

LEONARDO RAMOS PAES DE LIMA

Estudos comparativos de modelos animais submetidos a disfunções lipídicas (hiperlipidemia) pela ação de compostos naturais (flavonóides e corantes).

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2004

LEONARDO RAMOS PAES DE LIMA

Estudos comparativos de modelos animais submetidos a disfunções lipídicas (hiperlipidemia) pela ação de compostos naturais (flavonóides e corantes).

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 17 de agosto de 2004.

Tanus Jorge Nagem
(Conselheiro)

Adelson Luiz Araújo Tinoco
(Conselheiro)

George Henrique Kling de Moraes

Luiz Carlos Guedes de Miranda

Tânia Toledo de Oliveira
(Orientadora)

Dedico esta tese a minha esposa Marília e aos meus filhos Rafael, Marina e Bruno, pelo apoio, incentivo e dedicação por mais esta etapa cumprida.

AGRADECIMENTO

A DEUS, por sempre estar presente em minha vida, iluminando os meus caminhos e me abençoando.

Aos meus pais (in memoriam), pelo exemplo de vida, pela educação e ensinamentos, dos quais foram essenciais para a minha formação.

À minha esposa e aos meus filhos, pelo amor, carinho, pela dedicação e força no meu dia a dia.

Aos meus tios Aristides e Maria Helena, pela força, dedicação e ajuda indispensável durante esta fase de minha vida.

À professora Tânia Toledo de Oliveira, pela orientação, dedicação, compreensão, amizade e ensinamentos oferecidos durante a minha formação.

Ao professor Tanus Jorge Nagem, pelos seus aconselhamentos, pela amizade e compreensão.

Aos professores e amigos Aloísio da Silva Pinto e Ednaldo Queiroga de Lima, pela grande atenção dispensada, pela amizade, pelo companheirismo e ensinamentos a mim conferidos.

Ao amigo Davilson Bragine Ferreira Júnior, pela amizade, companheirismo e ajuda no desenvolvimento da pesquisa.

Aos colegas e amigos do laboratório, Marcelo Annes de Araújo, Denise Torres Cruz Reis, Hebréia Oliveira Almeida, Zivaldo Aurélio Cardoso de Oliveira, Humberto Doriguetto Gravina e demais estudantes do laboratório de

biofármacos, pela valorosa ajuda e dedicação, pelo companheirismo, pela amizade e incentivos em nossos constantes convívios.

Ao José Geraldo Pinto, pelo apoio indispensável.

Ao Eduardo Monteiro, pela ajuda e atenção oferecida.

Aos professores Adelson Luiz Araújo Tinoco, George Henrique Kling de Moraes e Luiz Carlos Guedes de Miranda, pela ajuda na reformulação e pelas críticas que muito contribuíram para a melhoria desta tese.

Aos meus irmãos e a Juversina Suassuí por tudo o que vivemos até aqui e iremos viver.

Aos meus amigos Marcelo Mendes de Carvalho, Vitor Hugo Rodrigues dos Santos e Rodrigo Lassarote Lavall, pela amizade e companheirismo nas horas boas e ruins desta jornada.

Ao Sr. João de Oliveira, Sra. Marlene Isabel do Carmo de Oliveira e aos meus cunhados, pela ajuda e amizade.

Aos coelhos, ratos e cobaias que foram sacrificados durante a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pelo financiamento do projeto e pela bolsa de estudo.

À UFV e ao departamento de bioquímica e biologia molecular e a todos os professores de bioquímica que ministraram disciplinas e que contribuíram para a minha evolução e aperfeiçoamento científico e espiritual.

A todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram na conquista de mais essa etapa de minha vida.

BIOGRAFIA

Leonardo Ramos Paes de Lima nasceu na cidade de Coronel Fabriciano, MG, em 15 de julho de 1972, filho de Walter José Paes de Lima e Vera Luce Ramos Lima.

Cursou o primeiro grau no Colégio São Francisco Xavier, em Ipatinga, MG.

No ano de 1991, concluiu o curso Técnico em Química, no Colégio Padre De Man, em Coronel Fabriciano, MG, e em 1997, concluiu o curso de bacharelado e licenciatura em Química, na Universidade Federal de Viçosa, MG.

Em março de 1998, iniciou o mestrado no Programa de Pós-graduação em Agroquímica na Universidade Federal de Viçosa, MG, defendendo sua tese em abril de 2000.

Iniciou o doutorado em agosto de 2000 no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, MG, defendendo sua tese em agosto de 2004.

CONTEÚDO

RESUMO	IX
ABSTRACT	XII
1 . INTRODUÇÃO	1
2 . REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 . DIGESTÃO, ABSORÇÃO, METABOLISMO LIPÍDICO E DISLIPIDEMIAS	4
2.1.1 . <i>Digestão</i>	4
2.1.2 . <i>Absorção</i>	5
2.1.3 . <i>Metabolismo de Lipídeos</i>	7
2.1.3.1 . <i>Catabolismo dos lipídeos</i>	9
2.1.3.2 . <i>Catabolismo da LDL</i>	12
2.1.3.3 . <i>Função e Classificação das Apolipoproteínas</i>	13
2.1.3.4 . <i>Anabolismo de ácidos graxos</i>	14
2.1.3.5 . <i>Síntese do colesterol</i>	16
2.1.3.6 . <i>Colesterol-HDL</i>	18
2.1.3.7 . <i>Síntese de lipídeos</i>	20
2.1.3.8 . <i>Triacilgliceróis</i>	21
2.1.4 . <i>Dislipidemias</i>	21
2.2 . RECEPTORES ATIVADOS PARA PROLIFERAÇÃO DE PEROXISOMA (PPARs)	23
2.2.1 . <i>Tecido adiposo</i>	23

2.2.2 .	<i>Receptores ativados para proliferação de peroxisoma (PPARs)</i>	26
2.2.3 .	<i>Efeito dos PPARs sobre o processo de diferenciação dos adipócitos</i>	28
2.2.4 .	<i>Conseqüências fisiológicas de ácidos graxos na ativação dos PPARS e conseqüente estimulação da oxidação dos lipídeos</i>	34
2.2.5 .	<i>Papel dos PPARs na lipogênese e formação das lipoproteínas</i>	37
2.3 .	ANTILIPÊMICOS	44
2.3.1 .	<i>Inibidores da HMG-CoA Redutase</i>	50
2.3.2 .	<i>Derivados do Ácido Fíbrico</i>	50
2.4 .	FLAVONÓIDES	51
2.4.1 .	<i>Classificação e estruturas de alguns dos Flavonóides</i>	52
2.4.2 .	<i>Efeitos Biológicos e Propriedades Farmacológicas</i>	54
2.4.2.1 .	<i>Efeitos antioxidantes</i>	54
2.4.2.2 .	<i>Atividades antiinflamatória e antialérgica dos flavonóides</i>	56
2.4.2.3 .	<i>Efeito vasodilatador</i>	57
2.4.2.4 .	<i>Atividade anticancerígena</i>	58
2.4.2.5 .	<i>Efeitos anti-invasivos e antiproliferativos</i>	58
2.4.3 .	<i>Estudos de Ações e Efeitos de Flavonóides</i>	59
2.4.3.1 .	<i>Absorção e metabolismo</i>	59
2.4.3.2 .	<i>Flavonóides e Doenças Cardiovasculares</i>	59
2.5 .	CORANTES NATURAIS	60
2.5.1 .	<i>Propriedades biológicas de carotenóides</i>	60
2.5.2 .	<i>“Extrato do urucum”</i>	63
2.5.3 .	<i>Aplicações do corante do urucum</i>	67
2.6 .	INFLUÊNCIA DE PRODUTOS NATURAIS NO METABOLISMO LIPÍDICO	68
3 .	MATERIAL E MÉTODOS	71
3.1 .	COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE DIFERENTES ESPÉCIES ANIMAIS SUBMETIDOS A HIPERCOLESTEROLEMIA	71
3.1.1 .	<i>Análise histopatológica</i>	75
3.1.2 .	<i>Determinação do colesterol</i>	75
3.1.3 .	<i>Determinação do triacilglicerol</i>	76
3.1.4 .	<i>Determinação do colesterol-HDL</i>	78
3.1.5 .	<i>Determinação da glicose</i>	78

3.2 . COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE COELHOS HIPERLIPIDÊMICOS DE ACORDO COM A VIA DE INDUÇÃO.....	79
3.3 . COMPARAÇÃO ENTRE DOSES DE ALGUNS FLAVONÓIDES NO METABOLISMO LIPÍDICO DE COELHOS.....	80
3.4 . COMPARAÇÃO ENTRE OS EFEITOS DA APLICAÇÃO DE 10 MG DE FLAVONÓIDES E CORANTES NO METABOLISMO LIPÍDICO DE COELHOS HIPERLIPIDÊMICOS.....	81
3.4.1 . <i>Análise histopatológica.....</i>	<i>82</i>
3.5 . EFEITO DE MODIFICADORES QUÍMICOS SOBRE A ATIVIDADE DE LIPASE.....	83
3.6 . ANÁLISES ESTATÍSTICAS	85
4 . RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
4.1 . COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE DIFERENTES ESPÉCIES ANIMAIS SUBMETIDOS A HIPERCOLESTEROLEMIA.....	86
4.1.1 . <i>Análise histopatológica.....</i>	<i>91</i>
4.2 . COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE COELHOS HIPERLIPIDÊMICOS DE ACORDO COM A VIA DE INDUÇÃO.....	95
4.3 . COMPARAÇÃO ENTRE DOSES DE ALGUNS FLAVONÓIDES NO METABOLISMO LIPÍDICO DE COELHOS.....	102
4.4 . COMPARAÇÃO ENTRE OS EFEITOS DA APLICAÇÃO DE 10 MG DE FLAVONÓIDES E CORANTES NO METABOLISMO LIPÍDICO DE COELHOS HIPERLIPIDÊMICOS.....	110
4.4.1 . <i>Análise histopatológica.....</i>	<i>116</i>
4.5 . EFEITO DE MODIFICADORES QUÍMICOS SOBRE A ATIVIDADE DE LIPASE.....	117
5 . CONCLUSÕES.....	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

RESUMO

LIMA, Leonardo Ramos Paes de, D.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2004. **Estudos comparativos de modelos animais submetidos a disfunções lipídicas (hiperlipidemia) pela ação de compostos naturais (flavonóides e corantes).** Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Conselheiros: Tanus Jorge Nagem e Adelson Luiz Araújo Tinoco.

Realizaram-se 4 ensaios biológicos e 1 *in vitro* com a finalidade de se avaliar as ações farmacológicas de flavonóides e corantes naturais sobre o metabolismo lipídico. Inicialmente, avaliou-se qual espécie animal, entre coelhos da variedade Nova Zelândia, ratos machos da variedade Wistar e Cobaias (*Cavia porcellus*), seriam melhores para a indução da hiperlipidemia, através da administração de ácido cólico e colesterol juntamente com a ração específica para cada espécie e água *ad libitum*. O sangue foi coletado aos 30 e 60 dias após o início do tratamento e analisados os teores de colesterol, colesterol-HDL, triacilgliceróis e glicose no soro desses animais. Após o término dos experimentos, foram coletadas amostras de fígado e arco aórtico dos animais, numa repetição de quatro amostras para cada grupo, escolhidos ao acaso, a fim de proceder à análise histopatológica. Neste ensaio, a indução mais eficiente em provocar a hiperlipidemia foi conseguida nos coelhos, mostrando níveis séricos extremamente altos em um curto intervalo de tempo, o que o faz ser um dos animais mais procurado atualmente para trabalhos com esta finalidade. Em posse dos resultados, montou-se o segundo ensaio biológico, optando-se então

por utilizar coelhos da raça Nova Zelândia na determinação da melhor via de administração dos flavonóides e corantes naturais, que são utilizados atualmente no estudo de seus efeitos farmacológicos como agentes hipolipidêmicos. De acordo com o que foi observado e pela praticidade na administração, optou-se por administrar as substâncias a serem testadas, pela via oral, nos outros experimentos. Um terceiro ensaio biológico foi realizado no intuito de se determinar a melhor concentração na qual os flavonóides e corantes atuam como fármacos hipolipidêmicos. Os tratamentos foram constituídos por dois grupos controles, sendo um grupo alimentado só com ração e o outro com ração + colesterol + ácido cólico (RCA), e por outros 16 grupos que receberam as seguintes substâncias: quercetina, rutina, morina e naringenina, nas doses de 5 mg, 10 mg, 15 mg e 30 mg. A administração destas substâncias foi pela via oral, sendo ministradas em cápsulas tendo o talco farmacêutico como veículo. As melhores reduções conseguidas na diminuição do nível do colesterol total em relação ao grupo hiperlipidêmico foram observadas nos tratamentos com quercetina e rutina na dose de 5 mg e naringenina na dose de 10 mg, sendo estas variações de 56,42%, 55,00% e 54,04%, respectivamente, sendo significativo pelo teste de Dunnett. O melhor tratamento encontrado na redução dos níveis triglicêmicos foi o com quercetina a 10 mg, sendo que este tratamento abaixou o nível de triacilglicerol destes animais em 77,51% quando comparado com o grupo hipertriglicêmico. Em relação ao colesterol-HDL, foi considerada mais eficiente a substância que promoveu um maior aumento no nível deste constituinte no soro, que foi conseguido pelo tratamento com a morina nas dosagens de 10 e 15 mg, obtendo-se um aumento de 10,79% e 9,00%, respectivamente, em relação ao grupo hiperlipidêmico. Em um último ensaio biológico, comparou-se os efeitos dos flavonóides baicaleína, morina, naringenina, naringina, quercetina, rutina, crisina, luteolina e apigenina, os corantes naturais do extraído do urucum norbixina e bixina e o medicamento comercial hipolipidêmico colestiramina na dosagem de 10 mg/Kg de peso corporal, por via oral, em cápsula, utilizando o talco como veículo. Sendo esta forma de mais fácil manejo, menos sacrificante para o animal e com uma maior garantia das concentrações ingeridas. A indução da hiperlipidemia foi através do ácido cólico e colesterol, colocados na ração diária dos animais. Esta forma de indução é mais próxima da real e menos

sacrificante para o animal. Todas as substâncias reduziram os teores de colesterol no soro sanguíneo dos coelhos, sendo que as melhores reduções foram observadas nas substâncias naringenina, 54,04%, naringina, 49,26%, quercetina, 49,78%, rutina, 48,89%, crisina, 55,56%, luteolina, 52,58% e apigenina, 49,88. Todos os flavonóides estudados e o corante bixina reduziram os níveis de colesterol a valores inferiores ao do medicamento colestiramina e sua média foi estatisticamente diferente a médias deste medicamento, pelo teste de Tukey. Estes resultados mostram que as substâncias estudadas podem ser mais eficientes no combate a hipercolesterolemias dos que os medicamentos atualmente no mercado, com a vantagem de serem menos tóxicos que estes. Os melhores efeitos observados na redução do triacilglicerol plasmático foram conseguidos pelos flavonóides baicaleína, quercetina e crisina. A baicaleína e a rutina diminuíram os níveis de triacilglicerol a valores inferiores ao do grupo controle alimentado apenas com ração, sendo que os valores conseguidos pela baicaleína (-56,91%) foram estatisticamente diferente deste grupo controle pelo teste de Dunnett. A maior parte dos flavonóides aqui estudados teve um melhor efeito sobre o triacilglicerol do que o medicamento colestiramina. As substâncias que promoveram um maior aumento no nível de colesterol-HDL foram os flavonóides baicaleína, apigenina, morina e luteolina e o medicamento colestiramina. Estas substâncias tiveram um efeito hipercolesterolêmico para esta fração lipídica do colesterol, que foram de 122,21%, 281,63%, 10,79%, 21,14% e 37,26%, respectivamente. De uma maneira geral, pode-se observar que as substâncias estudadas apresentaram uma ação farmacológica bastante acentuada no metabolismo lipídico de coelhos hiperlipidêmicos sem, sobretudo, causar efeitos de toxicidade, aparentemente. No ensaio *in vitro*, procurou-se caracterizar o efeito das substâncias estudadas sobre a atividade da lipase, variando-se a concentração dos modificadores, sendo que todos eles aumentaram esta atividade. Este trabalho demonstrou os efeitos benéficos de alguns flavonóides e corantes naturais sob o metabolismo lipídico de coelhos, sendo que um dos mecanismos para explicar os níveis reduzidos de triacilgliceróis é o aumento da atividade da lipase por essas substâncias, porém, novas pesquisas devem ser realizadas para que estes compostos possam ser utilizados como medicamento e testados no homem.

ABSTRACT

LIMA, Leonardo Ramos Paes de, D.S., Universidade federal de Viçosa, august of 2004. **Comparative studies of animal models submitted to dysfunctions lipidics (hyperlipidemia) for the action of natural compositions (flavonoids and coloring).** Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Committee members: Tanus Jorge Nagem and Adelson Luiz Araújo Tinoco.

Four biological assays were realized and 1 *in vitro* to evaluated the pharmacological action of flavonoids and natural coloring about the lipid metabolism. Initially, was evaluated which animal sort, between rabbits of the race New Zealand, male mouse of the race Wistar and guinea-pig (*Cavia porcellus*), would be better for the induction of the hyperglycemia, through of the administration of colic acid and cholesterol jointly with the feed specifies for each species and water *ad libitun*. The blood was collected 30 and 60 days after the beginning of the treatment and the levels of cholesterol, cholesterol – HDL, triacylglycerols and glucose in the serum of those animals were analyzed. After at the end of the experiments, were collected samples of liver and aortic arch of the animals, in a repetition of four samples for each group, choose at random, in order to proceed to the hystopatologic analysis. In this assays the induction more efficient in provoke to hyperlipidemia was obtained us rabbits, showing levels consecutives extremely loud in a short break of time, what is going to be one of the animals more found nowadays for works with this purpose. In possession of the results, was prepared the second biological assays, opting then by utilize

rabbits of the race New Zealand in the determination of the best way of administration of the flavonoids and natural coloring, that are utilized nowadays in the study of her pharmacological effects how hypolipidemic agents. In agreement with what was observed in the administration, opted by administer the substances it will be tested, by the oral way, in the others experiments. In the third biological assay was realized in the intention of be determined the better concentration in the which the flavonoids and natural coloring like hypolipidemic pharms. The treatments were constituted by two groups of controls, being an alone group fed with feed and another with feed + cholesterol + colic acid (RCA), and by others 16 groups that received the following substances: quercetin, rutin, morin and naringenin, in the dose and 5 mg, 10 mg, 15mg and 30 mg. The administration of these substances was by oral way, being administered in capsule having the pharmaceutical talc as vehicle. The best reductions obtained in the diminution of the level of the total cholesterol regarding the group hyperlipidemic were observed us treatment with quercetin and rutin in the dose of 5 mg and naringenin in the dose of 10 mg, being this variation of 56,42%, 55,00% and 54,04%, respectively, being significant by the test of Dunnett. The best reduction found in the decrease of the levels triglycemics was with quercetin to 10 mg, being that this treatment lowered the level of triacylglycerol of these animals in 77,51% when was compared with the group hypertriglycemic. Regarding the cholesterol – HDL, was considered more efficient the substance that promoted the most greatest increase in the level of this constituent in the serum, that was obtained by the treatment with the morin in the dosages of 10 and 15mg, obtaining itself an increase of 10,69% and 9,00%, respectively, regarding the group hyperlipidemic. In a last biological assays, compared the effects of the flavonoids baicalein, morin, naringenin, naringin, quercetin, rutin, cricin, luteolin and apigenin, the natural coloring extracted of the aurum norbixin and bixin and the commercial medicine hypolipidemic colestiramin in the dosage of 10mg/kg of corporal weight, by oral way, in capsule, utilizing the talc as vehicle. Being this forms of easier management, less sacrificial for the animal and with a bigger guarantee of the concentrations ingested. The induction of the hyperlipidemia was through of the colic acid and cholesterol, put in the daily feed of the animals. This form of induction is more near to the real one in less sacrificant for the animal. All the substances reduced the levels of cholesterol, in

the blood serum of the rabbits, being that the best reductions were observed in the substances naringenin, 54,04%, naringin, 49,26%, quercetin, 49,78%, rutin, 48,89%, crisin, 55,56%, luteolin, 52,58% and apigenin, 49,88. All of the flavonoids studied and coloring bixin reduced the levels of cholesterol to lower values to the of the medicine colestiramin and his medium was statistics peculiar on average of this medicine, by test of Tukey. These results show that the substances studied can be more efficient in the combat to hypercholesterolemias than the medicines at present in the market, with the advantage of will be less toxic than these. The best effects observed in the reduction of the triacylglycerol plasmatic were obtained by the flavonoids baicalein, quercetin and crisin. The baicalein and to rutin diminished the levels of tryglicerids to lower values the of the group control feeding just with feed, being that the values obtained by the baicalein (- 56, 91%) were statistics unlike this control group by the test of Dunnett. Most of the flavonoids here studied had a better effect about the triacylglycerol than the medicine colestiramin. The substances that promoted a bigger increase in the level of cholesterol – HDL were the flavonoids baicailen, apigenin, morin and luteolin and the medicine colestiramin. These substances had the effect hypercholesterolemic for this part of the lipid of the cholesterol, that were of 122, 21%, 281,63%, 10,79%, 21,14% and 37,26% respectively. In general way, is able to be observed that the substances studied presented an pharmacological action enough accentuated in the lipid metabolism of rabbits hyperlipidemics without, above all, cause effects of toxicity, apparently. In assays *in vitro*, found be characterized the effect of the substances studied about the activity of the lipase, varying the concentration of the modifier, being that all they increased this activity. This presentation showed the beneficial effects of some flavonoids and natural coloring in the lipid metabolism of rabbits, being that one of the mechanisms for explain the limited levels of triacylglycerols and increase of the activity of the lipase by those substances, however, new researches should be realized for that these composed can be utilized like medicine and tested in the man.

