 3-nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method. **Biochem. J.**, Colchester, v.330, p.795-801, 1998.
- KHEDARA, A., KAWAI, Y., KAYASHITA, J., KATO, N. Feeding rats the nitric oxide synthase inhibitor, L-N^ε nitroarginine, elevates serum triglyceride and cholesterol and lowers hepatic fatty acid oxidation. **J. Nutr.**, Bethesda, v.126, p.2563-2567, 1996.
- KUROWSKA, E.M., CARROLL, K.K. Hypocholesterolemic properties of nitric oxide: *in vivo* and *in vitro* studies using nitric oxide donors. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1392, p.41-50, 1998.
- LAUFS, U., LA FATA, V., PLUTZKY, J., LIAO, J.K. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. **Circulation**, Baltimore, v.97, p.1129-1135, 1998.
- LENTZ, S.R., SADLER, J.E. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein-C activation by the thrombogenic agent homocysteine. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.88, p.1906-1914, 1991.
- LENTZ, S.R., SOBEY, C.G., PIEGORS, D.J., BHOPATKAR, M.Y., FARACI, F.M., MALINOW, M.R., HEISTAD, D.D. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.98, n.1, p.24-29, 1996.

- LERMAN, A., BURNETT Jr., J.C., HIGANO, S.T., McKINLEY, L.J., HOLMES Jr., D.R.
Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. **Circulation**, Baltimore, v.97, p.2123-2128, 1998.
- LUFTJOHANN, D., SIGIT, J.I., LOCATELLI, S., VON BERGMANN, K., SCHMIDT, H.H. High-dose simvastatin (80 mg/day) decreases plasma concentrations of total homocyst(e)ine in patients with hypercholesteromia. **Atherosclerosis**, Shannon, v.155, n.1, p.265-6, 2001.
- MacALLISTER, R.J., WHITLEY, G.S.J., VALLANCE, P. Effects of guanidino and uremic compounds on nitric oxide pathways. **Kidney Int.**, Malden, v.45, p.737-742, 1994.
- MANNICK, J.B., HAUSLADEN, A., LIU, L., HESS, D.T., ZENG, M., MIAO, Q.X., KANE, L.S., GOW, A.J., STAMLER, J.S., Faz-induced caspase denitrosylation. **Science**, Washington, v.284, p.651-654, 1999.
- MANSOOR, M.A., BERGMARK, C., SVARDAL, A.M., LONNING, P.E., UELAND, P.M. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. Homocysteine and peripheral vascular disease. **Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.**, Baltimore, v.15, n.2, p.232-240, 1995.
- MATSUOKA, H., ITOH, S., KIMOTO, M., KOHNO, K., TAMAI, O., WADA, Y., YASUKAWA, H., IWAMI, G., OKUDA, S., IMAIZUMI, T. Asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in experimental hypertension. **Hypertension**, Baltimore, v.29, n.2, p.242-247, 1997.
- MAYER, E.L., JACOBSEN, D.W., ROBINSON, K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v.27, n.3, p.517-527, 1996.
- McCULLY, K.S. Atherosclerosis, serum cholesterol and the homocysteine theory: a study of 194 consecutive autopsies. **Am. J. Med. Sci.**, Hagerstown, v.299, n.4, p.217-221, 1990.
- McCULLY, K.S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v.56, n.1, p.111-128, 1969.

- McDERMOTT, J.R. Studies on the catabolism of N^G-methylarginine, N^G, N^G-dimethylarginine and N^G, N^G-dimethylarginine in the rabbit. **Biochem. J.**, Colchester, v.154, p.179-184, 1976.
- McKEEVER, M.P., WEIR, D.G., MOLLOY, A., SCOTT, J.M. Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat. **Clin. Sci.**, Colchester, v.81, n.4, p.551-556, 1991.
- MIETUS-SNYDER, M., MALLOY, M.J. Endothelial dysfunction occurs in children with two genetic hyperlipidemias: improvement with antioxidant vitamin therapy. **J. Pediatr.**, Saint Louis, v.133, n.1, p.35-40, 1998.
- MILLER, R.M., SIES, H., PARK, E.M., THOMS, J.A. Phosphorylase and creatine kinase modification by thiol-disulfide exchange and by xanthine oxidase-initiated S-thiolation. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.276, p.355-363, 1990.
- MINOR, J.R., MYERS, P.R., GUERRA, J.R., BATES, J.N., HARRISON, D.G. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.86, p.2109-2116, 1990.
- MIYAZAKI, H., MATSUOKA, H., COOKE, J.P., USUI, M., UEDA, S., OKUDA, S., IMAIZUMI, T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. **Circulation**, Baltimore, v.99, p.1141-1146, 1999.
- MOAT, S.J., BONHAM, J.R., POWERS, H.J. Role of aminothiols as a component of the plasma antioxidant system and relevance to homocysteine-mediated vascular disease. **Clin. Sci.**, Colchester, v.100, n.1, p.73-79, 2001.
- MUNSHI, M.N., STONE, A., FINK, L., FONSECA, V. Hyperhomocysteinemia following a methionine load in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and macrovascular disease. **Metabolism**, Bethesda, v.45, p.133-135, 1996.
- NAPOLI, C., IGNARRO, L.J. Nitric oxide and atherosclerosis. **Nitric Oxide**, Orlando, v.5, n.2, p.88-97, 2001.
- NAVA, E., LUSCHER, T.F. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. **J. Hypertens.**, Hagerstown, v.13, n.2, p.S39-S48, 1995.
- NEUNTEUFL, T., KOSTNER, K., KATZENSCHLAGER, R., ZEHETGRUBER, M., MAURER, G., WEIDINGER, F. Additional benefit of vitamin E supplementation to