1 . INTRODUÇÃO

O colesterol e o ácido cólico adicionados à dieta alimentar são usado, freqüentemente, na elevação da concentração de colesterol no soro ou em tecidos de animais experimentais, facilitando o estudos da etiologia dos distúrbios metabólicos relacionados a hipercolesterolemia (Bocan, 1998 e Stehbens, 1986). Os coelhos são mais suscetíveis ao desenvolvimento da aterosclerose que os ratos quando da indução de hipercolesterolemia através de colesterol na dieta (Bocan, 1998 e Stehbens, 1986). Porém, a hipercolesterolemia moderado pode ser conseguida em ratos através de alimentação com ácido cólico juntamente com uma dieta rica em colesterol, mas este tratamento não resulta em lesões ateroscleróticas nos ratos (Stehbens, 1986; Uysal et al., 1988 e Bulur et al., 1995).

Uma alimentação com dieta suplementada com colesterol para coelhos produz severas lesões ateroscleróticas vasculares e hipercolesterolemia como também um aumento no estresse oxidativo em vários tecidos (Del Boccio et al., 1990; Yamakoshi et al., 1999; Mahfouz e Kummerow, 2000; De La Cruz et al., 2000 e Balkan et al., 2002).

Uma dieta rica em colesterol causa aumentos significativos nos níveis de colesterol e de peróxidos lipídicos no plasma e aorta de coelhos. Porém, os níveis de colesterol plasmático só aumentam ligeiramente em ratos com a mesma dieta não havendo nenhum efeito nos níveis de colesterol e peróxidos lipídicos na aorta. Uma dieta rica em colesterol altera os níveis de lipídeos e

peróxidos lipídicos como também os níveis de glutathione e atividades de enzima antioxidantes no fígado de coelhos e ratos de um modo semelhante. Assim, mudanças oxidativas no plasma e aorta podem representar um papel adicional na formação de plaquetas de ateroma em coelhos depois de alimentá-los com uma dieta rica em colesterol (Balkan et al., 2004).

O colesterol parece ter um papel chave na regulação da secreção da lipoproteína apo B pelo fígado (Thompson et al., 1996). Uma forte correlação entre a taxa de síntese de colesterol e a produção da lipoproteína apo B foi demonstrada por Watts et al. (1995). Hipercolesterolemia familiar homocigota produz aumento na biossíntese de colesterol e também mostra aumento na produção da lipoproteína apo B (Bilheimer et al., 1979). A HMG-CoA redutase hepática é a enzima taxa-limitante no caminho biossintético do colesterol e seus inibidores são muito efetivos no LDL-colesterol plasmático na maioria das espécies animais, inclusive humanos (Amin et al., 1993), como tal, eles são usados amplamente em drogas hipocolesterolêmicas (Lovastatin study groups I through IV, 1993).

Flavonóides são grupos de compostos naturais que ocorrem nos vegetais e são conhecidos por possuírem efeitos antioxidantes. Como tal, vários estudos prévios investigaram a natureza das capacidades antioxidantes de bioflavonóides no tratamento de várias doenças. A naringina, um flavonóide glicosilado, é o principal flavonóide presente em toranjas e constituem até 10% do peso seco (Ishii et al., 1996). Naringina já foi avaliado como anticancerígeno potente (Aboobaker et al., 1994) e agente hipolipidêmico (So et al., 1996). Exibe também atividade antioxidativa (Lambeve et al., 1980), contudo nenhuma atividade mutagênica (Fisher, 1982). Alguns autores também mostraram os efeitos da naringina no LDL-colesterol pela inibição da HMG-CoA redutase em ratos alimentados com alto teor de colesterol (Shin et al., 1999) ou alto teor de gordura e colesterol (So et al., 1996) e a naringenina teve efeitos moderados sobre a vitamina E plasmática em coelhos alimentados com alto teor de colesterol (Jeon et al., 2001).

Kim et al. (2004) mostraram que a naringina reduz as concentrações de colesterol plasmático pela inibição da atividade da HMG-CoA redutase hepática e aumento na excreção de esteróis fecais. Aumentou também as atividades de

enzimas antioxidantes hepáticas, contra stress oxidativo em modelos animais hipercolesterolêmicos.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar o melhor modelo animal para o trabalho com disfunções lipídicas. Assim com a ação de alguns flavonóides e corantes no tratamento destas disfunções e seu possível mecanismo de ação.

2 . REVISÃO DE LITERATURA

2.1 . Digestão, absorção, metabolismo lipídico e dislipidemias.

2.1.1 . Digestão

A maior parte das gorduras e óleos consumidos são ingeridos como triacilglicerídeos. A digestão das gorduras em mamíferos termina principalmente no intestino delgado (duodeno). Supõe-se que, no processo de digestão, há liberação dos ácidos graxos das moléculas de triacilgliceróis, que são hidrolisadas por uma enzima chamada lipase secretada principalmente pelo pâncreas e também na mucosa intestinal. A lipase hidrolisa os triacilglicerídeos em diglicerídeos, e logo atua sobre os diglicerídeos para transformá-los em monoglicerídeos, além disto, a lipase produzida pela mucosa intestinal pode ajudar a hidrolisar os monoglicerídeos em glicerol e ácidos graxos (FAs) livres, desta forma as grandes cadeias de gorduras são hidrolisadas em moléculas menores e menos complexas.

Ácidos graxos são moléculas ricas em energia que possuem papéis metabólicos importantes. Eles também são parte integrante das células como componentes da membrana, podendo influenciar na fluidez e com função de receptor ou de canal. Durante os últimos 10 anos, ficou evidente que FAs

também podem agir como moléculas sinalizadoras envolvidas na regulação da expressão do gene. A maior parte destes genes tem como objetivo codificar proteínas com papéis no transporte ou metabolismo de FA. A mudança correspondente na quantidade de proteínas específicas é um processo adaptativo que as células desenvolveram como resposta a variações na concentração de FA de tecido vizinhos aos designados (Duplus et al., 2000).

Como os ácidos graxos não são hidrossolúveis, eles são emulsionados no trato digestivo pelos sais biliares contidos na bile, que é produzida no fígado e secretada ao duodeno através do ducto biliar. Os sais biliares emulsificam as gorduras para que possam ser absorvidas e para que a absorção termine é necessário que se formem pequenos corpúsculos globulares (chamados micelas) de aproximadamente 30-100 Amstrongs de diâmetro, os quais são parcialmente solúveis em água.

As micelas são formadas pelos ácidos graxos livres, sais biliares e monoglicerídeos, sendo que as porções hidrofílicas dos sais biliares se orientam na periferia das micelas, enquanto que as porções hidrofóbicas se orientam no interior destas micelas que são transportados através das membranas das vilosidades intestinais, onde são absorvidos (Cheeke, 1995).

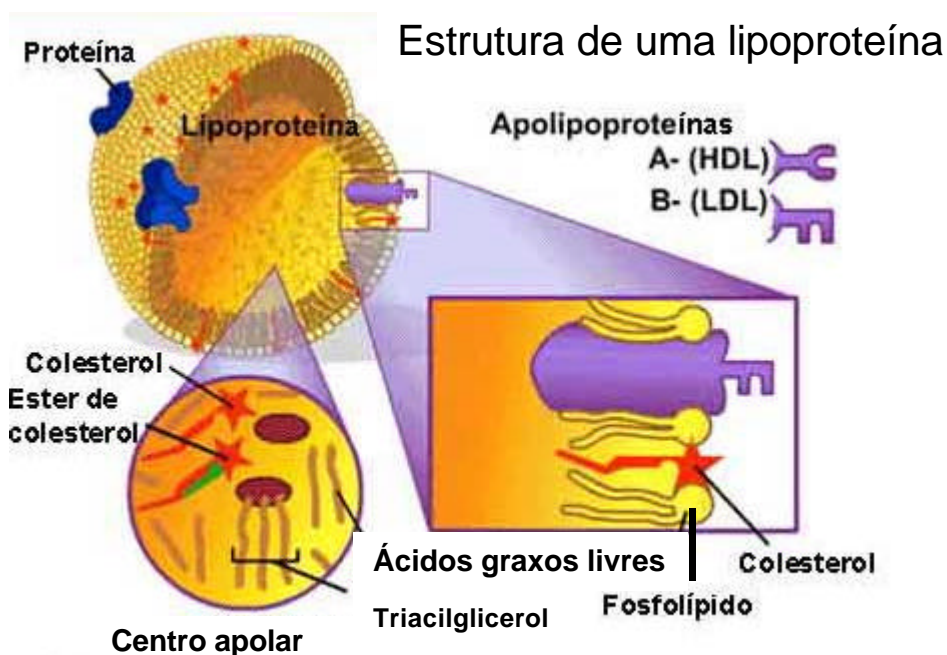
Dispõe-se de escassa informação sobre os pontos específicos da digestão dos lipídeos no coelho, mas, provavelmente, tem lugar fundamental no intestino delgado, onde se agregam a lipase e a bile (Cheeke, 1995). Os ácidos graxos insaturados consumidos pelos ruminantes se hidrogenam no rúmen, convertendo-se em ácidos graxos saturados, que determinam o alto conteúdo destes ácidos na carne dos ruminantes. Não se sabe se esta hidrogenação tem lugar no intestino grosso do coelho, mas, como a absorção se realiza no intestino delgado, é pouco provável que se produza uma hidrogenação apreciável das gorduras insaturadas no coelho.

2.1.2 . Absorção

Quando as micelas entram em contato com a parede intestinal, as lipases e colipases aí produzidas desfazem estas micelas, os ácidos graxos livres, o glicerol e os monoglicerídeos são absorvidos, enquanto que a bÍlis não

é absorvida, permanecendo na luz intestinal. Dentro das células da mucosa intestinal, os ácidos graxos e os monoglicerídeos são reconstituídos a triacilglicerídeos, que combinados com colesterol, fosfolipídios e com algumas proteínas, se reintegram ao sangue principalmente na forma de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ou na forma de quilomícrons e em menor porcentagem como lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL).

Na nutrição humana, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que são chamadas pelos médicos de “mau colesterol”, devido ao seu elevado percentual de colesterol, com 40%, além de 10% de proteínas, 20% de fosfolipídios, 29% de triacilgliceróis e 1% de ácidos graxos livres, enquanto que as lipoproteínas de alta densidade (HDL), chamadas de “bom colesterol”, se apresentam com 25% de colesterol, 41% de proteínas, 28% de fosfolipídios, 3% de triacilgliceróis e 3% de ácidos graxos livres. A estrutura esquemática de uma lipoproteína está mostrada na figura 1.



Fonte:
http://medscape.elmundo.es/medscape/terapeuticas/26/terapeuticas_26_imprimir.html, 2001.

Figura 1 – Estrutura básica de uma lipoproteína.

O colesterol está presente nos tecidos e nas lipoproteínas plasmáticas, 25% como colesterol livre e 75% esterificado com ácido graxo de cadeia longa, principalmente linoléico e oléico. É sintetizado em diversos tecidos, a partir de Acetil-CoA e eliminado, via bile, como colesterol ou sais biliares (Murray et al., 2000).

A maioria dos tecidos armazena colesterol na forma de ésteres de colesterila. A lipoproteína LDL é o transportador do ingresso de colesterol e dos ésteres de colesterila em diversos tecidos. O colesterol livre é removido dos tecidos pela lipoproteína HDL e transportado ao fígado para conversão em sais biliares. A LDL tem seu papel fundamental na gênese de aterosclerose, podendo causar problemas cerebrovasculares, coronarianos e na circulação periférica. A aterosclerose coronariana está correlacionada a uma alta relação LDL:HDL (Pinckney e Pinckney, 1973).

Os lipídeos no soro existem na forma de lipoproteínas, contendo colesterol, ésteres de colesterila, triacilgliceróis e fosfolipídios (Pinckney e Pinckney, 1973).

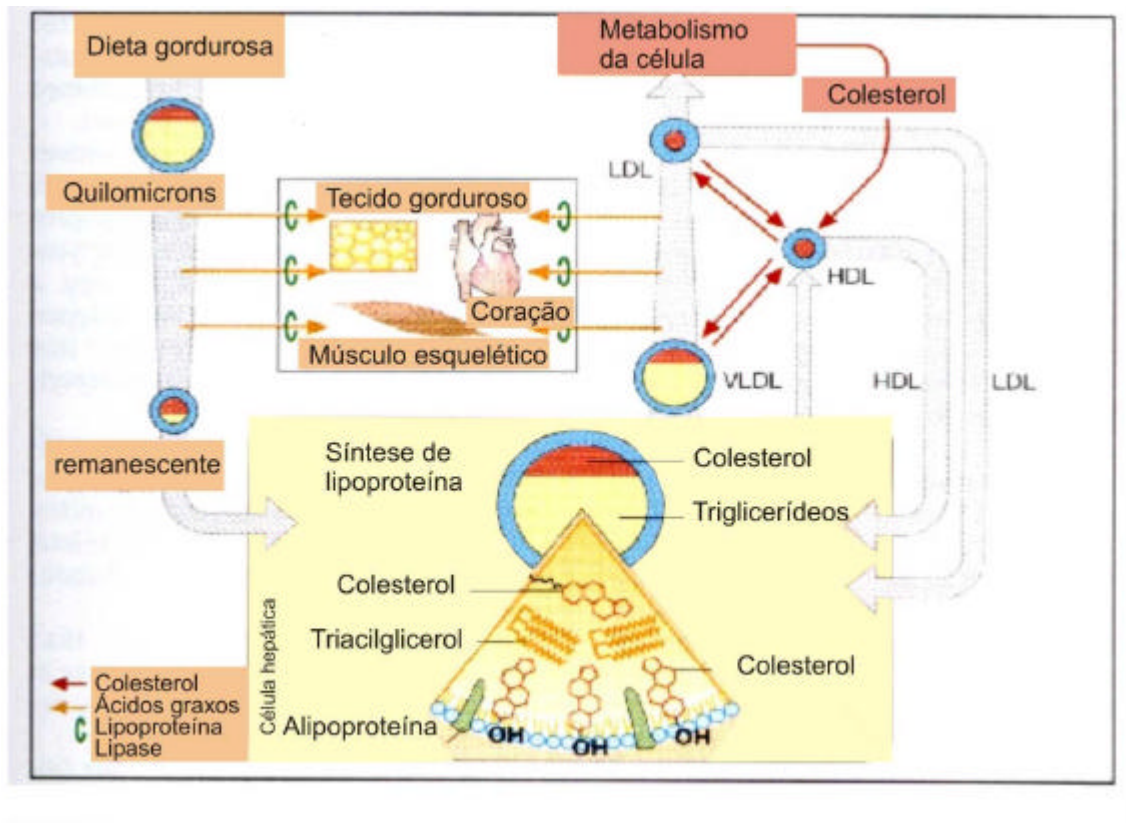
2.1.3 . Metabolismo de Lipídeos

O metabolismo dos lipídeos e lipoproteínas está subdividido em dois ciclos (Scartezini, 2000):

Ciclo exógeno: Os enterócitos absorvem os lipídeos da dieta na forma de colesterol livre, ácidos graxos e monoacilglicerol. Após reesterificação, os ésteres de colesterol e triacilgliceróis são incorporados no centro da partícula de quilomícron (Qm). A síntese da apo B-48 pelas células intestinais, além de outras apolipoproteínas do grupo A, junto com os fosfolipídeos, formam a camada superficial da macromolécula de Qm. Essa lipoproteína uma vez sintetizada é secretada, passa pela linfa intestinal e tem acesso ao sistema vascular via ducto torácico. Posteriormente à secreção, ocorrem várias modificações no Qm, que ao interagir com a lipoproteína HDL, capta apo (C-II, C-III, E) e colesterol. Ao adquirir apo C-II, o Qm sofre a ação da **LLP (lipase lipoprotéica)**, enzima ancorada através de uma proteoglicana, no endotélio capilar dos tecidos periféricos, especialmente o adiposo e o muscular. A **LLP** age hidrolisando os triacilgliceróis do Qm, e os ácidos graxos liberados podem

ser utilizados como energia ou para resíntese de triacilglicerídeos em estocagem no tecido adiposo. Com o processo da hidrólise, o Qm reduz de tamanho e alguns componentes como fosfolipídeos (PL), colesterol livre e apolipoproteínas são transferidos para HDL ou dão origem a partículas precursoras de HDL. Passa a se chamar de Q remanescente (Qr), contendo alto teor de colesterol e apo E. Os remanescentes do Qm são então captados pelo fígado através de receptores específicos (LRP = LDL receptor-related protein = proteína de ligação ao receptor LDL). Este receptor LRP é da família do receptor LDL, com grande semelhança, e através de estudos bioquímicos, mostrou-se que LRP liga-se a certas partículas lipoprotéicas ricas em apo E incluindo o Qr. Esta ligação é mediada presumivelmente por quatro domínios no LRP, que é homólogo ao domínio de ligação apo E no receptor LDL. No interior das células, os Qr são fragmentados e parte do material lipídico é aproveitado, sendo o excedente reorganizado em outro tipo de lipoproteína, juntamente com a parte sintetizada pelo fígado.

Ciclo endógeno: o tecido hepático sintetiza e secreta a lipoproteína VLDL, rica em TAG endógeno, além do colesterol derivado do Qr ou da síntese de novo fosfolipídeos e apo B-100. As apolipoproteínas C-II, C-III e E, também estão presentes na VLDL nascente, mas provavelmente, adquirem da HDL na circulação, da mesma maneira que o Qm na via exógena. O tamanho das partículas de VLDL secretado pelo fígado varia de acordo com a disponibilidade de TG e situações onde está em excesso (ex. obesidade, diabete melitus, alcoolismo), essas partículas secretadas são maiores. A transformação metabólica inicial é um processo lipolítico, mediado pela **LLP** na presença da apo C-II, análogo ao Qm, produzindo partículas remanescentes de VLDL ou IDL, contendo éster de colesterol e apo E. A IDL tem dois caminhos: 1^o) pode ser removida pelo fígado num processo dependente de apo E para ligação com o receptor (LRP) e da apo B para o receptor B/E (descrito por Brown e Goldstein (1984) como “receptor de LDL”), ou 2^o) sofrer hidrólise pela **LHTG (lípase triglicéride hepática)** para formar a LDL. A LDL pode ser captada por receptores B/E, existentes nos tecidos hepáticos e/ou extra-hepáticos. O principal determinante da concentração plasmática de colesterol é o número inicial de receptores LDL (B/E) (Scartezini, 2000).



Fonte: Lüllmann et al., 2000.

Figura 2 – Metabolismo geral dos lipídeos.

2.1.3.1 . Catabolismo dos lipídeos

A oxidação de ácidos graxos é a principal fonte de energia no catabolismo de lipídeos. Ambos, os triacilgliceróis, que são a principal forma de armazenamento de energia química dos lipídeos e os fosfoacilgliceróis, importantes componentes das membranas biológicas, possuem ácidos graxos ligados covalentemente como parte de suas estruturas. Em ambos os tipos de compostos, as ligações entre o ácido graxo e o resto da molécula podem ser hidrolisadas, em uma reação catalisada por um grupo específico de enzimas, as **lipases**, no caso de triacilgliceróis, e as **fosfolipases**, no caso de fosfoacilgliceróis (Campbell, 2001).

Várias fosfolipases hidrolisam fosfoacilgliceróis. Elas são designadas A₁, A₂, C e D, conforme seus sítios de hidrólise. O local de ação das fosfolipases A₂ é o sítio B, e o nome fosfolipase A₂ é o resultado de um acidente histórico.