- simvastatin therapy on vasoreactivity of the brachial artery of hypercholesterolemic men. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v.32, n.3, p.711-716, 1998.
- NIGRIS, F., FRANCONI, F., MAIDA, I., PALUMBO, G., ANANIA, V., NAPOLI, C. Modulation by alpha- and gamma-tocopherol and oxidized low-density lipoprotein of apoptotic signaling in human coronary smooth muscle cells. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v.59, n.11, p.1477-1487, 2000.
- NYGARD, O., VOLLSET, S.E., REFSUM, H. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile: the Hordaland Homocysteine Study. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.274, p.1526-1533, 1995.
- O'DONNELL, V.B., CHUMLEY, P.H., HOGG, N., BLOODSWORTH, A., DARLEY-USMAR, V.M., FREEMAN, B.A. Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxyl radicals and comparison with α -tocopherol. **Biochemistry**, Columbus, v.36, p.15216-15223, 1997.
- O'DRISCOLL, G., GREEN, D., TAYLOR, R.R. Simvastatin, an HMG-Coenzyme: a reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month **Circulation**, Baltimore, v.95, p.1126-1131, 1997.
- OHARA, A., GATTI, R.M., RADI, R. Spin-Trapping studies of peroxynitrite decomposition and of 3-morpholinocarbonyl-N-ethylcarbamide autooxidation: direct evidence for metal-independent formation of free radical intermediates. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.310, n.1, p.118-125, 1994.
- OVERBO, K.K., SVARDAL, A. The effect of glutathione modulation on the concentration of homocysteine in plasma of rats. **Pharmacol. Toxicol.**, Copenhagen, v.87, n.3, p.103-107, 2000.
- PAOLISSO, G., TAGLIAMONTE, M.R., BARBIERI, M., ZITO, G.A., GAMBARDELLA, A., VARRICCHIO, G., RAGNO, E., VARRICCHIO, M. Chronic vitamin E administration improves brachial reactivity and increases intracellular magnesium concentration in type II diabetic patients. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v.85, n.1, p.109-115, 2000.

- PARTHASARATHY, S. Oxidation of low density lipoprotein by thiol compounds leads to its recognition by the acetyl LDL receptor. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.917, p.337-340, 1987.
- PERREAULT, S., LEVINTON, C., LE LORIER, J. Efficacy and cost of HMG-CoA reductase inhibitors in the treatment of patients with primary hyperlipidemia. **Can. J. Clin. Pharmacol.**, v.7, n.3, p.144-154, 2000.
- RADI, R., SIMS, S., CASSINA, A., TURRENS, J.F. Roles of catalase and cytochrome c in hydroperoxide-dependent lipid peroxidation and chemiluminescence in rat heart and kidney mitochondria. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.15, n.6, p.653-659, 1993.
- RAITAKARI, O.T., PITKANEN, O.P., LEHTIMAKI, T., LAHDENPERA, S., IIDA, H., YLA-HERTTUALA, S., LUOMA, J., MATTILA, K., NIKKARI, T., TASKINEN, M.R., VIIKARI, J.S., KNUUTI, J. *In vivo* low density lipoprotein oxidation relates to coronary reactivity in young men. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v.30, n.1, p.97-102, 1997.
- REES, M.M., RODGERS, G.M. Homocysteinemia: association of a metabolic disorder with vascular disease and thrombosis. **Thromb. Res.**, New York, v.71, p.337-359, 1993.
- RIGGS, K.M., SPIRO, A., TUCKER, K. Relations of vitamin B-12, vitamin B-6, folate, and homocysteine to cognitive performance in the Normative Aging Study. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.63, p.306-314, 1996.
- RODGERS, G.M., CONN, M.T. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein-C activation by arterial and venous endothelial cells. **Blood**, Orlando, v.75, p.895-901, 1990.
- RODGERS, G.M., KANE, W.H. Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.77, p.1909-1916, 1986.
- ROSENSON, R.S., TAGNEY, C.C. Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.279, n.20, p.1643-1650, 1998.
- RUBBO, H., RADI, R., TRUJILLO, M., TELLERI, R., KALYANARAMAN, B., BARNES, S., KIRK, M., FREEMAN, B.A. Nitric oxide regulation of superoxide and

- peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v.269, n.42, p.26066-26075, 1994.
- SEHAYEK, E., BUTBUL, E., AVNER, R., LEVKOVITZ, H., EISENBERG, S. Enhanced cellular metabolism of very low density lipoprotein by simvastatin: a novel mechanism of action of HMG-CoA reductase inhibitors. **Eur. J. Clin. Invest.**, Oxford, v.24, n.3, p.173-178, 1994.
- SEM, C.K., SIES, H., BAEUERLE, P.A. **Antioxidant and redox regulation of genes**. San Diego: Academic Press, 1999.
- SINZINGER, H., CHEHNE, F., SCHMID, P., KRITZ, H. Unaltered homocysteine levels during simvastatin therapy. **Wien. Klin. Wochenschr.**, Wien, v.112, n.12, p.540-543, 2000.
- SOMERS, M.J., HARRISON, D.G. Reactive oxygen species and the control of vasomotor tone. **Curr. Hypertens. Rep.**, v.1, n.1, p.102-108, 1999.
- SOO-SANG, K., WONG, P.W.K., COOK, H.Y., NORUSIS, M., MESSER, J.V. Protein-bound homocysteine. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.77, p.1482-1486, 1986.
- SOTIRIOU, C.G., CHENG, J.W. Beneficial effects of statins in coronary artery beyond lowering cholesterol. **Ann. Pharmacother.**, Cincinnati, v.34, n.12, p.1432-1439, 2000.
- SPILLMANN, M., FAVA, M. S-adenosylmethionine (ademetonine) in psychiatric disorders: historical perspective and current status. **CNS Drugs**, Auckland, v.6, p.416-425, 1996.
- STAMLER, J.S., OSBORNE, J.A., JARAKI, O., RABBANI, L.E., MULLINS, M., SINGEL, D., LOSCALZO, J. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.91, n.1, p.308-318, 1993.
- STAMLER, J.S., SINGEL, D.J., LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science**, Washington, v.18, n.258, p.1898-1902, 1992.
- STAMLER, J.S., SLIVKA, A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. **Nutr. Rev.**, Secaucus, v.54, p.1-30, 1996.

- TAWAKOL, A., OMLAND, T., GERHARD, M., WU, J.T., CREAGER, M.A. Hyperhomocysteinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. **Circulation**, Baltimore, v.95, p.1119-1121, 1997.
- TERASAWA, Y., LADHA, Z., LEONARD, S.W., MORROW, J.D., NEWLAND, D., SANAN, D. PACKER, L., TRABER, M.G., FARESE, R.V. Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice deficient in alpha-tocopherol transfer protein and vitamin E. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.97, n.25, p.1383-1384, 2000.
- THAKUR, N.K., HAYASHI, T., SUMI, D., KANO, H., TSUNEKAWA, T., IGUCHI, A. HMG-CoA reductase inhibitor stabilizes rabbit atheroma by increasing basal NO and decreasing superoxide. **Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.**, Bethesda, v.281, n.1, p.H75-H83, 2001.
- THOMAS, J.A., SIES, H. Protein S-thiolation and dethiolation. In: TSUBOI, S., TANIGUCHI, N., KATUNUMA, N., eds. **Post-translational modification of proteins: roles in molecular and cellular biology**. Japan Scientific Societies Press, p.239-255, 1991.
- THURNHAN, D.L., SMITH, E., FLORA, P.S. Concurrent liquid-chromatographic assay of retinol, α -tocopherol, β -carotene, α -carotene, lycopene and β -cryptoxanthin. **Clin. Chem.**, Washington, v.34, p.337-343, 1988.
- TODD, P.A., GOA, K.L. Simvastatin: a review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolaemia. **Drugs**, Auckland, v.40, n.4, p.583-607, 1990.
- TOJO, A., WELCH, W.J., BREMER, V., KIMOTO, M., KIMURA, K., OMATA, M., OGAWA, T., VALLANCE, P., WILCOX, C.S. Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. **Kidney Int.**, Malden, v.52, p.1593-1601, 1997.
- TRABER, M.G., LANE, J.C., LAGMAY, N.R., KAYDEN, H.J. Studies on the transfer of tocopherol between lipoproteins. **Lipids**, Champaign, v.27, n.9, p.657-663, 1992.
- TSUJITA, Y., KURODA, M., SHIMADA, Y., TANZAWA, K., ARAI, M., KANEKO, I., TANAKA, M., MASUDA, H., TARUMI, C., WATANABE, Y. CS-514, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: tissue-