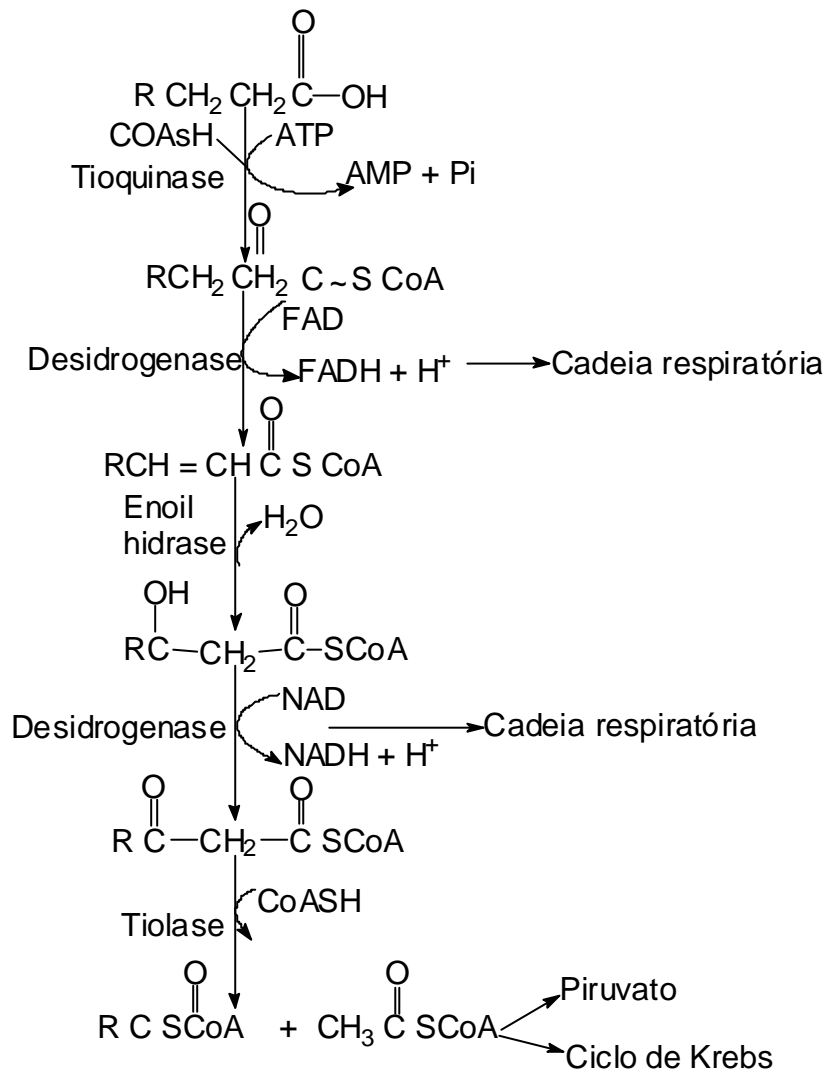
A oxidação de ácidos graxos começa com a ativação da molécula. Nessa reação, uma ligação tioéster é formada entre o grupo carboxila do ácido graxo e o grupo tiol da coenzima A (CoA-SH). A forma ativada do ácido graxo é uma acil-CoA, cuja natureza exata depende do ácido graxo em questão. A enzima que catalisa a formação da ligação éster é a **acil-CoA-sintase**, que requer ATP para sua atividade. O ácido graxo ativado no citosol deve ser transportado para a mitocôndria para que o resto do processo de oxidação possa ocorrer.

A acil-CoA pode cruzar a membrana mitocôndria externa, mas não pode atravessar a membrana interna. No espaço intermembrana, o grupo acila é transferido à carnitina por meio de uma transesterificação; essa reação é catalisada pela enzima **carnitina-aciltransferase**, que fica situada na membrana mitocôndria interna. Na matriz, o grupo acil é transferido da carnitina para a CoA-SH mitocôndria por outra reação de transesterificação.

Na matriz, uma seqüência repetida de reações quebra sucessivamente duas unidades de carbono do ácido graxo a partir do terminal carboxílico. Esse processo é chamado de β -oxidação (figura 3), visto que a quebra oxidativa acontece no carbono β do grupo acila esterificado até CoA. O carbono β do ácido graxo original torna-se o carbono carboxílico na próxima fase de degradação. Todo ciclo requer quatro reações.

1. A acil-CoA é oxidada a uma α β acil-CoA insaturada (também chamada de β -enoil-CoA). O produto tem um arranjo trans na ligação dupla. Essa reação é catalisada por uma **acil-CoA-desidrogenase** dependente de FAD.
2. A acil-CoA insaturada é hidratada para produzir uma β -hidroxiacil-CoA. Essa reação é catalisada pela enzima **enoil-CoA-hidratase**.
3. Uma segunda reação de oxidação é catalisada pela **β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase**, uma enzima dependente de NADH. O produto é uma β -cetoacil-CoA.
4. A enzima **tiolase** catalisa a clivagem da β -cetoacil-CoA; uma molécula de CoA é necessária para essa reação. Os produtos são uma acetil-CoA e uma

acil-CoA, que têm dois carbonos a menos do que a molécula original que entrou no ciclo de β -oxidação. A CoA é necessária nessa reação para formar uma nova ligação tioéster com a molécula de acil-CoA menor. Essa molécula menor sofre, então, outra volta no ciclo de β -oxidação.



Fonte: Campbell, 2001.

Figura 3 - A β oxidação.

Os ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono também sofrem o processo de β -oxidação. O último ciclo da β -oxidação produz uma molécula de propionil-CoA. Existe uma via enzimática que converte a propionil-CoA em succinil-CoA, que então entra no ciclo do ácido cítrico. Nessa via, a

propionil-CoA é primeiro carboxilada a metilmalonil-CoA, em uma reação catalisada pela **propionil-CoA-carboxilase**, e depois sofre um rearranjo para formar a succinil-CoA. Uma vez que a **propionil-CoA** também é um produto do catabolismo de vários aminoácidos, sua conversão em succinil-CoA também ocorre no metabolismo dos aminoácidos.

A conversão de ácidos graxos insaturados para acetil-CoA requer duas reações que não são encontradas na oxidação de ácidos saturados: uma isomerização cis-trans e uma epimerização.

Além da β oxidação a célula hepática opera a α oxidação e W. A W é para a formação dos ácidos dicarboxílicos, particularmente do retículo endoplasmático, de função ainda desconhecida nos animais, participa do sistema o citocromo P₄SO antigo citocromo C.

A β oxidação é realizada por uma peroxidase, atua somente em ácidos graxos com + de 13 carbonos, assume importância no caso do ácido fitânico, resultante da oxidação do fitol (resíduo alcoólico hidrolisado da clorofila), que é degradado por α oxidação no fígado e cérebro resultando em CO₂ e H₂O.

2.1.3.2 . Catabolismo da LDL

Os trabalhos de Brown e Goldstein (1984) tiveram grande repercussão, pois elucidaram o metabolismo da LDL através de receptores. Os receptores de LDL se agregam em regiões especializadas da membrana (coated pits = cavidades revestidas) que se ligam às lipoproteínas LDL e são internalizadas e conduzidas aos lisossomos para degradação. Depois da reação no endossomo, os receptores recirculam para a superfície celular para se ligarem a outras partículas de LDL. O colesterol liberado da LDL exerce três ações regulatórias: 1) aumenta a atividade da **ACAT (acil-colesterol-acil-transferase)** para a esterificação do colesterol; 2) diminui a atividade da **HMGCoA redutase**, responsável pela biosíntese do colesterol endógeno; 3) diminui a síntese de receptores celulares para LDL, com isso aumenta seu nível plasmático (Smith et al., 1993). Portanto, a síntese intracelular de colesterol e dos receptores B/E varia na razão inversa da captação do colesterol plasmático.

A lipoproteína HDL é secretada pelo fígado e intestino na forma de partícula discóide, HDL nascente, contendo fosfolípidos, apo A-I e A-II. Além disso, uma porção de HDL nascente provém do catabolismo das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (Qm e VLDL) na circulação. As partículas de HDL nascente captam colesterol livre nos tecidos periféricos e são convertidas na circulação em partículas esféricas, maduras, pela ação da **LCAT** que esterifica o colesterol. Estas são responsáveis pelo transporte reverso do colesterol, processo pelo qual o colesterol excedente é removido dos tecidos periféricos para o fígado. O retorno ao fígado ocorre diretamente ou pela transferência de colesterol esterificado para a VLDL e IDL, sob a ação da enzima **CETP (cholesterol éster transfer protein = proteína de transferência do colesterol)**, encontrada no plasma, que em troca transfere triacilgliceróis para a HDL. O colesterol ao chegar no fígado pode ser reaproveitado, interagindo com outras vias metabólicas, produzir ácidos biliares ou ser excretado na bile, e em condições normais ser reabsorvido em cerca de dois terços pelo ciclo entero-hepático (Scartezini, 2000).

O fígado parece ser o principal sítio de Lp(a), uma vez que após transplante hepático, a isoforma do doador passa a dominar na circulação do receptor. Há indícios de que a união entre a apoA e a LDL-apoB ocorra ainda no interior do hepatócito. Porém, existe a possibilidade de ligação e montagem da Lp(a) no plasma. Conforme elucidado através de estudos, a Lp(a) não é produto metabólico de outras lipoproteínas contendo apo-B, como a VLDL, sendo, portanto sintetizada independente das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis. Isso justificaria a observação de que a mesma não é influenciada pela dieta. O metabolismo da Lp(a) não está completamente elucidado e os estudos demonstram que as variações de suas concentrações plasmáticas dependem mais de síntese do que catabolismo desta lipoproteína.

2.1.3.3 . Função e Classificação das Apolipoproteínas

As apolipoproteínas são proteínas que fazem parte da estrutura das lipoproteínas e desempenham diversas funções no metabolismo lipoprotéico. Fazem ligação com receptor específico, ativação ou inibição de determinadas enzimas envolvidas no metabolismo lipídico. Conseqüentemente, determina os

sítios de captação e a velocidade de degradação dos constituintes lipoprotéicos. Contribuem para a solubilização e estabilização dos lipídeos (colesterol esterificado e triacilgliceróis), e pela interação com os fosfolipídeos nas lipoproteínas.

São reunidas em grupos e cada uma destes grupos recebem uma designação pela ordem alfabética (Scartezini, 1997). A tabela 1 apresenta algumas informações sobre as apolipoproteínas humanas.

Tabela 1: Principais características das apolipoproteínas.

APOLIPOPROTEÍNAS	FUNÇÃO	LP DE MAIOR CONCENTRAÇÃO
A-I	Ativa a LCAT, efluxo de colesterol	HDL
A-II	Inibe a LCTA	HDL
A-IV	Transporte de triacilgliceróis no Qm	Qm e HDL
B-100	Transporte lipídeos e catabolismo LDL	VLDL e LDL
B-48	Transporte do Qm	Qm
C-I	Ativação da LCAT?	Qm e VLDL
C-II	Ativação da LLP	Qm e VLDL
C-III	Inibição da LLP?	HDL
D	Ativação LCAT? Transferência lipídeos	HDL
E	Catabolismo IDL	VLDL

Adaptado SCARTEZINI, M.; et al. In: MARTINEZ, Tânia L. R (ED.) Conduta clínica nas dislipidemias, 1997, Belo Horizonte. **Health**. 25-40.

2.1.3.4 . Anabolismo de ácidos graxos

O primeiro passo na biosíntese do ácido graxo é o transporte de acetil-CoA para o citosol. O mecanismo de transporte baseia-se no fato de o citrato poder cruzar a membrana mitocôndria. A acetil-CoA condensa-se com oxaloacetato formando citrato. O citrato que é exportado para o citosol pode, por

meio da reação reversa, produzir oxaloacetato e acetil-CoA. A acetil-CoA entra na via de biosíntese de ácidos graxos, ao passo que o oxaloacetato passa por uma série de reações em que há uma substituição de NADPH por NADH. Essa substituição representa um meio de controle sobre a via, visto que o NADPH é necessário para o anabolismo dos ácidos graxos.

No citosol, a acetil-CoA é carboxilada e produz a malonil-CoA, um intermediário fundamental na biosíntese de ácidos graxos. Essa reação é catalisada pelo complexo **acetil-CoA-carboxilase**, constituído de três enzimas, e que requer Mn^{2+} e biotina para a sua atividade, além de ATP. O **acetil-CoA-carboxilase** é constituída por três proteínas, a **biotina-carboxilase**, a **proteína transportadora de biotina** e a **carboxil-transferase**. A **biotina-carboxilase** catalisa a transferência do grupo carboxila para a biotina. O “CO₂ ativado” (o grupo carboxila derivado do íon bicarbonato HCO₃⁻) é ligado covalentemente à biotina. A biotina (carboxilada ou não) é ligada à proteína transportadora de biotina por meio de uma ligação amida envolvendo o grupo amino da cadeia lateral de uma lisina. O grupo que contém a ligação amida ligando a biotina à proteína transportadora é suficientemente longo e flexível, movendo a biotina carboxilada e posicionando-a de modo a transferir o grupo carboxila para a acetil-CoA e produzindo a malonil-CoA, em uma reação catalisada pela **carboxil-transferase**.

A biosíntese de ácidos graxos envolve ainda a adição sucessiva de duas unidades de carbono à cadeia lipídica crescente. Dois dos três átomos de carbono do grupo malonil da molécula de malonil-CoA são acrescentados à cadeia crescente de ácido graxo, em cada estágio da reação de biosíntese. Essa reação, como a formação da própria malonil-CoA, requer um complexo multienzimático localizado no citosol, sem estar ligado a qualquer membrana. O complexo, composto por enzimas individuais, é designado **sintase de ácidos graxos**.

O produto habitual da síntese de ácidos graxos é o palmitato, um ácido graxo saturado de 16 carbonos. Todos os 16 carbonos vêm do grupo acetil da acetil-CoA. Inicialmente, há um passo preparatório no qual uma molécula de acetil-CoA é necessária para cada molécula de palmitato a ser produzida. Nessa etapa preparatória, o grupo acetil da acetil-CoA é transferido a uma proteína carreadora de acilas (ACP, acyl carrier protein) que é considerada uma parte do

complexo da sintase ácidos graxos. O grupo acetil é ligado à proteína formando um tioéster. Na proteína, o grupo acetila liga-se a um grupo 4'-fosfopanteteinato, que, por sua vez, está ligado à cadeia lateral de uma serina, sendo este grupo estruturalmente semelhante a CoA-SH. O grupo acetila é transferido da CoA-SH, à qual está ligado por meio de uma ligação tioéster, para a ACP.

Os quilomícrons têm organização especialmente destinadas ao transporte de triacilgliceróis, em tempo relativamente pequeno uma lipase sangüínea libera ácido graxo livres e glicerol, em condições normais o material do quilomícron é depositado na célula adiposa onde se processa a síntese de triacilgliceróis, quando em jejum, os componentes do quilomícron são hidrolisados no fígado e músculo estriado e cardíaco, pelas mitocôndrias a CO_2 e H_2O produzindo também corpos cetônicos que são transferidos para o tecido muscular onde sofrem oxidação também na matriz mitocondrial. No citossol existe a biossíntese dos ácidos graxos.

2.1.3.5 . Síntese do colesterol

O colesterol é um composto do tipo álcool esteróide de 27 átomos de carbono, 17 destes átomos de carbono participam da formação de um anel característico, que recebe o nome de anel ciclopentanoperidrofenantreno ou também chamado peridrociclopentanofenantreno. Este anel caracteriza a todos os compostos designados como esteróides.

O colesterol provém da dieta e da síntese pelo organismo. A dieta balanceada contém de 300 a 600 mg/dia, cerca da metade origina-se dos ovos e o restante dos laticínios e da gordura animal. Ele é precursor dos ácidos biliares e dos hormônios esteroidais.

O colesterol total no sangue varia entre 150 e 250 mg/dL. É formado por duas frações, o colesterol livre e o esterificado (este, combinado com ácidos graxos), representando respectivamente, 20 a 40% e 60 a 80% do total. A relação entre as duas frações se mantém constante, a despeito das amplas variações da colesterolemia que podem ocorrer em estados patológicos, exceto

em moléstias do fígado, nas quais a redução da parte esterificada é proporcional à gravidade da lesão parenquimatosa, podendo atingir 20-30% do total.

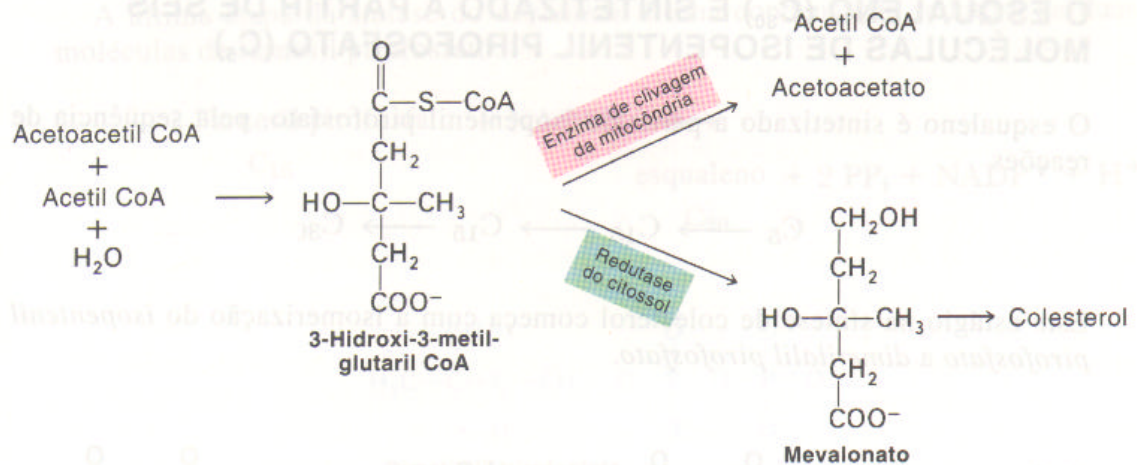
A hipercolesterolemia ocorre na diabetes com taxas de até 3.600 mg/dL, na síndrome nefrótica com valores de 500 e 700 mg/dL podendo chegar até 2200 mg/dL. Na glomerulonefrite, a colesterolemia geralmente se acha dentro dos limites da normalidade. No hipotireoidismo, a hipercolesterolemia é constante, estando em relação proporcional com a redução do metabolismo basal. As moléstias do trato biliar, como icterícia, são acompanhadas de hipercolesterolemia, não havendo comprometimento do parênquima hepático. Na anestesia pelo éter têm sido assinaladas taxas elevadas de colesterol durante e após o ato cirúrgico. Na aterosclerose pode ocorrer hipercolesterolemia e, ou, hiperlipidemia. O nível de colesterol e, ou, dos lipídeos totais pode conferir significação prognóstica quanto ao risco de acidente vascular.

A hipercolesterolemia é verificada com freqüência também nas xantomatoses, xantelasma, xantoma diabético, xantoma tuberoso, na hiperlipidemia idiopática familiar, na osteoartrite hipertrófica, na catarata senil e na psoríase.

O colesterol é formado a partir de acetil CoA. A etapa principal de sua síntese é a formação de mevalonato a partir de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (derivado de acetil CoA e acetoacetil CoA) (figura 4). O mevalonato é convertido a isopentenil pirofosfato (C₅), que se condensa com seu isômero, dimetilalil pirofosfato (C₅), para formar geranyl pirofosfato (C₁₀). A adição de uma segunda molécula de isopentenil pirofosfato fornece farnesil pirofosfato (C₁₅), que se condensa consigo mesmo para formar esqualeno (C₃₀), o qual se converte em lanosterol, zimosterol, colestadienol, desmosterol e por último em colesterol (C₂₇). A síntese de colesterol pelo fígado é regulada por variações na quantidade e na atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase. A transcrição do gene, a tradução do mRNA e a degradação da proteína são rigorosamente controladas. Adicionalmente, a atividade da redutase é regulada por fosforilação (Stryer, 1996).

O colesterol é produto do metabolismo lipídico, somente os animais produzem colesterol, os vegetais não o produzem. É um composto sumamente

importante, porque forma parte dos lípidos que integram as membranas biológicas, além de servir como precursor para uma grande série de compostos hormonais vitais, como os andrógenos, testosterona, progesterona, glicocorticóides, mineralocorticóides (como a aldosterona), além da vitamina D, entre outros.



Fonte: Stryer, 1996.

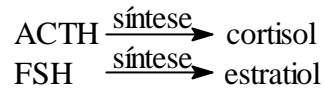
Figura 4 - Síntese e destinos da 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA.

2.1.3.6 . Colesterol-HDL

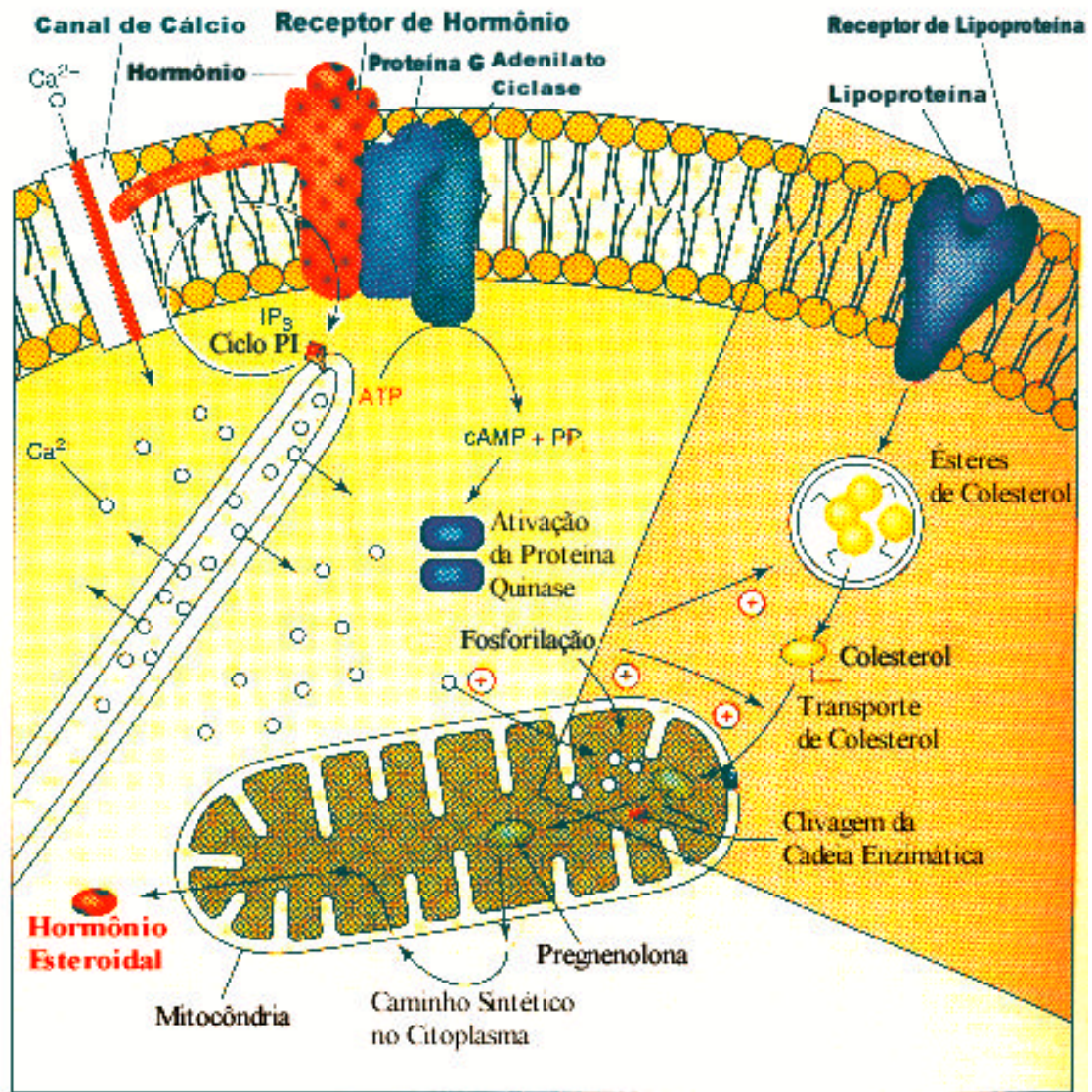
Os indivíduos com colesterol-HDL elevado correm menor risco de doenças coronarianas, em contrapartida, aqueles níveis baixos são mais sujeitos a acometimentos das coronárias. Isto porque o colesterol-HDL transporta o colesterol da circulação para o fígado, onde é metabolizado. Os valores normais do colesterol-HDL são nos homens de 30 a 40 mg/dL, nas mulheres de 40 a 50 mg/dL. O consumo moderado de álcool parece aumentar o nível de HDL-c em indivíduos de vida sedentária.

Nas células, as lipoproteínas, como o colesterol-LDL e o colesterol-HDL, participam da síntese de hormônios esteroidais que são obtidos a partir do colesterol, de acordo com a figura 6. Um hormônio ACTH e FSH (hormônio foliculo estimulante), por exemplo, se liga a um receptor hormonal e ocorre a

ligação do receptor hormonal, com a proteína G e enzima adenilato ciclase, que podem estar diretamente relacionadas com o canal de Ca^{+2} .



A adenilato ciclase é ativada e ativa o ATP, que se transforma em AMP cíclico. O AMP cíclico por sua vez ativa a proteína quinase e esta provoca a fosforilação de proteínas. As proteínas fosforiladas atuam como moduladores positivos e hidrolisam o éster de colesterol a colesterol em seu transporte para o interior da mitocôndria. O éster de colesterol é obtido de lipoproteínas. A lipoproteína que mais contém éster de colesterol é o LDL, contendo 1.500 moléculas do éster, contra 500 de colesterol. Esta lipoproteína pode se ligar a receptores de LDL e é transportada para o interior da célula. As proteínas fosforiladas modulam positivamente, no citoplasma, a hidrólise dos ésteres de colesterol e o transporte destes para o interior da mitocôndria. Nesta organela, são sintetizadas a pregnenolona e outros hormônios esteroidais.



Fonte: Devlin, 1997.

Figura 5 - Esquema de reações de síntese de hormônios esteroidais.

2.1.3.7 . Síntese de lipídeos

Os lipídeos são depositados como triacilgliceróis, no tecido adiposo ou no fígado para seu posterior uso.

Quando existe um excesso na ingestão alimentar (energia), é produzido um excesso de oxalacetato e então, o piruvato não é usado no ciclo de Krebs, mas se empenha para produzir depósitos de gorduras, para que o piruvato se converta em Acetil CoA.

O Acetil CoA se converte a malonil CoA, graças a uma proteína transportadora de acilos (ACP) e com ajuda da vitamina biotina como cofator, se forma aceto-acetil-ACP, produto que é reduzido usando dois mols de NADPH₂, para formar butiril CoA, o complexo enzimático chamado ácido graxo sintetase se encarrega então de aumentar a cadeia do ácido graxo. Todos os tecidos são efetivos para armazenar gordura, porém, o tecido adiposo e o fígado, são os principais sítios onde se armazenam a gordura.

2.1.3.8 . Triacilgliceróis

A taxa normal de triacilgliceróis no soro varia, em pessoas normais, entre 50 a 150 mg/dL, sendo um pouco mais baixa nas mulheres. Vários fatores podem alterar estes valores independentes da patologia.

A taxa de triacilgliceróis está elevada na diabete, na síndrome nefrótica, na pancreatite, na hiperlipidemia essencial, na aterosclerose e nas doenças coronarianas.

2.1.4 . *Dislipidemias*

Dislipidemia é o principal fator de risco no desenvolvimento de aterosclerose (Vosper et al., 2002) e doenças arteriais coronarianas (Fruchart et al., 2001).

As dislipidemias podem ser subdivididas em:

- Hiperlipoproteinemias (hiperlipidemias)
- Hipolipoproteinemias (hipolipidemias).

As hiperlipoproteinemias estão, freqüentemente, associadas a um aumento de risco de instalação de outras doenças tais como, as doenças arteriais, a pancreatite, etc.

A causa mais freqüente da alteração das coronárias é a aterosclerose. Este dano é produzido pelo depósito na parede da artéria de determinadas substâncias como o colesterol, cálcio e elementos celulares em forma de acúmulos localizados –placas de ateroma- que estreitam o calibre ou luz do vaso.

Aterosclerose é caracterizada por lesões íntimas causadas pelos chamados ateromas ou placas fibrograxas que se fixam no lúmen vascular, debilitando os meios subjacentes, que sofrem várias complicações (Brown, 2000; Beisiegel e St. Clair, 1996). Ateromas são focais e escassamente distribuídas no princípio, mas com o avanço da doença, eles ficam mais numerosos e às vezes cobrem a circunferência inteira das artérias afetadas (Lee et al., 2001) (figura 6).

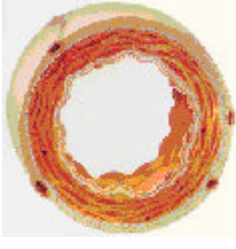
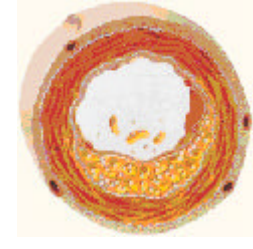
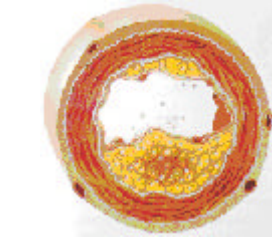
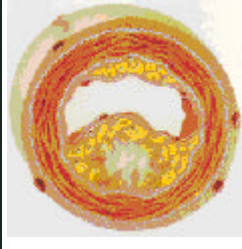
			
<p>Artéria coronária normal</p>	<p>Processo de formação da aterosclerose. Acumulando-se colesterol em uma artéria coronária, se produz a placa de ateroma.</p>	<p>Existe o perigo de se romper à placa e de se formar nela um coágulo de sangue. Os coágulos podem obstruir completamente a artéria</p>	<p>Com 75-80% de obstrução da artéria coronária.</p>

Figura 6 – Processo de formação da aterosclerose.

Hipercolesterolemia Familiar (FH) é uma doença predominantemente autossomal comum com uma prevalência mundial calculado em 0.2% (Brown e Goldstein, 1986). É causada através de defeitos no gene que codifica o receptor de lipoproteínas de baixa-densidade (LDLR) prevenindo a liberação normal de LDL no plasma LDL. A doença é caracterizada clinicamente através de níveis elevados de LDL-colesterol (LDL-C) no sangue, xantomas do tendão e doença coronárias prematuras (Brown e Goldstein, 1986). Porém, estes sintomas nem sempre estão presente, especialmente, em crianças e conseqüentemente não permitem um diagnóstico seguro. Com uma dieta apropriada e tratamento com

drogas, os pacientes com FH podem reduzir os riscos de doenças coronárias futuras, sendo importante o diagnóstico precoce dos paciente afetados antes do desenvolvimento de sintomas clínicos (Salazar et al., 2000). Assim, a caracterização molecular do gene do LDLR parece ser uma ferramenta útil para o diagnóstico. Foi demonstrado que a doença é causada através de várias mutações diferentes no gene do LDLR (Hobbs, et al., 1992; Varret, et al., 1999; Alberto et al., 1999; Soutar, 1998). Embora a identificação precoce de indivíduos que levam o gene defeituoso possa ser útil na redução do risco de aterosclerose e infarto do miocárdio, as técnicas disponíveis para determinar o número de moléculas de LDLR funcionais são difíceis e caras. Porém, vários autores mostraram que o polimorfismo associado com este gene pode ser usado para monitorar a herança do alelo defeituoso em famílias com FH (Chaves et al., 1996; Humphries et al., 1993; Pulg et al., 1996).

2.2 . Receptores ativados para proliferação de peroxisoma (PPARs)

2.2.1 . Tecido adiposo

O tecido adiposo é um tipo especial de tecido conjuntivo que se caracteriza pela presença de células especializadas em armazenar lipídios, conhecidas como adipócitos. Os lipídios funcionam como reservas energéticas e calóricas, sendo utilizadas paulatinamente entre as refeições. Além desta importante função, os adipócitos auxiliam na manutenção da temperatura corpórea, na formação dos coxins adiposos, além de apresentarem distribuição diferenciada no corpo do homem e no corpo da mulher, ligada as características sexuais secundárias.

Existem duas variedades de tecidos adiposos: o tecido adiposo unilocular e o multilocular. No tecido adiposo unilocular, os adipócitos armazenam o lipídio em uma gotícula única, que ocupa quase todo o espaço celular. Nos preparados histológicos comuns, o local ocupado pela gotícula de lipídio geralmente está vazio, pois os processos de desidratação por álcool ou acetona removem também as gorduras da amostra.

Os adipócitos são sustentados por uma trama de fibras reticulares e envolvidos por uma rede vascular desenvolvida. Os adipócitos não se dividem num indivíduo adulto, o crescimento do tecido se dá principalmente pelo acúmulo de lipídio nas células adiposas já existentes e formadas durante a vida embrionária e num período curto após o nascimento.

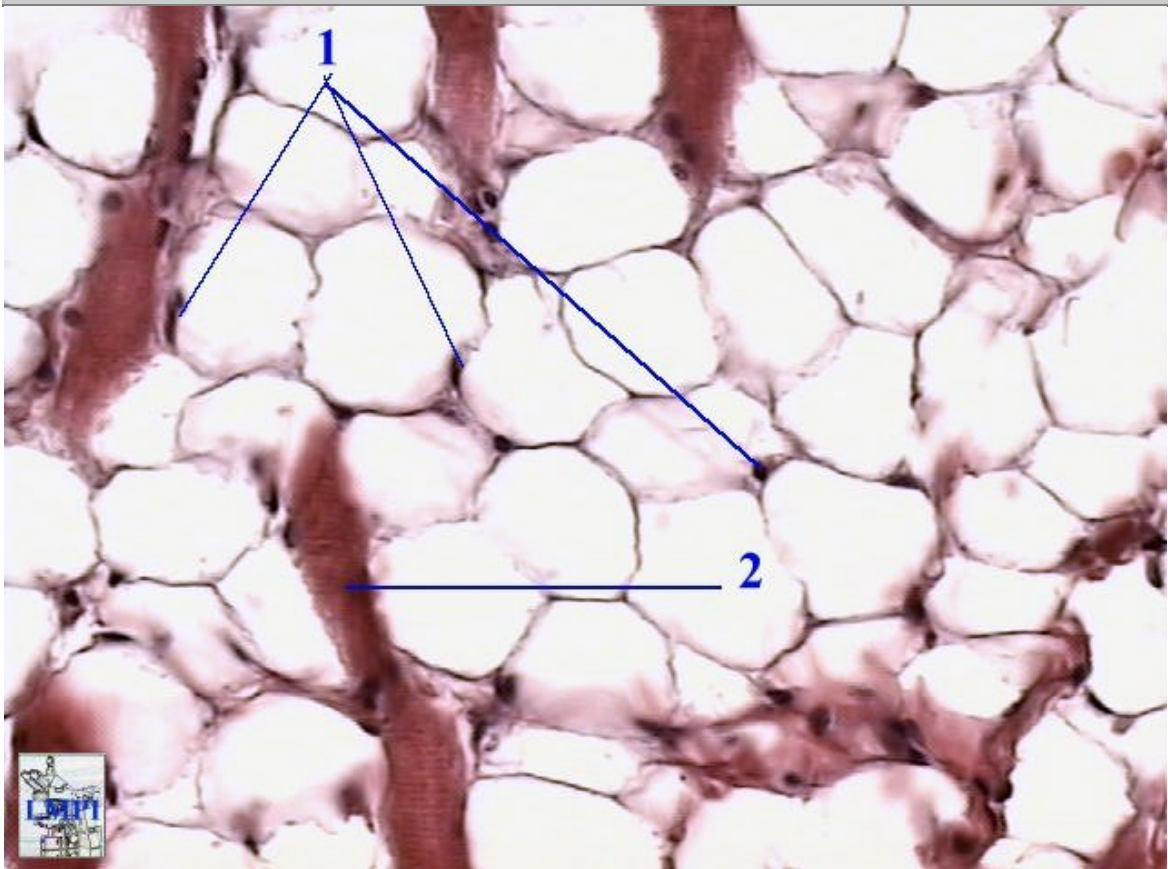
Além do tecido adiposo unilocular, também conhecido como tecido adiposo amarelo, observa-se também o tecido adiposo multilocular ou pardo. Este tipo de tecido adiposo, ao contrário do adiposo amarelo que pode ser encontrado espalhado no organismo, só é observado em fetos humanos recém-nascidos e com certa abundância em animais hibernantes. Os adipócitos do adiposo pardo acumulam lipídios na forma de várias gotículas espalhadas pelo citoplasma, e cercado por uma quantidade maior de citoplasma, quando comparado ao adipócito unilocular. Uma outra característica importante é a abundância em mitocôndrias, que são as responsáveis pela coloração parda do tecido.

A principal função do tecido adiposo multilocular é gerar calor. Através de uma proteína específica nas mitocôndrias destes adipócitos, a energia gerada pela cadeia de elétrons e que produz ATP em outras situações, aqui é convertida em calor, que servirá para aquecer os recém nascidos ou acordar os animais hibernantes.

Acreditava-se que sua ação seria de um depósito de energia passivo, armazenando ou libertando lipídio sob influência de vários hormônios. Porém, agora se sabe que o WAT (tecido adiposo pardo) é um órgão endócrino muito dinâmico com funções pleiotrópicas.

1 - Adipócitos

2 - Fibras musculares estriadas



Fonte: Leal, <http://www2.uerj.br/~micron/atlas/Adiposo/adip0.htm>.

Figura 7 – Tecido adiposo.

O tecido adiposo já não é mais considerado apenas uma estrutura de sustentação e proteção. Nos últimos 10 anos inúmeras pesquisas mostraram que nele se expressa intensa atividade metabólica e endócrina. Na tentativa de se identificar os componentes do sistema homeostático que regula o peso corporal, inúmeros genes foram caracterizados, incluindo vários responsáveis pela obesidade de animais e seres humanos. Desses, os que regulam a síntese de leptina pelo tecido adiposo têm importância central nos mecanismos lipostáticos. A leptina atua em neurônios do sistema nervoso central e modula a secreção de moléculas anorexígenas como o neuropeptídeo Y e a *agouti-related protein*, e a secreção de mediadores que controlam o apetite, como a melanocortina e transcritos que podem ser regulados pela cocaína e

anfetamina. O tecido adiposo sintetiza angiotensina II e aloja em sua membrana a sub-unidade AT1 do receptor da angiotensina. É provável que os componentes do sistema renina-angiotensina dos adipócitos participem da fisiopatologia da hipertensão e de doenças cardiovasculares do paciente com sobrepeso e obesidade. O tecido adiposo sintetiza e secreta vários outros mediadores e citocinas, entre eles a adiposina, o TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), transportadores intra-celulares de glicose, receptores γ ativados por proliferadores de peroxissomas (PPARs) e a resistina, que participam de mecanismos que levam a dislipidemias, resistência à insulina, hipertensão e aterosclerose. O excesso de tecido adiposo, principalmente o visceral, representa uma ameaça à expectativa de vida. Alguns estudos epidemiológicos e fisiopatológicos têm mostrado que a deposição visceral de tecido adiposo é um fator maior de risco no desenvolvimento de hipertensão arterial, resistência à insulina, hiperinsulinemia e *diabetes mellitus* tipo 2. Frequentemente, o obeso é hiperinsulinêmico e hiperleptinêmico e resistente às ações de ambos os hormônios. Suspeita-se que a insulina seja uma molécula aterogênica e que a leptina eleve a pressão arterial, por aumentar a atividade do sistema nervoso simpático. O excesso de adiposidade visceral se associa a hipertrigliceridemia, diminuição do HDL-C, aumento da Apo B e das LDL pequenas e densas, e com níveis de LDL-C normais ou marginalmente anormais. Este tipo de dislipidemia, particular ao obeso resistente à insulina, aumenta consideravelmente o risco de angina de peito e morte relacionado a doença isquêmica miocárdica por coronaroesclerose (Barroso et al., 2002).

2.2.2 . Receptores ativados para proliferação de peroxisoma (PPARs)

Issemann e Green em 1990, seguindo um clonagem de um novo membro da superfamília de receptores esteroidais/tireoidais, o denominaram de peroxisoma proliferator-activated receptor (PPAR), surgindo a hipótese que poderia ser um receptor ativado de FA. Este receptor é ativado pelos agentes hipolipidêmicos de fibratos, proliferator peroxisoma (PP) e xenobióticos em um ensaio de transativação na qual recipientes celulares (usualmente células altamente proliferativas não diferenciadas, selecionadas pela suas altas eficiências de transfecção) são co-transferidos com um vetor da expressão de

PPAR é um gene repórter situado debaixo do controle de uma unidade de transcrição que contém um elemento de resposta reconhecido e ativado pelo receptor. Usando tal ensaio, os laboratórios Gustafsson's (Gottlicher et al., 1992) e o laboratório Wahli's (Keller et al., 1993) mostraram os primeiros FAs que realmente são ativadores de PPAR.

Os PPARs são compostos membros da superfamília de receptor hormonal nuclear de fatores de transcrição. Têm papel importante no metabolismo glicídico e lipídico relacionado a aterogênese. Estudos os têm relacionado ao processo inflamatório envolvido na patogénia da aterosclerose e da reestenose pela sua capacidade de modular a expressão do gene monocítico. A atividade funcional e a expressão PPAR foram observadas em células endoteliais e musculares lisas. Esses estudos sugeriram que os PPARs possam ser considerados como fatores de transcrição redox-sensíveis da parede vascular por sua capacidade de serem ativados seletivamente por ácidos graxos oxidados (Marceau et al., 1999).

A descoberta inicial de um PPAR foi logo ampliada pelo grupo de Wahli, que tinha previamente isolado uma família de três receptores órfã de *Xenopus laevis* (Dreyer et al., 1992), sendo relacionados a PPARs (α , β e γ). Esta estrutura da subfamília é conservada em todos os vertebrados examinados até aqui, com a isoforma β que é chamada δ em algumas espécies, devido a taxas de divergência ligeiramente mais altas observadas nesta isoforma. Mostrou-se desde então que estes três receptores cumprem papéis críticos e sem igual na homeostases de lipídeos e na biologia celular e sua caracterização funcional é unicamente proveniente da percepção do papel de gorduras na saúde e na doença.

O PPAR α interfere no balanço energético e na diferenciação de adipócitos. Foi identificado como receptor de drogas antidiabéticas orais, tiazonedionas, relacionando-o a homeostase da glicose. Estudos recentes mostram divergências quanto a seu papel pró-aterogênico ou antiinflamatório, como supressor da expressão de gene pró-inflamatório em monócitos (Marceau et al., 1999).

Os PPARs ativados heterodimerizam com receptores-x-rexinóides ativados e se ligam ao chamado "elementos resposta na proliferação de

peroxisoma” (PPREs) específico que está localizado no promotor da fita genética. Os PPREs são constituídos por repetições diretas (DR) de seqüências hexaméricas as quais são separadas por um ou dois nucleotídeos (DR1, DR2). A ligação do PPAR ao PPRE induz a expressão da fita genética (Fruchart et al., 2001).