- selective inhibition of sterol synthesis and hypolipidemic effect on various animal species. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.877, n.1, p.50-60, 1986.
- UELAND, P.M., REFSUM, H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. **J. Lab. Clin. Med.**, Saint Louis, v.114, p.473-501, 1989.
- UELAND, P.M., REFSUM, H. Plasma homocysteine, a risk factor for premature vascular disease: plasma levels in healthy persons; during pathologic conditions and drug therapy. **Nord. Med.**, Stockholm, v.104, n.11, p.293-298, 1989.
- UELAND, P.M., REFSUM, H., BRATTSTRÖM, L. Plasma homocysteine and cardiovascular disease. In: **Atherosclerotic cardiovascular disease, hemostasis, and endothelial function**. p.183-236, 1992.
- USUI, M., MATSUOKA, H., MIYASAKI, H., UEDA, S., OKUDA, S., IMAIZUMI, T. Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. **Life Sci.**, New York, v.62, n.26, p.2425-2430, 1998.
- VALLANCE, P., LEONE, A., CALVER, A., COLLIER, J., MONCADA, S. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, Hagerstown, v.20, n.12, p.S60-S62, 1992a.
- VALLANCE, P., LEONE, A., CALVER, A., COLLIER, J., MONCADA, S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. **Lancet**, London, v.339, p.572-575, 1992b.
- VAN DEN BRANDHOF, W.E., HAKS, K., SCHOUTEN, E.G., VERHOEF, P. The relation between plasma cysteine, plasma homocysteine and coronary atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Shannon, v.157, n.2, p.403-409, 2001.
- VAN GULDENER, C., STEHOUWER, C.D. Homocysteine-lowering treatment: an overview. **Expert Opin. Pharmacother.**, London, v.2, n.9, p.1449-1460, 2001.
- VECCHIONE, G., MARGAGLIONE, M., GRANDONE, E., CAPPUCCI, G., FERMO, I., D'ANGELO, A., DI MINNO, G. Determining sulfur-containing amino acids by capillary electrophoresis: a fast novel method for total homocysteine human plasma. **Electrophoresis**, Weinheim, v.20, p.569-574, 1999.

- VERHOEF, P., KOK, F.J., KRUYSEN, D.A., SCHOUTEN, E.G., WITTEMAN, J.C., GROBBEE, D.E., UELAND, P.M., REFSUM, H. Plasma total homocysteine, B vitamins, and risk of coronary atherosclerosis. **Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.**, Baltimore, v.17, n.5, p.989-995, 1997.
- VOEHRINGER, D. BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.27, p.945-951, 1999.
- WANG, T., POWELL, W.S. Increased levels of monohydroxy metabolites of arachidonic acid and linoleic acid in LDL and aorta from atherosclerotic rabbits. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1084, n.2, p.129-138, 1991.
- WASCHER, T.C., POSCH, K., WALLNER, S., HERMETTER, A., KOSTNER, G.M., GRAIER, W.F. Vascular effects of L-arginine: anything beyond a substrate for the NO-synthase? **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.234, p.35-38, 1997.
- WATANABE, H., KAKIHANA, M., OHTSUKA, S., SUGISHITA, Y. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental vitamin E on attenuation of the development of nitrate tolerance. **Circulation**, Baltimore, v.96, n.8, p.2545-2550, 1997.
- WIEL, E., PU, Q., CORSEAU, D., OBIN, E., BORDET, R., LUND, N., JUDE, B., VALLET, B. Effect of L-arginine on endothelial injury and hemostasis in rabbit endotoxin shock. **J. Appl. Physiol.**, Bethesda, v.89, n.5, p.1811-1818, 2000.
- YU, X.J., LI, Y.J., XIONG, Y. Increase of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in serum of high cholesterol fed rabbits. **Life Sci.**, New York, v.54, n.12, p.753-758, 1994.
- ZHANG, X., LI, H., JIN, H., EBIN, Z., BRODSKY, S., GOLIGORSKY, M.S. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. **Am. J. Physiol.: Renal Physiol.**, Bethesda, v.279, n.4, p.F671-F678, 2000.
- ZIEGLER, D.M. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v.54, p.305-329, 1985.