Até a presente data, três subtipos diferentes de PPARs foram reportados (alfa, delta e gama), com cada subtipo de PPAR sendo codificado por um gene específico (Fruchart et al., 2001).

A PPAR α é altamente encontrada no fígado, coração, rim e no tecido adiposo pardo, e moderadamente no intestino, músculo esquelético, timo e testis (Braissant et al., 1996).

Os ativadores de PPAR· têm sido sintetizados. Eles incluem os ácidos fibrícos e derivados (fibratos) e todos eles induzem a proliferação do peroxisoma no fígado, hepatomegalia e câncer de fígado em roedores (Issemam et al., 1990).

2.2.3 . Efeito dos PPARs sobre o processo de diferenciação dos adipócitos

Na sua forma ativada, os PPARs existem como um heterodímero com o receptor ácido 9-cis retinóico, um membro cognato da família de gene receptor nuclear (Kliwer et al., 1992). Os PPARs são fatores de transcrição ligantes-ativados que se ligam a seqüências específicas de DNA conhecidos como elementos resposta na proliferação de peroxisoma (PPREs) situado no promoter de determinados genes. Ligados a ligantes, permite uma mudança conformacional na proteína, que resulta na ligação de moléculas co-ativadoras, como as PPAR ligadas a proteínas, p300 ou PPAR- γ co-ativador-1, proporcionando uma ligação na maquinaria transcricional básica e resultando em um aumento na transcrição de determinados genes (Qi et al., 2000; Spiegelman et al., 2000; Zhu et al., 1997).

A diferenciação de adipócitos ou adipogêneses é um processo altamente controlado que foi extensivamente estudado durante os últimos 25 anos. Os fatores de transcrição adipogênica que são a PPAR- γ e aumento de CCAAT ligado à proteína, têm um papel fundamental na complexa cascata transcricional que acontece durante a adipogênese. Sinalizadores hormonais e

nutricionais afetam a diferenciação de adipócitos de uma maneira positiva ou negativa, em componentes envolvidos nas interações célula-célula ou de célula-matriz, sendo pivô na regulação do processo de diferenciação (Gregoire, 2001).

Adipogênese é o resultado da ativação transcricional e repressão genética de adipócitos (Rangwala e Lazar, 2000; Rosen e Spiegelman, 2000).

O primeiro marcador oficial do processo de adipogênese é a drástica alteração no formato das células como a conversão das células fibroblásticas a formas esféricas. Estas modificações morfológicas são comparadas através de mudanças no nível e tipo de componentes da matriz extracelular (ECM) e o nível de componentes citoesqueléticos (Gregoire, 2001). Recentes estudos indicam que estes eventos são fundamentais para a regulação da adipogênese que podem promover a expressão de fatores transcricionais adipogênicos críticos, inclusive o aumento de CCAAT ligado a uma proteína- α - (C/EBP α) e/ou receptores ativados para proliferação de peroxisoma γ (PPAR γ). A mediação da degradação proteolítica do ECM estromal de preadipócitos pela cascata plasminogênica é requerido para a mudança no formato da célula, para a expressão gênica de adipócitos específicos e para a acumulação de lipídios (Selvarajan et al., 2001). ENC-1, uma drosófila também pode desenvolver um precoce papel regulador na diferenciação de adipócitos, afetando a reorganização do citoesqueleto e a mudança no formato da célula. Em preadipócitos, a ENC-1 localiza-se em filamentos da actina, e seus níveis de mRNA são aumentados passageiramente de 8 para 12 vezes precocemente na diferenciação de adipócitos. A indução de ENC-1 precede a expressão de PPAR γ e C/EBP α , e a diminuição no nível endógeno da ENC-1 inibe efetivamente a diferenciação de adipócitos (Zhao et al., 2000).

Uma forma deficiente da transativação do PPAR δ modificou severamente o domínio AF2, reduzindo seus efeitos. Efeitos semelhantes foram encontrados em células preadiposas Ob1771 ou 3T3-F442A. Estes dados demonstram que PPAR δ fazem um papel central na diferenciação controlada de ácidos graxos em células preadiposas. Além disso, eles sugerem que a modulação da expressão ou atividade de PPAR δ podem afetar as respostas adaptativas do tecido adiposo branco a mudanças nutricionais (Bastie et al., 2000).

Foi mostrado que o PPAR γ fazem um papel central no controle da expressão de gene e adipogênese (Tontonoz et al., 1994; Spiegelman e Flier, 1996; Brun et al., 1996; Gurnell et al., 2000). Ativadores sintéticos e naturais de PPAR γ , como tiazolidinedionas ou 15-deoxy- Δ^{12-14} -prostaglandina J2, são estimuladores potentes da diferenciação terminal de culturas celulares preadiposa (Lehman et al., 1995; Forman et al., 1995). Fibroblastos ectópicos expressam PPAR δ respondendo a LCFA (ácidos graxos de cadeia longa) pela ativação transcricional de genes para a translocação de ácido graxos (FAT/CD36), proteínas ligadas a lipídio do adipócitos (ALBP), e PPAR δ . Embora o tratamento só com ácidos graxos não seja suficiente para ativar a adipogênese, a exposição a uma combinação de ativadores de PPAR δ e de PPAR γ , por exemplo, 2BrP e tiazolidinediona ou para um ativador pan-PPAR, como a prostaciclina, promovem a expressão de um programa típico de diferenciação adiposa e adipogêneses (Bastie et al., 1999).

Muitas diferenças podem existir entre a expressão de PPAR de células preadiposas e fibroblastos, e é crucial examinar o papel destes fatores de transcrição no contexto celular preadiposo para confirmar o papel deles na diferenciação de adipócitos (Bastie et al., 2000).

As estruturas cristalinas de alguns receptores nucleares, inclusive PPAR δ (Xu et al., 1999), fortemente apóiam a hipótese que os ligantes que estão combinados, promovem uma mudança conformacional que resulta na liberação de correpressores e na interação com coativadores, enquanto permitem a transição de um complexo transcricional inativo a um ativo (Glass et al., 1997).

Muitas das mudanças que acontecem durante a diferenciação de preadipócitos realizam-se ao nível da expressão gênica. Vários relatos tentam esquematizar os estágios da diferenciação de adipócitos em uma hierarquia simples de eventos moleculares. A diferenciação genética regulada durante a adipogênese foi categorizada recentemente, intermedeiam e são marcadores de proteínas do mRNA (Morrison e Farmer, 2000; Gregoire, 2001; Rangwala e Lazar, 2000; Rosen e Spiegelman, 2000; Boone et al., 2000; Ntambi e Young-Cheul, 2000). Porém, obter uma cronologia precisa dos eventos moleculares que acontecem durante a diferenciação de adipócitos é uma tarefa difícil. A

apreensão e expansão do crescimento clonal, quando presentes, são acompanhados por mudanças complexas no padrão da expressão gênica que pode diferir de modelos de cultura celular e os protocolos específicos empregados na diferenciação. Além disso, a aquisição progressiva do fenótipo de adipócitos é associada com mudanças na expressão de mais de 2000 genes, como foi reforçado em um recente estudo que usou tecnologia “microarray” para monitorar mudanças globais em perfis da expressão gênica durante a diferenciação 3T3-L1 (Guo e Liao, 2000). Mais de 100 seqüências expressas, juntas representando os genes com uma só característica, foi expressa apenas em preadipócitos ou em adipócitos, indicando claramente que uma pesquisa adicional é necessário para entender completamente o processo de adipogêneses.

Foram intensivamente investigados e recentemente revisados os papéis na ativação e funções nos processos de adipogêneses pelos PPAR γ 2 e o C/EBPs (Rangwala e Lazar, 2000; Rosen e Spiegelman, 2000). Os membros das famílias de C/EBP e PPAR γ 2 são envolvidos na diferenciação terminal pela transativação subsequente de genes específicos nos adipócitos. A exposição de preadipócitos confluentes para o coquetel adipogênico induz a expressão de C/EBP β e C/EBP δ que em troca ativam PPAR γ 2 e C/EBP α . A produção de ligantes apropriados de PPAR γ 2 pela diferenciação de preadipócitos é um provável passo limitando nesta cascata transcricional. A natureza dos ligantes endógenos do PPAR γ 2 e os mecanismos moleculares que regulam sua produção ainda são desconhecidos. Mais recentemente foram propostos que C/EBP β e C/EBP δ fazem papéis na regulação da produção de ligantes de PPAR γ 2 (Rosen e Spiegelman, 2000; Hamn et al., 2001), mas estudos adicionais são necessários para confirmar o envolvimento direto deles neste processo. O papel regulador de PPAR δ , outro membro da família de PPAR, ainda é questão de uma intensa discussão. Em contraste com PPAR γ 2, a expressão de PPAR δ não é restrita ao tecido adiposo branco (WAT). A expressão ectópica de PPAR δ em células lineares fibroblásticas foi originalmente relatada por não ter nenhum efeito na adipogêneses ou na sua promoção (Amri et al., 1995; Brun et al., 1996). Reavaliações recentes do papel de PPAR δ na diferenciação de adipócitos confirmou que sua overexpression em

ambas as células lineares fibroblásticas e adipocítica apóiam a conversão adiposa na presença não-específica (2-bromopalmitato) ou específica (L165041) de ligantes de PPAR δ (Bastie et al., 1999; Bastie et al., 2000; Hansen et al., 2001). Porém, a ativação de PPAR δ endógeno pela L165041 não é suficiente para aumentar significativamente a diferenciação da 3T3-L1 (Hansen et al., 2001, Berger et al., 1999); e a expressão de um mutante dominante negativo PPAR δ na diferenciação de preadipócitos ob17 não é completamente abolida na diferenciação induzida pelo 2-bromopalmitato (Bastie et al., 2000). Então, o impacto de PPAR δ nos processos que conduzem a diferenciação terminal não está claro e sua função biológica precisa necessitar ser determinada.

Além de C/EBPs, PPAR γ 2 e ADD1/SREBP - 1c, vários outros fatores de transcrição, inclusive fatores de transcrição ligados a GATA, GATA-2 e GATA-3 e cAMP elemento responsável pela ligação à proteína (CREB), fazem um papel crítico no controle molecular da transição de preadipócito-adipócito (Reusch et al., 2000; Tong et al., 2000). GATA-2 e GATA-3 são expressos especificamente em preadipócitos branco e os seus mRNAs são downregulated durante a diferenciação de adipócitos. A expressão constitutiva de GATA-2 e GATA-3 suprimem a diferenciação de adipócitos e captam células no estágio de preadipócitos. Este efeito é mediado, pelo menos em parte, pela supressão direta da atividade do promotor PPAR γ 2.

Além de fatores de transcrição, outras moléculas sinalizadoras como pref-1 e Wnts regulam também a diferenciação de adipócitos (Ross et al., 2000, Sul, et al., 2000). Pref-1 é um inibidor da diferenciação de adipócitos e é sintetizado como uma proteína da membrana plasmática que contém seis EGF repetidos no domínio extracelular. Pref-1 é altamente expresso em preadipócitos 3T3-L1, mas não é detectável em células gordas maduras. DEX, um agente de diferenciação, inibe a transcrição de pref-1 e promove assim a adipogênese. A downregulation de pref-1 é requerida para a conversão adiposa e a expressão constitutiva de pref-1 inibe a adipogênese. Reciprocamente, níveis decrescentes de pref-1 através da transfecção anti-senso de pref-1 aumentam imensamente a adipogênese (Sul, et al., 2000). A sinalização da Wnt também parece ser um interruptor molecular que governa a adipogênese. Os preadipócitos que constituem expresso a Wnt-1 não diferem quando tratados

com o coquetel adipogênico. Além disso, a ativação de Wnt que sinaliza abaixo do receptor também inibe a diferenciação, indicando que sinalização da Wnt mantém os preadipócitos em um estado não diferenciado. Este efeito parece ser mediado pela inibição de C/EBP α e PPAR γ .

Adipócitos maduros, os principais componentes celulares do WAT, são equipados exclusivamente para funcionar no armazenamento e equilíbrio energético, sob o apertado controle hormonal. Porém, com a descoberta de que adipócitos segregam fatores conhecidos para desempenhar um papel nas respostas imunológicas, doenças vasculares e regulação do apetite, surgiu um papel muito mais complexo e dinâmico para o WAT. Além de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico e lipoprotéico, citosinas e fatores de crescimento, adipócitos também sintetizam fatores envolvidos na regulação da ingestão alimentar e homeostasis energéticas. Fatores derivados de adipócitos incluem leptina, adipsina, proteína estimulada por acilação, agouti, angiotensina II, prostaglandina, Acrp30, resistina, TNF- α , fatores inibitórios da migração de macrófago, proteína segregada a ácido e rico em cisteína (SPARC) e angiopoietina relacionada a PPAR γ (PGAR) / fatores adiposo induzido pelo jejum (FIAF) (Gregoire, 2001).

PGAR/FIAF é um peroxisoma proliferator-activated receptor do gene que foi descoberto independentemente por Kersten et al. (2000) e Yoon et al. (2000). Murine PGAR foi identificado pela estratégia da clonagem do substrato, designados para obter produtos genéticos expressos em células NIH 3T3 na forma de um PPAR- γ ligante-dependente (Yoon et al., 2000). Murine FIAF é idêntico ao PGAR em relação ao nível de aminoácido e foi identificado pela hibridação do substrato comparando-se o mRNA do fígado de um tipo de ratos silvestres normais com o PPAR- α . O mRNA do FIAF não é detectável em fígados com PPAR- α de ratos normais, indicando que se comporta como um gene alvo de PPAR- α em fígado de ratos (Kersten et al., 2000).

Observações feitas por Spiegelman (1998) e por Tontonoz et al. (1994), fizeram com que Duplus et al. (2000) sugerissem que PPAR γ 2 fosse o fator de transcrição mestre da linhagem de adipócitos.

O aumento exponencial no conhecimento relativo a processos envolvidos na formação de células adiposas modificou radicalmente os

conhecimentos relativos a função do WAT. A identificação do PPAR γ como um regulador transcricional fundamental da adipogênese tem levado a grandes avanços na pesquisa da obesidade e diabetes e tem promovido uma ligação molecular entre metabólitos lipídicos, lipídios e homeostase da glicose. O WAT tem um papel central na regulação do equilíbrio energético em situações fisiológicas e patológicas. Uma lista de fatores produzidos por adipócitos maduros está aumentando rapidamente, enfatizando adicionalmente sua função pleiotrópica. Os adipócitos modulam processos metabólicos, respostas imunes, a reprodução e hematopoiesis. O WAT é um tecido endócrino crítico na obesidade e nas suas desordens associadas, dando-se ênfase na necessidade pela identificação adicional de novos fatores produzidos através de adipócitos bem como para caracterização adicional dos fatores de transcrição que regulam a determinação, diferenciação e função de adipócitos (Gregoire, 2001).

2.2.4 . Conseqüências fisiológicas de ácidos graxos na ativação dos PPARS e conseqüente estimulação da oxidação dos lipídeos

Os PPARs parecem servir como sensores fisiológicos do nível de lipídios. Eles podem providenciar um mecanismo molecular por meio de que ácidos graxos (FA) dietéticos modulem a homeostasis de lipídios (Kliwer et al., 1997). Todos os PPARs (α , δ (ou β) e γ) são as diferentes extensões ativadas pelos ácidos graxos (FA) e seus derivados. A ativação de PPAR α em particular pelos FA, causa muitos efeitos pleiotrópicos resultando na estimulação da oxidação de lipídios e alteração no metabolismo lipoprotéico (Fruchart et al., 1999). Importaneamente, MUFA e PUFA parecem ser mais efetivos na estimulação de PPAR α que SFA (Kliwer et al., 1997).

Os ácidos graxos têm sido requeridos para regular a adaptação da massa gordurosa em mudanças nutricionais, controlando a expressão de genes implicada no metabolismo de lipídio, via ativação de receptores nucleares. A expressão ectópica dos receptores nucleares PPAR γ ou PPAR δ promovem adipogênese em células fibroblásticas expostas a tiazolidinedionas ou ácidos graxos de cadeia longas. Para a investigação do papel de ácidos graxos e PPAR δ na regulação da expressão de gene e adipogênese em um contexto

celular preadiposo, foi estudado os efeitos da overexpressão de receptores nativos ou o domínio-negativo mutante de PPAR δ em células Ob1771 e 3T3-F442A. A overexpressão de PPAR δ aumentou a indução de ácidos graxos relacionados aos genes de adiposo para o translocamento dos ácidos graxos, proteínas ligadas a lipídios de adipócitos e PPAR γ e os efeitos de ácidos graxos na diferenciação terminal (Bastie et al., 2000).

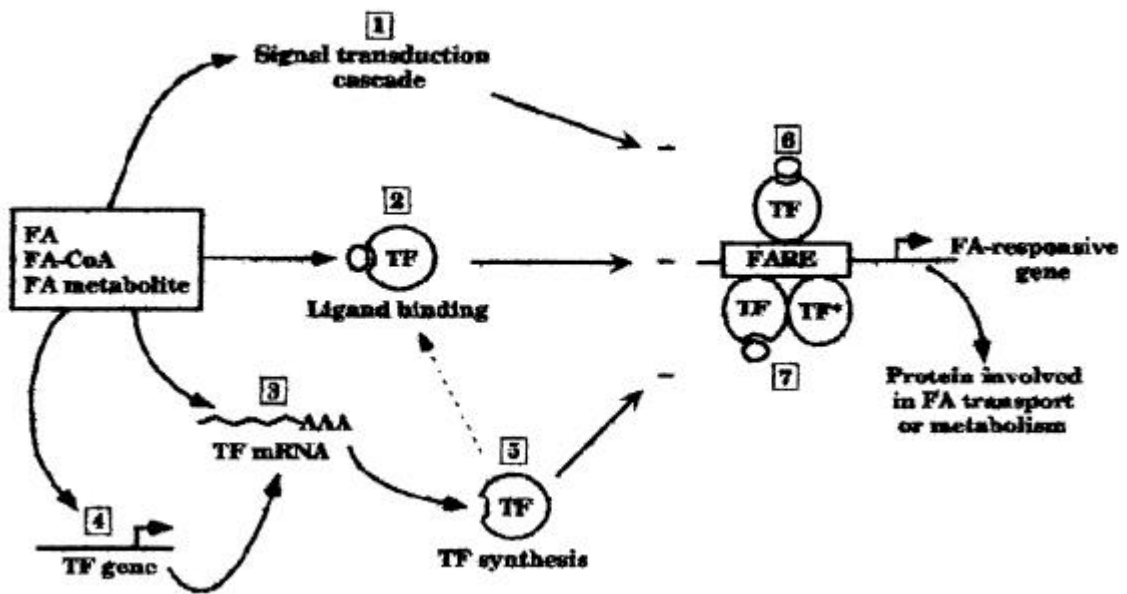
Durante os últimos 10 anos, ficou evidente que ácidos graxos (FAs) também pode agir como sinalizadores moleculares envolvidos na regulação da expressão de gene (Duplus et al., 2000). Embora interessantes progressos foram feitos recentemente, o mecanismo pelo qual FAs modulam a transcrição de gene, ainda permanece em grande parte sem solução.

Uma compreensiva descrição de FA na regulação da expressão gênica requer o entendimento de que: 1) moléculas de FA têm uma estrutura básica em comum com uma diversidade específica, determinada pelo tamanho da cadeia e o grau de insaturação e 2) os FAs são rapidamente metabolizados (Duplus et al., 2000).

Os efeitos celulares de ácidos graxos e alguns de seus metabólitos estão relacionados, pelo menos em parte, na ativação de receptores nucleares (PPARs), em células preadiposa e adiposa (Bastie et al., 2000).

Em mamíferos, a expressão de muitos genes tem sido mostrada por ser modulada pelos FAs de maneira positiva ou negativa. Porém, em só alguns casos a taxa de transcrição tem sido claramente demonstrada como o principal local de controle (Duplus et al., 2000).

Os principais mecanismos postulados da regulação da transcrição genética de FA estão resumidos na figura 8. FAs, FA-CoAs ou metabólitos de FA podem: 1) induzir uma cascata de eventos que conduzem a uma modificação covalente de fatores transcripcionais (TF), por exemplo, a fosforilação, alterando assim sua capacidade de transativação, 2) liga e ativa diretamente um TF, 3) modifica a estabilidade do mRNA ou 4) influencia a taxa de transcrição de um TF, conseqüentemente 5) modificando sua nova síntese. Os FA-responsive ligam aos TF para uma sucessão de reconhecimentos, estes elementos na região promotora-reguladora do gene são designados ou 6) como um monômero ou 7) como um homo ou um heterodimer (Duplus et al., 2000).



Fonte: Duplus et al., 2000.

Figura 8 – Mecanismos postulados para o controle de ácido graxos da transcrição de gene. O FA por se, FA-CoA ou seus metabólitos modulam (\pm) a transcrição de um gene responsivo, codificando uma proteína envolvida no transporte ou metabolismo de FA, por vários mecanismos potenciais seletivos não mutuamente. Passo 1, um sinalizador da cascata de transdução é iniciado para induzir uma modificação covalente no TF, modificando assim, sua potência transcricional. Passo 2, o próprio FA ou seus derivados agem como um ligante para o TF, que então pode ligar o DNA a um elemento resposta de FA (FARE), ativando ou reprimindo a transcrição. Passos 3, 4, e 5, o FA pode agir indiretamente por alteração na estabilidade do TF do mRNA (Passo 3) ou na transcrição de gene (Passo 4), resultando em variações de uma nova síntese do TF (Passo 5) com um impacto na taxa de transcrição de genes que codificam proteínas envolvida no transporte ou metabolismo de FA. Em se ligar ao elemento de resposta cognato, o TF age ou como um monômero (Passo 6), ou como um homodimer, ou como um heterodimer com TF, um TF diferente (Passo 7).

Foram observadas concentrações micromolares de ácidos graxos ligados a PPARs, sendo visualizadas na cavidade ligante-ligados a PPARs, por difração de raios-X nos cristais de ácidos graxos/PPAR (Nolte et al., 1998; Zhu et al., 1997). Estas estruturas cristalinas também demonstraram que os ácidos graxos têm um alto grau de liberdade na cavidade ligante-ligada, comparada com outros receptores nucleares observados. Isto explica o grande número de

diversas combinações aparentemente que podem fazer os PPARs, mas também sugerem a possibilidade de que as combinações da ativação endógenas podem ser uma molécula contendo ácidos graxos. Várias publicações exploraram esta possibilidade (Van Veldhoven et al., 2000; Xu et al., 1999).

Os papéis de risco de lipídios de PPAR α em roedores são prontamente compreendidos. O PPAR α é altamente expresso no fígado de roedor onde a ativação destes receptores com fibratos induz um aumento volumoso na oxidação de ácidos graxos peroxisoma nos hepatócitos. Isto prevê uma ação poderosa para a liberação de gorduras do soro. Ficou claro em recentes anos que fibratos também regulam o transporte de lipídios mediando a expressão de várias proteínas transportadoras de lipídeos intra e extracelulares. Os fibratos induzem a expressão de proteínas ligadas a ácidos graxos do fígado, uma proteína intracelular envolvida no uptake e transporte de ácidos graxos (Besnard et al., 1993; Brandes et al., 1990; Lawrence et al., 2000).

Alguns estudos informam claramente o papel dos PPAR δ como mediador nuclear da transcrição mediada pela LCFA e ações adipogênicas em um contexto celular preadiposo. Eles sugerem que uma mudança na quantidade ou atividade destes receptores nucleares em células preadiposas podem ter conseqüências funcionais importantes com respeito à resposta da massa adiposa em mudanças nutricionais. Possivelmente, a up-regulação do receptor resultaria na hipersensibilidade dos efeitos da LCFA, aumentando a massa do tecido adiposo, considerando que a down-regulação pode conferir resistência a LCFA. Os PPAR δ também é expresso em vários tecidos, inclusive no coração, músculo esquelético e intestino, e seria de interesse caracterizar seus efeitos em tecidos específicos na up ou down-regulação que este receptor nuclear teria em todo o animal. A produção de animais transgênicos que expressam o mutante PPAR δ E411P de uma maneira específica no tecido, proveria valiosa informação sobre o papel de PPAR δ em vários tecidos (Bastie et al., 2000).

2.2.5 . Papel dos PPARs na lipogênese e formação das lipoproteínas

A ativação da PPAR α estimula a expressão dos genes envolvidos no metabolismo dos ácidos graxos e lipoproteínas. Os ativadores da PPAR α , como

os ácidos fíbricos normolipidêmicos, diminuem as concentrações de triacilgliceróis, aumentando a expressão da lipoproteína lipase e diminuindo a concentração da apoC-III (Fruchart et al., 2001).

Adicionalmente, eles aumentam o colesterol HDL através do aumento da expressão da apo A-I e apoA-II. A ativação da PPAR α por ácidos fíbricos aumenta a sensibilidade à insulina e diminui a trombose e as inflamações vasculares. Os ativadores da PPAR α (gemfibrozil) diminuem o risco de doenças coronárias do coração em pacientes com colesterol LDL normal e com baixo colesterol HDL e ele diminui a progressão da arteriosclerose coronária prematura (benzafibrato), particularmente em pacientes com a diabetes tipo 2 (fenofibrato) (Fruchart et al., 2001).

Os ativadores PPAR α têm sido sintetizados. Eles incluem ácidos fíbricos e derivações (fibratos) e todos eles induzem a proliferação do peroxisoma no fígado, hepatomegalia e câncer de fígado em roedores (Issemann e Green, 1990).

Wy-14 643 e ácidos fíbricos (clofibrato, ciprofibrato, ezafibrato, feofibrato, gemfibrozil, ...) foram desenvolvido como agentes hipolipidêmicos em roedores. Os ácidos clofíbricos e feofíbrico ativam tanto a PPAR-alfa quanto a PPAR-gama, com uma seletividade de 10 vezes maior pela PPAR-alfa. Alguns ácidos fíbricos como o ezafibrato não tem nenhuma especificidade por nenhum dos três tipos de PPARs. Uma propriedade farmacológica comum aos ácidos fíbricos usados clinicamente é a sua baixa afinidade pela PPAR-alfa (EC 50 μ M) e um bom resultado requer doses orais altas (300-1200 mg/dia) para alcançar eficiência clínica. Os ativadores da PPAR-alfa sintetizados recentemente, com afinidade maior que 1000 vezes para a PPAR-alfa são drogas novas e promissoras para o tratamento da dislipoproteinemia (Willson et al., 2000).

Ácidos fíbricos são drogas de primeira linha no tratamento de hipertrigliceridemia primária e são muito úteis no tratamento combinado de hiperlipidemia e dislipoproteinemia tipo III e em anomalias lipídicas secundárias observadas em diabetes mellitus não insulina dependente (NIDDM) e indivíduos obesos. A ativação da PPAR-alfa pelos fibratos leva ao:

- decréscimo da hipertrigliceridemia pelo aumento na expressão da LPL (Heller e Harvengt, 1983) e no decréscimo na expressão da apoC-III (Staels et al., 1995);
- aumento nos níveis de colesterol HDL, apo A-I e apo A-II (Malmendier e Delcroix, 1985; Vu-Dac et al., 1994; Vu-Dac et al., 1995) no plasma humano, ao menos parcialmente, pelo aumento na expressão da apo A-I e apo A-II (Vu-Dac et al., 1994; Vu-Dac et al., 1995);
- redução do colesterol LDL em hiperlipidemia combinada (Cattin et al., 1990) através do decréscimo nos níveis do LDL denso aterogênico, o qual tem baixa afinidade aos receptores de LDL, enquanto aumentam o LDL flutuante, o qual demonstra alta afinidade a este receptor. Na hipocolesterolemia primária, os fibratos reduzem o LDL denso, mas não as frações de LDL light (Tilly-Kiesi e Tikkanen, 1991).

Em pacientes hipercolesterolêmicos, Caslake et al. (Caslake et al., 1993) observaram que fenofibratos diminuem significativamente o colesterol LDL (30%) sem o decréscimo da produção de LDL e apo B pela mudança do LDL de um pool catabolizado lentamente por um catabolizado rapidamente. Adicionalmente, a velocidade de degradação da LDL-apo B pelo receptor “route rose” e de 43% com a droga, enquanto que a quantidade pura independente da rota do receptor não muda.

É geralmente reconhecido que concentrações terapêuticas não inibem a atividade da HMG-CoA redutase (Stange, et al., 1991).

Recentes estudos têm mostrado que os efeitos dos fibratos no metabolismo das lipoproteínas são devido ao aumento no catabolismo celular de FFA e a inibição resultante da secreção do triacilglicerol do VLDL hepático, bem como às alterações nos genes que governam a hidrólise intravascular dos triacilgliceróis e aqueles que governam a produção de HDL (Fruchart, et al., 2001).

PPAR-alfa é altamente expresso em tecidos com taxas elevadas de catabolismo de FA, onde são regulados genes envolvidos no uptake de FA, ativação em ésteres de acil-CoA, degradação via peroxisomal e beta-oxidação mitocondrial e síntese de corpos cetônicos (Schoonjans et al., 1996).

O tratamento com fibratos é conhecido por ativar PPAR-alfa induzido pelo nível de mRNA de FATP no fígado e intestino de ratos e níveis de mRNA de ACS no fígado e rim (Fruchart, et al., 2001).

PPAR-alfa regula a ingestão de FAs na mitocôndria, que é o passo crucial no metabolismo deles, especialmente em tecidos como o coração, músculo esquelético e tecido adiposo marron, no qual FAs são as principais fontes de energia (Fruchart, et al., 2001).

Foram identificados três isoformas de proteínas desacopladas distintas, UCP-1, UCP-2 e UCP-3 e foram implicadas como mediadoras da termogênese. Kelly et al. (1998) informou que o tratamento de ratos normais ou ratos db/db com WY-14 643 (PPAR-alfa ligante) não afeta a expressão da UCP-1, 2 ou 3 no tecido adiposo marrom. Não obstante, mRNA de UCP-2 hepático foi aumentado (quatro vezes maior do nível de controle) em ratos db/db e magros, embora este efeito não foi observado em outros ratos. Estes dados mostram que ativadores de PPAR-alfa também podem regular proteínas UCP, que podem ser um passo final nas ações destas drogas em FA catabólico.

Estes dados como um todo mostra que ativadores de PPAR-alfa estimulam diferentes etapas no metabolismo oxidativo de FA em diferentes órgãos e particularmente no fígado onde eles reduzem a quantidade de FA disponível para síntese e secreção de VLDL (Fruchart, et al., 2001).

Um dos principais efeitos dos ativadores de PPAR-alfa no metabolismo lipídico plasmático é a redução dos níveis de triacilgliceróis. Kesaniemi e Grundy (1984) mostraram que o gemfibrozil diminuía a produção de triacilglicerol de VLDL em média de 28%.

Não obstante, como foi mostrado por Kesaniemi e Grundy (1984), a inibição da síntese de triacilglicerol de VLDL não é unicamente um efeito hipotrigliceridêmico dos fibratos. Neste estudo, gemfibrozil reduziram a síntese de triacilglicerol de VLDL em somente 28%, mas aumentaram a fração da taxa catabólica do triacilglicerol de VLDL em 92%. Isto sugere que ativadores de PPAR-alfa diminuem a concentrações de triacilglicerol plasmático pelo aumento da hidrólise de triacilgliceróis de VLDL e quilomícrons.

De fato, fibratos aumentam a atividade de LPL plasmática fixada em heparina (Fruchart, et al., 2001).

Schoonjans et al. (1996) demonstraram a indução do gene de LPL pelo PPAR-alfa, correlatado com a distribuição destes receptores nucleares nos tecido de ratos.

Um elemento seqüencial foi identificado como um PPRE no promotor de LPL humano, que medeia a responsabilidade funcional dos ativadores de PPAR-alfa. O efeito principal de fibratos é, então, a produção de LPL no fígado de rato (Fruchart, et al., 2001).

A apoC-III age retardando o catabolismo de partículas ricas em triacilgliceróis, inibindo a ligação delas a superfície endotelial e a sua lipólise pelas LPL, desta forma, interferindo com a liberação de partículas remanescentes nos receptores mediados pela apo E para o plasma (Quarfordt et al., 1982; Windler et al., 1980; Clavey et al., 1995; Aalto-Setala, et al., 1992; Aalto-Setala, et al., 1996; Ebara, et al., 1997).

Usando ratos deficientes de PPAR-alfa, Peters et al. (1997) demonstraram um papel obrigatório para PPAR-alfa na repressão da expressão do gene da apo C-III pelos fibratos. A regulação da transcrição do gene da apo C-III é complexa, sendo governada por um conjunto de fatores transcricionais ligados a sítios entre 1 Kb do local de iniciação da transcrição. Entre estes locais está o C3P (também chamado de CIIIB), local para qual estão ligados vários receptores nucleares como HNF-4, ARP-1, Ear/COUP-TF (Ldias et al., 1992), RXR e PPAR-alfa (Vu-Dac et al., 1998). Considerando que HNF-4, RXR e PPAR-alfa (Vu-Dac et al., 1998) podem ativar o gene de transcrição da apo C-III neste local, ARP-1 e Ear3/COUP-TF agem como repressores (Ldias et al., 1992). São exigidos estudos adicionais para determinar se a repressão transcricional da apo C-III através de ativadores de PPAR-alfa envolvem qualquer ou todos estes fatores nucleares.

Em hipercolesterolemia primária severa, a terapia com fenofibratos diminuiu a apo C-III e partículas de lipoproteínas que contêm tanto a apo C-III e a apo B (Bard et al., 1992). Staels et al. (1995) demonstraram que fibratos down-regulam a expressão da apo C-III independentemente de qualquer indução do peroxisomal acil CoA oxidase. Estes estudos mostraram que ativadores de PPAR-alfa diminuem a expressão da apo C-III em fígado de humanos e ratos, mas o mecanismo molecular desta down-regulação não foi, contudo elucidada completamente.

A terapia com ácido fíbrico aumenta o nível plasmático de colesterol-HDL (entre 10-15%) em hipertrigliceridemia (Kahri et al., 1995), hiperlipidemia combinado (Zambon et al., 1999; Steinmetz et al., 1996) e hipercolesterolemia (Steinmetz et al., 1996; Schaefer et al., 1996). Este aumento no nível de colesterol-HDL são associados com os aumentos significantes nos níveis de apo A-I e apo A-II. Malmendier e Delcroix (1985) mostraram que fenofibrato aumentaram apo A-I em pacientes hipercolesterolêmicos, aumentando sua taxa de síntese muito mais que sua taxa catabólica.

Recentes estudos demonstraram, em humanos, que ácidos fíbricos aumentam as concentrações plasmáticas de HDL, pelo menos em parte, pela indução da expressão dos genes humanos da apo A-I e apo A-II (Vu-Dac et al., 1994; Vu-Dac et al., 1995; Berthou et al., 1996).

Vu-Dac et al. (1994) mostraram que a taxa de transcrição do gene humano da apo A-I é induzido por PPAR-alfa que interage com um PPRE positivo localizado no sítio A do promotor do gene apo A-I do fígado de humanos melhorando sua especificidade.

Em 1995, Vu Dac et al. informou que ácidos fíbricos induziram o mRNA da apo A-II em culturas primárias de hepatócitos humano e em células de hepatoblastoma humanas, que resultam no aumento da secreção de apo A-II em ambos os sistemas de cultura celular. Estes autores identificaram um DR1 um tipo de PPRE no sítio J do promotor da apo A-II humana e demonstrou que ácidos fíbricos aumentam os níveis de apo A-II plasmático, estimulando a transcrição de seu gene pela interação de PPAR-alfa ativado com o apoAII-PPRE.

Recentemente, foi mostrado que fibratos aumentam atividade do receptor HDL em macrófagócito humanos estimulando a expressão de SR-BI/CLA-1 (Chinetti et al., 2000) e ABCA1 (Chinetti et al., 2001). Estes dois receptores foram mostrados por ser capaz de ligar HDL na membrana plasmática e de induzir influxo de colesterol livre de células espumosas derivadas de macrófagócitos humanos. Este influxo de colesterol celular corresponde ao primeiro passo dentro do denominado “transporte de colesterol reverso” que é responsável para devolver o excesso de colesterol periférico ao fígado para elimina-lo com a secreção biliar. Então, fibratos não só aumentariam o transporte de colesterol reverso por aumentar o número de portadores de

colesterol (HDL), mas eles também aumentariam a expressão celular dos receptores de HDL cuja tarefa é assegurar a ligação destes portadores à membrana celular e induzir o influxo do excesso do colesterol celular.

Ativadores de PPAR-alfa diminuem os níveis de triacilgliceróis do plasma diminuindo a síntese de triacilglicerol e aumentando a lipólise do triacilglicerol-VLDL pelo aumento da expressão do gene da lipoproteína lipase e sua correspondente síntese protéica e diminuindo a expressão do gene da apo C-III e sua síntese protéica relacionada; a apo C-III que é um inibidor natural da atividade da lipoproteína lipase. Diminuições na concentração plasmática de triacilglicerol-VLDL inibem a troca entre a proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) dependente de triacilglicerol do VLDL e o éster de colesterol da LDL. Nesta condição, a atividade da lipase hepática está reduzida, resultando na LDL pobre em triacilgliceróis, que em troca não reduz o tamanho nem aumenta a densidade. Então, ativadores de PPAR-alfa diminuem a concentração do plasma da LDL de baixa densidade que se mostram altamente aterogênico (Fruchart, et al., 2001).

Os ativadores de PPAR-alfa aumentam os níveis de colesterol-HDL do plasma aumentando a expressão do gene da apo A-I e apo A-II e aumentando a síntese das proteínas correspondentes. Ativadores de PPAR-alfa também aumentam o colesterol-HDL reduzindo a massa do triacilglicerol-VLDL e do éster de colesterol mediado pela CETP, resultando na transferência de HDL para VLDL. Além disso, ativadores de PPAR-alfa aumentam expressão celular vascular de receptores de HDL como ABC-1 e SRB-I e o influxo do colesterol celular. Então, aumentando a síntese de HDL e o influxo do colesterol celular, ativadores de PPAR-alfa provavelmente aumentam bastante o “transporte inverso de colesterol” e reduz a aterogênese, como foi demonstrado em tentativas clínicas que mostraram uma redução na progressão de ateroma em pacientes ateroscleróticos tratadas com bezafibrato (de Faire et al., 1995; de Faire et al., 1996; Ericsson et al., 1996; Ruotolo et al., 1998; Goldbourt et al., 1998; Ericsson et al., 1996; Kaplinsky e Brunner, 1998), gemfibrozil (Rubins et al., 1999; Frick et al., 1997; Syvanne et al., 1998) e fenofibrato (Steiner, 1996).

Estudos em LOCAT (Lipid coronary angiographic trial), VA-HIT (Veterans Affairs-High Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial), BECAIT (The bezafibrate coronary atherosclerosis intervention trial) e BIP

(Benzafibrate infarction prevention) mostraram que drogas pertencendo à família dos fibratos (gemfibrozil, benzafibrato), agem na excitação do Peroxisoma Proliferator Activated Receptores (PPARs) tendo efeitos comparáveis no perfil de lipídios plasmáticos e de lipoproteínas e na inibição da progressão de ateroscleroses coronárias (Fruchart, et al., 2001).

Estes dados sugerem que uma redução simultânea no triacilglicerol e no aumento de HDL-colesterol, sem qualquer redução na LDL-colesterol, em pacientes com baixo LDL-colesterol e baixo HDL-colesterol ou alto LDL-colesterol, baixo HDL-colesterol e alto triacilglicerol [$>200 \text{ mg dL}^{-1}$ ($2,30 \text{ mmol L}^{-1}$)] diminuem a mortalidade cardíaca. Estes estudos enfatizam: (1) a importância de reduzir o LDL-colesterol quando o LDL constitui o único fator de risco das lipoproteínas que possuem a apo B; (2) o adicional poder letal de triacilglicerol em pacientes hipercolesterolêmicos; (3) o poder letal dos triacilgliceróis em pacientes normocolesterolêmicos com baixo HDL-colesterol (Fruchart, et al., 2001).

Estudos futuros são necessários para confirmar os efeitos benéficos da redução de triacilgliceridemia e aumento do HDL-colesterol na prevenção secundária e é absolutamente necessária a confirmação deste efeito benéfico na prevenção primária (Fruchart, et al., 2001).

2.3 . ANTILIPÊMICOS

Também chamados agentes hipolipdêmicos, reguladores de lipídios, anti-hiperlipoproteinêmicos, são fármacos utilizados no tratamento de aterosclerose. Esta doença é causada pela deposição localizada de lipídeos plasmáticos, principalmente ésteres colesterílicos, na parede arterial interna formando a placa ateromatosa, ou ateroma, a lesão característica da aterosclerose.

A aterosclerose é causa da doença cardíaca coronariana, a forma mais freqüente de doença cardíaca.

Fatores diversos foram apontados como causadores de aterosclerose. Os principais são hipertensão, hábito de fumar, ocupação sedentária, diabetes melito, obesidade, álcool, hereditariedade e hiperlipidemia.

O diagnóstico da hiperlipidemia baseia-se na comprovação de anormalidades lipoprotéicas específicas. As lipoproteínas podem ser separadas em cinco grupos: (a) quilomícrons – são as lipoproteínas maiores e contém cerca de 90% de triglicerídios dietéticos ou exógenos e menos de 5% de colesterol; (b) lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL, *very low density lipoproteins*), também chamadas pré-beta lipoproteínas – contém cerca de 60% de triglicerídios endógenos e 10 a 15% de colesterol; (c) lipoproteínas de densidade intermediária (IDL, *intermediate density lipoproteins*) – contém menos triglicerídios e mais colesterol que o grupo anterior; (d) lipoproteínas de densidade baixa (LDL, *low density lipoproteins*), também chamadas beta lipoproteínas – contém cerca de 50% de colesterol e menos de 10% de triglicerídios; (e) lipoproteínas de densidade alta (HDL, *high density lipoproteins*), também chamadas alfa lipoproteínas – contém cerca de 20% a 30% de colesterol e menos de 5% de triglicerídios.

Além das lipoproteínas, há que se levar em consideração também as apoproteínas, que são os grupamentos protéicos daquelas. Frequentemente, estes grupos heterogêneos de proteínas se combinam com fosfolipídios para formar um complexo estável para solubilizar e transportar os lipídios plasmáticos.

As apoproteínas desempenham, pelo menos, três funções essenciais: (a) manter a estrutura das lipoproteínas; por exemplo, apo A-I e A-II em HDL; apo B-48 em quilomícrons e resíduos de quilomícrons; e apo B-100 em VLDL, IDL e LDL; (b) servir de ligantes de união ou locais de reconhecimento para os receptores situados na superfície das células para facilitar a retirada das lipoproteínas da circulação para o catabolismo; por exemplo, os receptores no fígado reconhecem a apo E e possivelmente B-48 nos resíduos de quilomícrons; (c) atuar como co-fatores para enzimas compreendidas no metabolismo dos lipídios lipoprotéicos na circulação; por exemplo, a apo C-II é o co-fator específico para ativação da lipoproteína lipase (LPL), a enzima responsável pela hidrólise de triglicerídios.

As hiperlipoproteinemias podem ser primárias ou secundárias. As primárias são esporádicas e determinadas geneticamente. As secundárias resultam de hábitos dietéticos ou são seqüelas de outras doenças ou de tratamento medicamentoso.

Para as hiperlipoproteinemias a Organização Mundial de Saúde propôs a seguinte classificação internacional:

Tipo I: Hiperquilomicronemia. Caracterizada pela presença de quilomícrons e por concentrações normais ou apenas ligeiramente aumentadas de VLDL.

Tipo IIa: Hiper- β -lipoproteinemia. Caracterizada por elevação na concentração de LDL.

Tipo IIb: Caracterizada também por elevação na concentração de LDL.

Tipo III: Padrão " β flutuante" ou " β amplo". Caracterizada pela presença de VLDL com concentração elevada anormal de " β flutuante" ou " β -VLDL" do colesterol.

Tipo IV: Hiper- β -lipoproteinemia. Caracterizada por elevação na concentração de VLDL e pela ausência de quilomícrons.

Tipo V: "Hiperpré- β -lipoproteinemia e quilomicronemia". Caracterizada por elevação na concentração de VLDL e presença de quilomícrons.

Estudos recentes indicaram que o controle de colesterol e triglicerídios elevados pode não diminuir o perigo de doença cardiovascular e a mortalidade, embora possa reduzir a incidência de infartos miocárdios não-fatais.

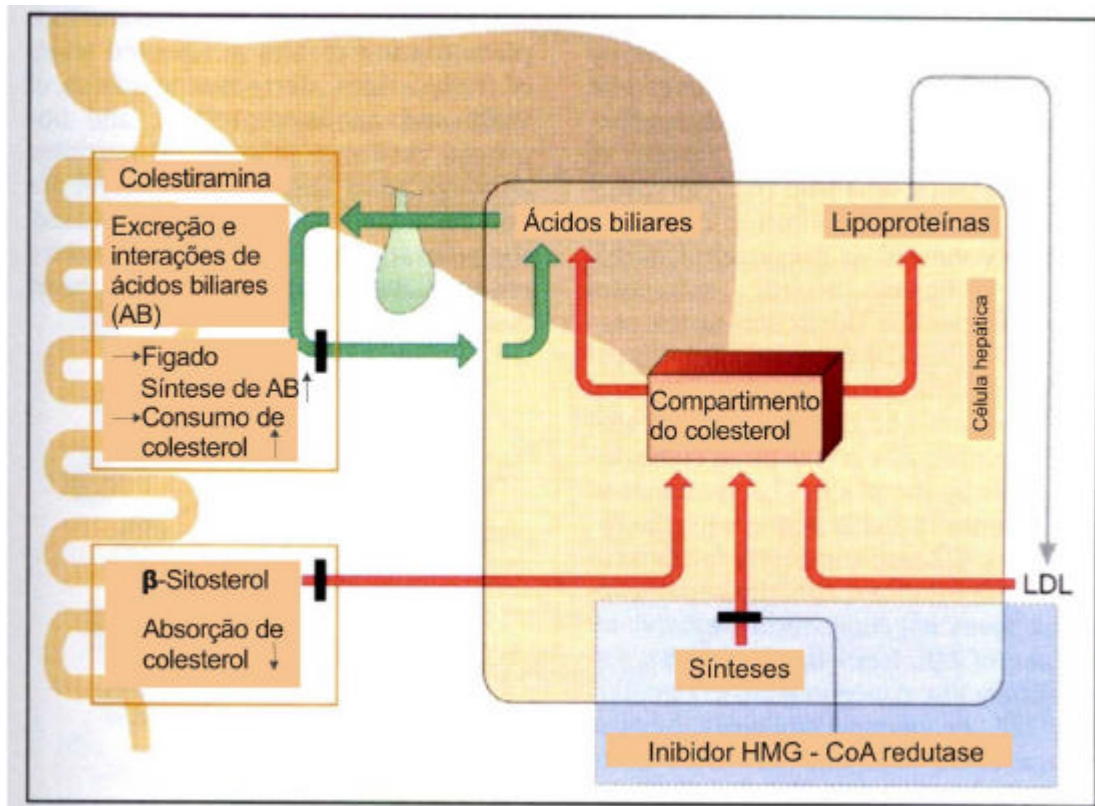
Para o tratamento de altas taxas de colesterol no sangue adotam-se as medidas a seguir, conforme recomendou, em 1994, o 2º *Relatório do Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II)*.

Tratamento não-farmacológico (especialmente redução na ingestão dietética de ácidos graxos insaturados e colesterol, redução de peso, exercício físico e suspensão do hábito de fumar) como primeira medida a todos os pacientes e como coadjuvante a toda a terapia específica.

Se, depois de seis meses de terapia mediante dieta, não se conseguir redução adequada das LDL do colesterol, então se recomenda adicionar o tratamento medicamentoso à terapia dietética.

O primeiro fármaco consiste geralmente em um seqüestrante de ácidos biliares (como colestiramina, colestipol) ou ácido nicotínico. Os seqüestrantes de ácidos biliares são úteis especialmente para o tratamento de elevações isoladas da LDL-colesterol, ao passo que o ácido nicotínico o é em pacientes em quem

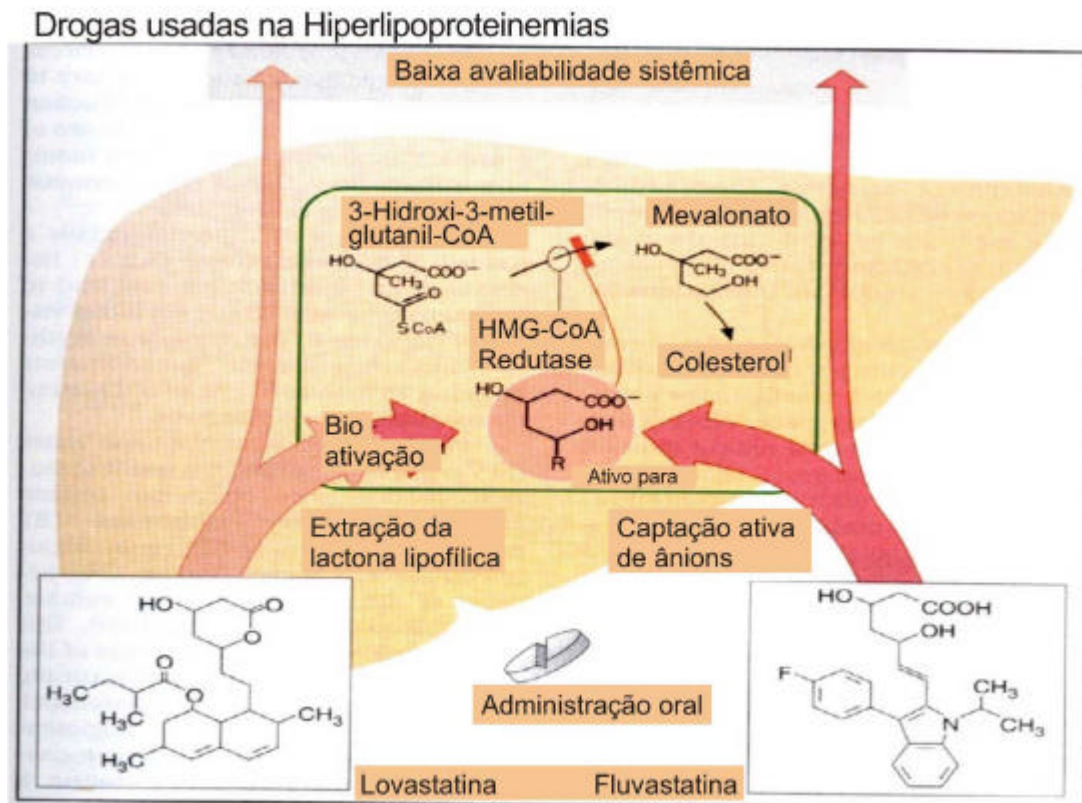
as concentrações das LDL-colesterol são moderadamente elevadas e que apresentam aumento em triglicerídios e nas concentrações das HDL-colesterol.



Fonte: Lüllmann et al., 2000.

Figura 9: Esquema geral da atuação de antilipêmicos.

Em seguida, deve-se considerar o uso de inibidor da HMG-CoA redutase (como fluvastatina, lovastatina, pravastatina, sinvastatina). Estes fármacos são particularmente úteis em reduzir substancialmente as LDL-colesterol em pacientes com formas graves de hipercolesterolemia ou em pacientes que apresentam doença coronariana confirmada e graus menores de elevação das LDL-colesterol.



Fonte: Lüllmann et al., 2000.

Figura 10 – Acumulação e efeito do inibidor HMG-CoA redutase no fígado.

Outros antilipêmicos, como derivados do ácido fibríco (bezafibrato, clofibrato, genfibrozila) e probucol, são tão eficazes quanto os já citados. Os derivados do ácido fibríco são eficazes especialmente em baixar as concentrações de triglicéridios e, em grau menor, aumentar as concentrações das HDL-colesterol. Reserva-se geralmente o tratamento com probucol a pacientes que não toleram outros fármacos que baixam o colesterol ou não respondem a eles.

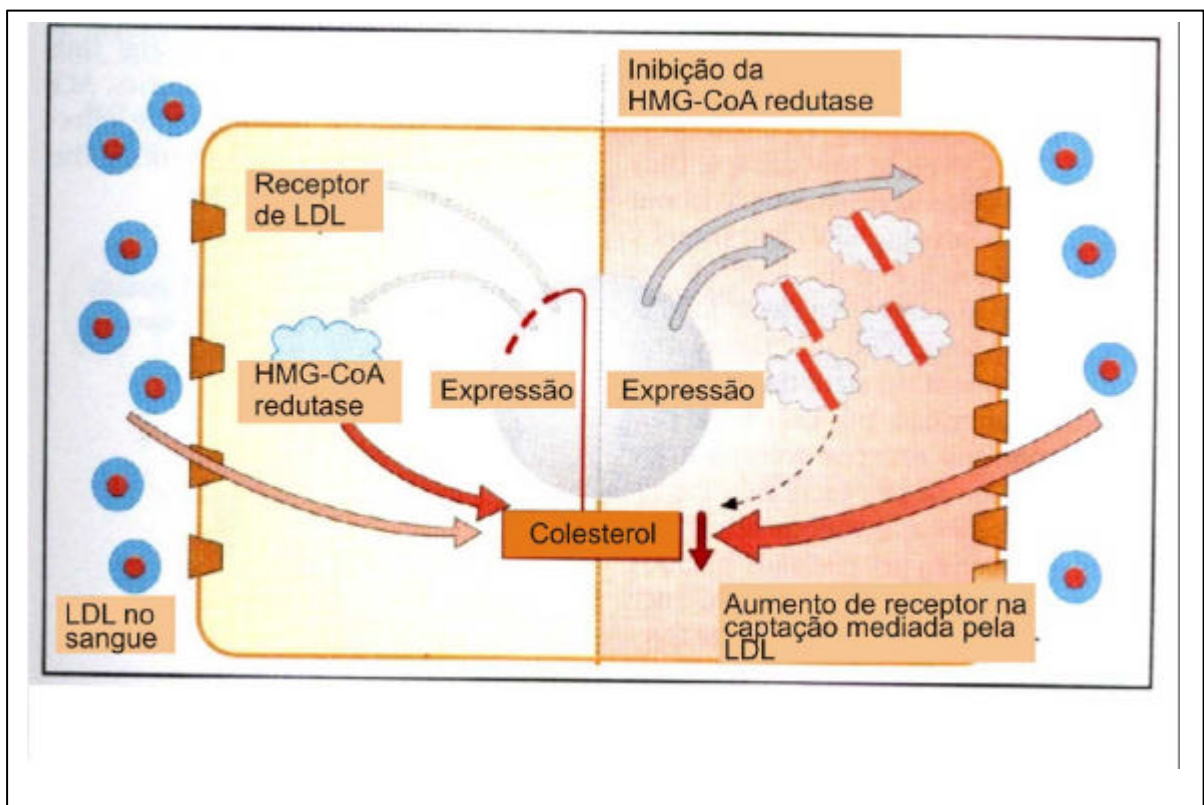
Caso não se obtenha resultado adequado, o paciente deverá ser submetido à outra medicação ou associação de dois fármacos que tenham mecanismo de ação sinérgico. Apesar de a experiência com essas associações ser limitada, verificou-se que os seqüestrantes de ácidos biliares junto com ácido nicotínico ou inibidor da HGM-CoA são úteis em controlar as LDL-colesterol.

Entretanto, o uso de associação de inibidor da HMG-CoA com ácido nicotínico ou derivado de ácido fíbrico poderá aumentar o risco de miopatia.

Na hipótese de não se lograr o resultado desejado com os fármacos primários e as associações de fármacos, deve-se recorrer a um especialista em lipídios.

Para as mulheres pós-menopausa, outra opção para baixar as LDL-colesterol é o tratamento por estrogênios. Estes podem diminuir as LDL-colesterol e aumentar as HDL-colesterol. Recomenda-se, porém, selecionar as pacientes, levando em consideração o risco de doença coronariana e riscos potenciais de tratamento estrogênico prolongado.

Os fármacos antilipêmicos disponíveis em nosso meio podem ser agrupados nas seguintes classes: inibidores da HGM-CoA redutase, derivados do ácido fíbrico e fármacos diversos.



Fonte: Lüllmann et al., 2000.

Figura 11 – Regulação da concentração do colesterol celular pela HMG-CoA redutase e receptores de LDL.

2.3.1 . Inibidores da HMG-CoA Redutase

A 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase é enzima que cataliza a etapa inicial limitante da velocidade da biosíntese de colesterol, a saber, a formação de mevalonato a partir de HGM-CoA. Os inibidores da HMG-CoA redutase são fármacos extremamente eficazes em baixar as concentrações plasmáticas da LDL-colesterol. Atuam como inibidores competitivos da referida enzima. Bloqueiam a síntese do colesterol no fígado, desencadeiam assim as reações compensatórias que resultam na redução das LDL plasmáticas.

Quimicamente, consistem em sistema anelar hexadronalftalênico ligado a dois grupamentos: um éster metilbutirato e um hidroxiácido que pode formar uma lactona de seis membros. Quanto à origem, podem ser divididos em três grupos: metabólicos fúngicos (lovastatina e pravastatina), compostos sintéticos (fluvastatina) e compostos semi-sintéticos (sinvastatina). Atorvastatina, fluvastatina e pravastatina são ativas *per se*. Lovastatina e sinvastatina são, na verdade, bioprecusores; no fígado, seu anel lactônico se abre por hidrólise química ou enzimática (ou ambos), gerando o inibidor ativo.

São antilipêmicos e inibidores da HMG-CoA redutase. São indicados como adjuvantes no tratamento de hipercolesterolemia primária (hiperlipoproteinemia tipos IIa e IIb) causada por concentrações elevadas de LDL-colesterol em pacientes com risco significativo de doença arterial coronariana que não responderam à dieta ou a outras medidas.

2.3.2 . Derivados do Ácido Fíbrico

São derivados do ácido fenoxiisobutírico. Seu efeito primário é aumentar a atividade da lipoproteína lipase que, por sua vez, promove o catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídios, VLDL e IDL. Eles também podem diminuir a síntese hepática e a secreção de VLDL.

Não se conhece bem o seu mecanismo de ação, mas pode consistir na depuração hepática intensificada das VLDL e IDL, que reduziria a produção de LDL.

Os fármacos deste grupo disponíveis no Brasil são bezafibrato, ciprofibrato, clofibrato, etofibrato, fenofibrato e genfibrozila.

2.4 . FLAVONÓIDES

São classes de compostos fenólicos que possuem em sua estrutura três anéis aromáticos (A,B e C) constituindo unidades de um esqueleto de carbono $C_6-C_3-C_6$, como mostrado na figura 12.

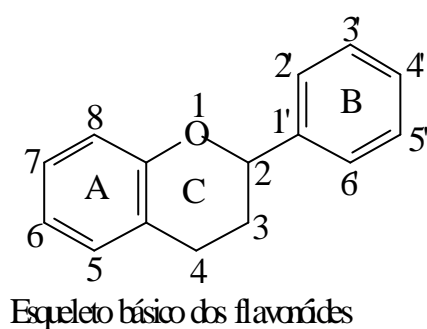


Figura 12 – Estrutura de flavonóides.

Do ponto de vista químico eles podem ser considerados como derivados de 2-benzopirano.

O esqueleto C_{15} dos flavonóides é biogeneticamente derivado de fenilpropanóide (C_6-C_3) e três unidades de acetato (C_6).

Podem sofrer hidrogenação, hidroxilação, metilação, acilação, sulfatação, glicosilação ou ramnosilação.

Existem uma grande diversidade de flavonóides na natureza (>4000 tipos). Eles podem ainda sofrer polimerização, formando taninos condensados ou hidrolisáveis (PM 500 - 3000).

O termo “flavonóide” deriva do latim *flavus*, que significa amarelo, em virtude da cor que confere às flores, entretanto existe um outro grupo de flavonóides incolores, os flavonóis e o grupo das antocianinas, que possuem cores que vão do vermelho ao azul.

Estes compostos são responsáveis pelas cores das plantas e, por muitos odores e sabores de comidas e bebidas de origem vegetal.

Os flavonóides “coloridos”, principalmente as antocianinas, presente nas pétalas das flores, atuam como um estímulo atrativo para insetos polinizadores. Os flavonóides aparentemente sem cor para o homem, como os flavonóis e flavonas, absorvem fortemente no UV, e freqüentemente se encontram no centro das flores, agindo provavelmente como “guia do mel”, aos olhos atentos dos insetos. Eram usados em tempos remotos como tintas naturais, hoje são pesquisados principalmente pelas suas propriedades farmacológicas.

Alguns alimentos são ricos em flavonóides, como soja, maçã, uva, cebola, repolho, brócolis, chicória, aipo, chá e vinho tinto.

2.4.1 . Classificação e estruturas de alguns dos Flavonóides

São classificados em: chalconas, flavanonas, flavonas, dihidroflavonóis, flavonóis, flavan – 3,4 – diol, antocianinas, e diidrochalconas.

Cook e Samman (1996), mostraram alguns flavonóides e suas classificações:

Flavanonas: naringerina, naringina (frutas cítricas).

Flavonas: luteolina, baicaleína, apigenina.

Flavonóis: kaempferol, miricetina, quercetina, rutina, morina.

Uma representação esquemática da derivação dos flavonóides está mostrada na figura 13.

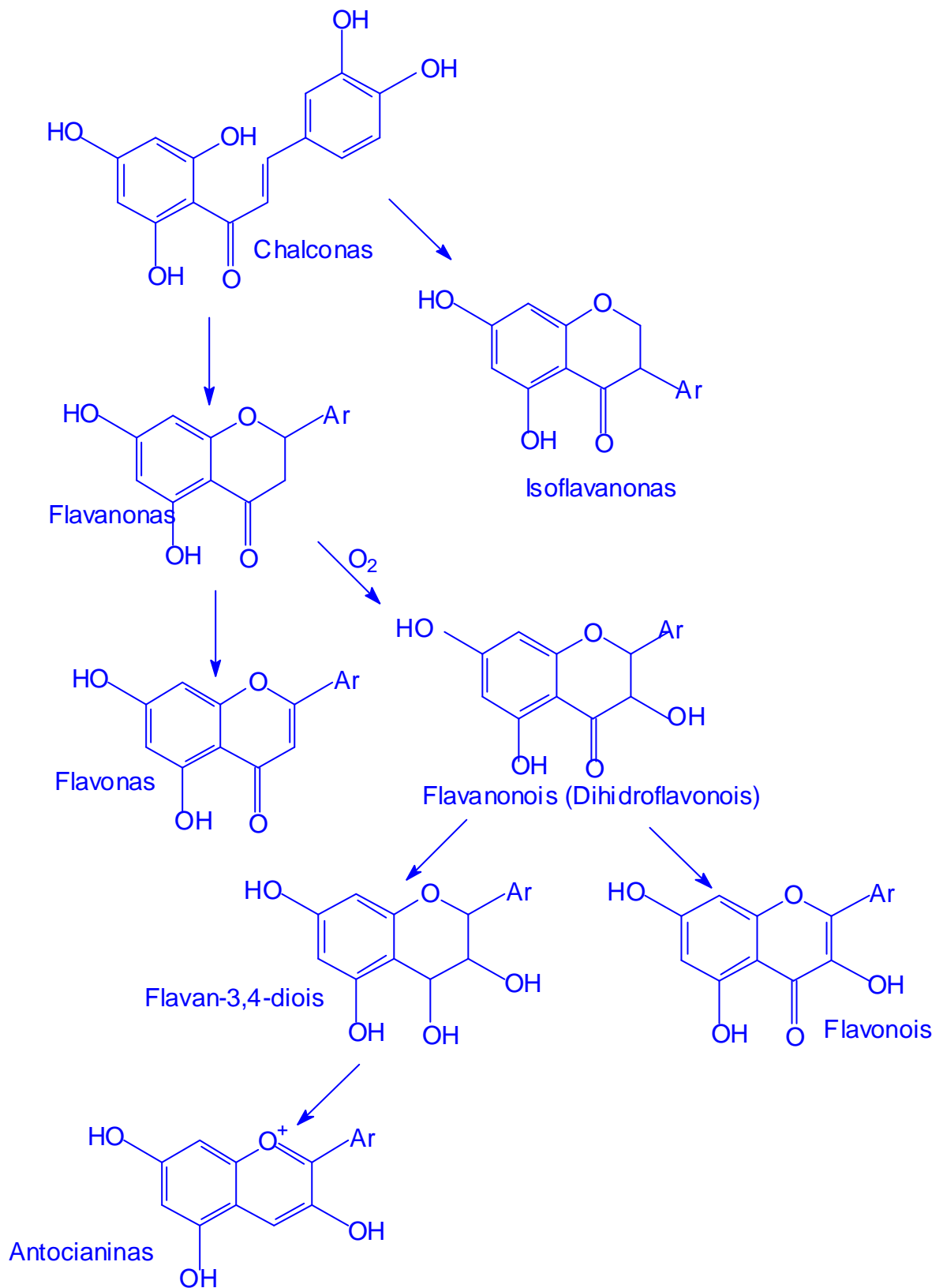


Figura 13 – Representação esquemática da derivação dos flavonóides.

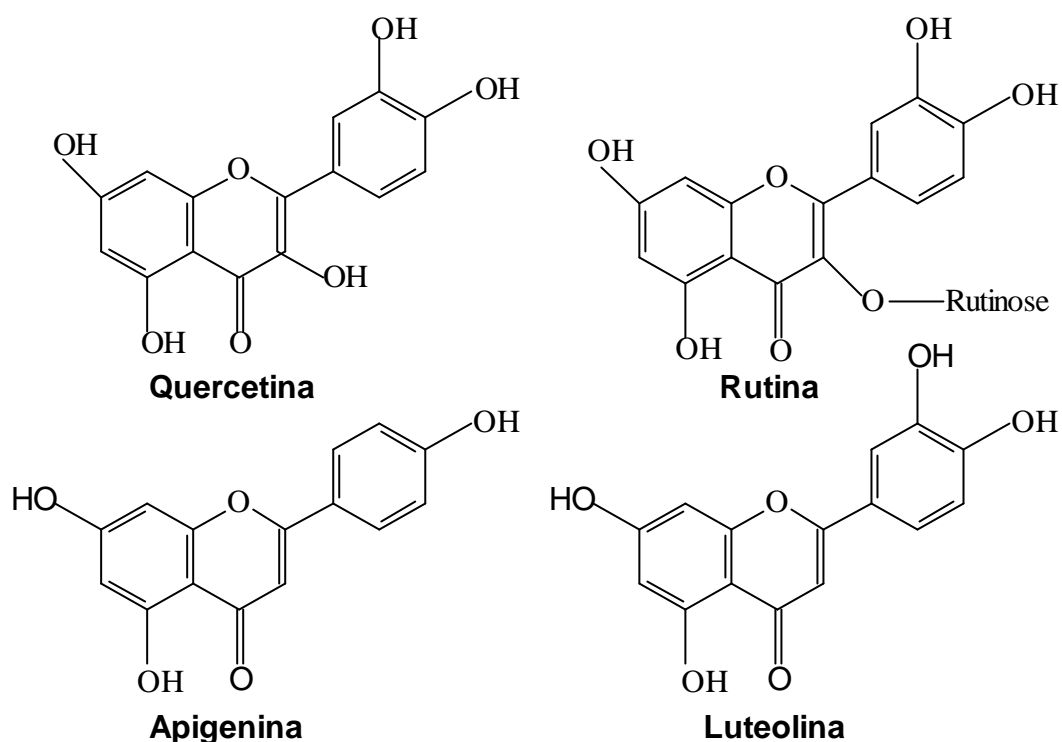


Figura 14 - Estrutura da quercetina, rutina, apigenina e luteolina.

2.4.2 . Efeitos Biológicos e Propriedades Farmacológicas

Vários pesquisadores em todo o mundo têm estudado seus efeitos farmacológicos, toxicológicos e suas atividades biológicas.

Ensaio biológicos utilizando compostos isolados demonstram que flavonóides exercem atividades antioxidantes e ainda, atividades antimicrobianas, antiulcerogênica, antihepatotóxica, antihipertensiva, hipolipidêmica, antimutagênica e antiplaquetária.

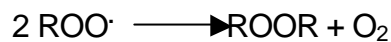
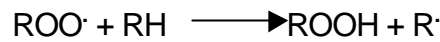
Cook e Samman (1996), descreveram atividades bactericidas, antiviral, antiinflamatórias, antialérgicas e vasodilatadoras.

2.4.2.1 . Efeitos antioxidantes

A auto-oxidação dos compostos, principalmente dos lipídeos, procede por reações em cadeias.

O principal oxidante em alimentos é o oxigênio do ar e estas reações são catalizadas pela luz ou certos cátions.

De uma forma esquemática, a formação dos radicais livres está representada a seguir:



Sabe-se hoje que a produção de radicais livres e a peroxidação dos lipídeos estão diretamente relacionadas com enfermidades crônicas, como a aterosclerose, câncer etc.

Os processos de oxidação produzem danos às paredes vasculares dos vasos sanguíneos, conduzem a aterosclerose e podem acelerar uma série de eventos que desembocam na trombose.

Os radicais livres oxidam as α -tocoferol das LDL, levando a um acúmulo de colesterol nos macrófagos, formando as células espumosas causando assim a aterosclerose (Cook e Samman, 1996).

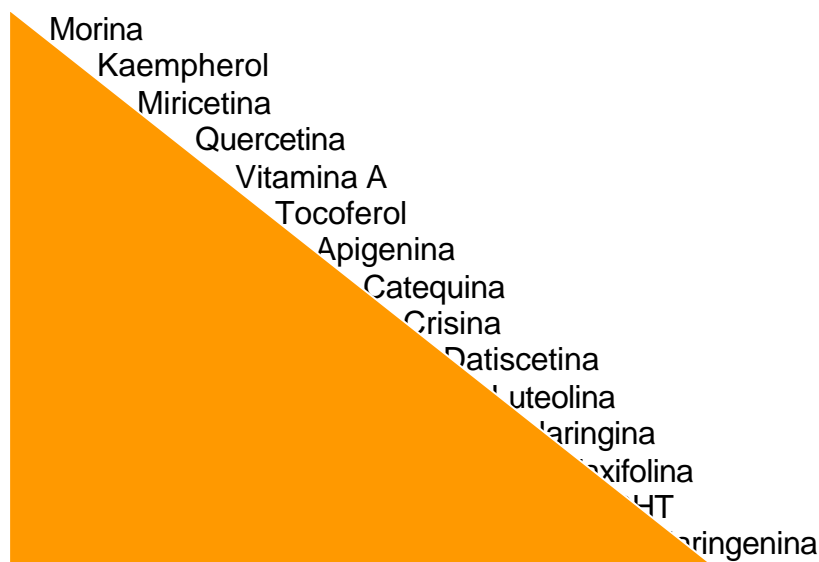
Cook e Samman (1996) descreveram que os flavonóides agem como seqüestradores de radicais livres e reduzem sua formação, quelando os cátions divalentes (Fe, Cu) e reduzindo suas biodisponibilidades (principalmente do Fe), prevenindo assim a oxidação de α -tocoferol das LDL, agindo como doadores de H para os radicais destas α -tocoferóis, conseqüentemente inibem a peroxidação de lipídeos e a agregação de plaquetas, com a inibição da atividade das enzimas ciclooxygenases e lipoxigenases, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares.

Um maior efeito antioxidante foi observado para catequina, rutina, quercetina, morina, hipolentina, gossipetina e galangina (Cook e Samman, 1996).

Entre as substâncias tocoferol, retinol e ácido ascórbico, os flavonóides são provavelmente o grupo de antioxidantes de nossa alimentação mais comuns e ativos, sendo ativos tanto em sistemas hidrofílicos como lipofílicos.

A capacidade antioxidante dos flavonóides é resultado dos seus radicais fenólicos. Em geral, os flavonóides com esta capacidade, removem os radicais superóxido, oxigênio *simpleto* e os peróxidos lipídicos, inibindo a oxidação das LDLs e seus efeitos citotóxicos (Batlouni, 1997).

Um estudo comparativo das atividades antioxidantes de alguns flavonóides sobre azeite de palma refinado está sendo mostrado no quadro qualitativo abaixo:



Uma curiosidade é que o renovado interesse em flavonóides entre as comunidades científicas foi “explorado” pela anomalia dietética conhecida como “Paradoxo Francês”. Esse paradoxo se refere à correlação entre a dieta gordurosa com as baixas incidências de doenças coronárias, encontradas nas culturas mediterrâneas.

2.4.2.2 . Atividades antiinflamatória e antialérgica dos flavonóides

Alguns flavonóides como a quercetina, inibem a descarga de histamina induzida por antígeno.

Mascolo et al. (1998) relataram testes com os flavonóides quercetina, kaempferol e taninos com atividade antiinflamatória, inibidores de enzimas

lisossômicas, responsáveis por aumentar a filtração transciliar de água e proteínas, reduzindo o número e o diâmetro de poros capilares promovendo o retorno do fluxo sanguíneo para o coração.

Um efeito interessante dos flavonóides sobre a inibição das enzimas da rota do ácido araquidônico também têm sido observado. Esta característica lhes confere propriedades antiinflamatórias e anti-aterogênicas (Ferrandiz, 1991).

A conversão do ácido araquidônico a prostaglandinas e tromboxanos ocorre via ciclooxigenase, e a leucotrienos e lipoxinas, via lipoxigenase. Portanto, essas enzimas desempenham um importante papel como mediadores às respostas inflamatórias (Nijveldt et al., 2001).

Segundo Williams, et al. (1995), os flavonóides atuam principalmente como protetores da radiação solar, captadores de radicais livres, protetores das membranas celulares, reguladores da permeabilidade e fragilidade capilar e antiinflamatórios.

O efeito inibitório não depende só da estrutura química, mas também da natureza do estímulo.

2.4.2.3 . Efeito vasodilatador

Duarte et al. (1993), demonstrou este efeito em músculos da artéria de ratos, empregando as substâncias quercetina e kaempferol.

Uma provável explicação é a inibição da proteína quinase C, que tem como papel chave à manutenção das contrações do músculo vascular liso.

Ferriola et al. (1989) correlacionaram a inibição da proteína quinase C do cérebro de ratos à estrutura química dos flavonóides. Estudaram os compostos fisina, luteolina, quercetina, hesperetina e taxifolina e verificaram que os três primeiros foram mais potentes no desempenho desta função biológica. Em relação às estruturas, observaram ainda, que é necessária a presença de uma hidroxila livre do anel posições 3', 4' e 7' para inibir a proteína quinase C.

Um efeito vasodilatador do endotélio foi descrito para alguns tipos de flavonóides. A diocleína, um flavonóide isolado da leguminosa "*Dioclea grandiflora*" teve sua ação investigada em aorta de ratos, apresentando um efeito vasorrelaxante do endotélio, indução de formação de óxido nítrico com

elevação de GMP cíclico. Tais efeitos conjuntos podem resultar na inibição do processo de trombose (Lemos, 1999).

2.4.2.4 . Atividade anticancerígena

Wattenberg (1968), fez a primeira observação que alguns flavonóides de frutas cítricas teriam certa atividade anticarcinogênica.

A integridade celular e sua defesa contra a degeneração celular são mantidas por duas contribuições dos flavonóides: - por um lado protege a célula de algumas substâncias carcinogênicas; - por outro, apresentam efeitos antiinvasivos e antiproliferativos.

O efeito anticarcinogênico é operado por um mecanismo de destruição oxidativa de substâncias carcinogênicas, oxidando os hidrocarbonetos policíclicos, como o benzopirano, a produtos não carcinogênicos.

Os flavonóides podem inibir a ação da proteína quinase C que atua como receptor celular na promoção de tumores. Estudos de relação estrutura – atividade, demonstraram que os flavonóides com hidroxilas nas posições 3', 4'e 7'são os melhores inibidores da proteína quinase C (Ferriola et al., 1989).

Ko et al. (2000), demonstraram o efeito anticancerígeno de três polimetoxiflavonóides: vitecarpina, artemetina e trimetoxiflavona, isolados da *V. rotundifolia*. Observaram que o grupo metoxila no lugar da hidroxila no carbono 3' é essencial para esta atividade antiproliferativa e de indução a apoptose. Segundo Hakim et al. (2000), os flavonóides constituintes do chá verde estão também implicados na prevenção primária do câncer.

2.4.2.5 . Efeitos anti-invasivos e antiproliferativos

Não se sabe ainda o mecanismo de ação dos flavonóides sobre os vasos celulares, mas a literatura relata que a tangerentina (flavonóide encontrado em frutas cítricas), apresenta um grande potencial na inibição de invasão de células tumorais em ratos sobre tecidos saudáveis.

2.4.3 . *Estudos de Ações e Efeitos de Flavonóides*

2.4.3.1 . Absorção e metabolismo

Bravo et al. (1994) trabalhando com a catequina e ácido tânico em ratos, mostrou que estes apresentam uma alta absorção no trato gastrointestinal. Eles reduziram a absorção de lipídeos e tiveram pouco efeito na digestibilidade de proteínas.

Das (1971), já havia mostrado que em um trabalho feito com seis homens saudáveis, consumindo uma dose única de 4,2 g de catequina, esta foi detectada no plasma após 6 horas de ingestão e desapareceu após 96 horas, sendo excretado na urina 19% do ingerido e não apresentou efeitos colaterais.

Um outro trabalho feito por Gugler et al. (1975), mostrou que a quercetina não foi detectada no plasma e nem na urina, após administrar uma dose única de 4 g deste flavonóide em 4 homens e 2 mulheres, sendo que 53 % da dose foi recuperada nas fezes.

2.4.3.2 . Flavonóides e Doenças Cardiovasculares

Em um estudo epidemiológico e longitudinal, feito por Hertog et al. (1993), com 805 homens, com idade variando entre 65 a 84 anos, foram testadas as ações de flavonóides presentes em alguns alimentos como chá, cebola e maçã. Após a realização do inquérito dietético, os indivíduos foram orientados para que ingerissem cerca de 26 mg de flavonóides contidos nestes alimentos. Após cinco anos de estudo, pode-se verificar que os flavonóides apresentaram uma relação inversa com mortes por doenças cardiovasculares.

A revista Nutr. Rev. 51, 185-7,1993 publicou um trabalho mostrando que os consumos de lipídeos saturados ingeridos pelos povos do mediterrâneo, europeu e ocidental são altos, mas existe uma prevalência maior na incidência de problemas coronários a cultura ocidental. Esta diferença foi relacionada, principalmente, ao alto consumo pelos povos orientais de vinho tinto, que contém grandes quantidades de flavonóides. Este trabalho ainda mostrou que a relação do vinho com problemas cardíacos está ligado ao fato deste reduzir a

oxidação das LDL e conseqüentemente à redução da formação de trombos (Paradoxo Francês).

Um estudo com ratos, utilizando os flavonóides baicaleína, morina, naringenina, naringina, quercetina e rutina, utilizando o triton como indutor da hiperlipidemia, mostrou que estes flavonóides reduzem consideravelmente a quantidade de colesterol sanguíneo. (Gomes, 1998).

Gramacho (1998), demonstrou que um estudo utilizando os flavonóides naringenina, naringina, morina, rutina e quercetina em ratos, em presença da proteína "poteimux" em ratos, reduziram o teor de colesterol sanguíneo, após a indução da hiperlipidemia com triton.

2.5 . Corantes naturais

Para os corantes naturais, as informações e divulgações para a atividade biológica são ainda limitadas, porém a literatura já registra o uso de alguns corantes no controle do colesterol.

Os corantes naturais fenólicos, como as antocianinas (que são também uma classe de flavonóides), têm a propriedade de complexar com íons metálicos, tendo propriedades antioxidantes e habilidades para ligar com outras moléculas, incluindo as macromoléculas, tais como proteínas e polissacarídeos.

Os corantes naturais carotenóides são precursores da vitamina A, que exercem numerosas funções no organismo, como ação protetora na pele e mucosas e papel essencial na função da retina e da capacidade funcional dos órgãos de reprodução.

O principal uso dos corantes naturais é hoje voltado para as indústrias alimentícias e de cosméticos, e o corante mais utilizado em todo o mundo é o urucum.

2.5.1 . Propriedades biológicas de carotenóides

Os carotenóides mais importantes identificados em plasma ou soro incluem beta caroteno, alfa caroteno, licopeno, criptoxantina e luteína e também

zeaxantina. As concentrações no soro não só dependem da dieta, mas também de fatores como destruição pelo trato gastrointestinal, eficiência de absorção e metabolismo e taxa de captação do tecido. Em pessoas bem nutridas, aproximadamente 1% do total de carotenóides do corpo (100-150 mg) é encontrado no soro (Gerster, 1993).

Carotenóides que são transportados no sangue através de lipoproteínas (LDL, VLDL e HDL), parecem se concentrar particularmente nos tecidos, com um grande número de receptores LDL e uma alta taxa de captação de lipoproteínas, como no fígado, adrenais e testículos (Gerster, 1993).

Além de sua função como precursores da vitamina A, têm-se atribuído aos carotenóides outras atividades biológicas, tais como o aumento da comunicação entre as uniões "gap", estimulação do sistema imunológico e atividade antioxidante (Hossain et al., 1993). Estas propriedades específicas dos carotenóides têm sido discutidas no contexto de sua atividade preventiva contra o câncer.

A vida aeróbica está associada à formação de espécies reativas do oxigênio e a vários sistemas de defesa, entre os quais se incluem os antioxidantes implicados na detoxificação destes intermediários reativos (Sies, 1993). Os carotenóides são parte da linha de defesa antioxidante e estão implicados principalmente na desativação do oxigênio singlete molecular e radicais peróxidos. O oxigênio singlete é produzido na reação de intercâmbio de energia, quando um sensibilizador é excitado por uma luz e subseqüentemente transfere sua energia ao oxigênio no estado fundamental. As porfirinas, clorofilas, bilirrubina ou riboflavinas são exemplos de sensibilizadores endógenos no sistema biológico.

Desde o estudo de Foote e Denny (1968) o β -caroteno é conhecido como um eliminador eficaz do oxigênio singlete. Outros carotenóides como o licopeno, o α -caroteno e um número de xantofilas também são ativadas na eliminação do oxigênio singlete. A desativação do oxigênio simpleto pelos carotenóides é produzida principalmente por uma eliminação física. Este processo implica na transferência da energia de excitação do oxigênio simpleto ao carotenóide no estado fundamental, produzindo uma formação de oxigênio no estado fundamental e um carotenóide tripleto. A energia do carotenóide excitado se dissipa através das interações entre o carotenóide e o solvente que

foi usado para sua recuperação no estado fundamental, produzindo energia térmica. O carotenóide permanece intacto através do processo de eliminação física e pode ser introduzido em outro ciclo de desativação (Truscott, 1990; Stahls e Sies, 1993).

Uma diferença da desativação dos radicais peróxidos pelos carotenóides implica numa reação química entre o radical e o carotenóide. O carotenóide é modificado quimicamente nesta interação, e os produtos resultantes são antioxidantes menos reativos. Com relação à química da reação carotenóide-radical peróxido, não deve ser elucidada sem ser identificado vários produtos da oxidação, como apocarotenóis e epóxidos de carotenóides (McClure e Liebler, 1995). O processo de eliminação de radicais peróxidos pelos carotenóides, depende da pressão de oxigênio no sistema. O β -carotenóide tem mostrado ser um melhor oxidante a baixas pressões de oxigênio. Tem sido demonstrado que os carotenóides atuam sinergicamente com outros antioxidantes (Burton e Ingold, 1984). Uma combinação de β -caroteno e α -tocoferol proporcionam uma melhor proteção contra os pro-oxidantes que os compostos individuais (Palozza et al., 1992).

As transformações dos fibroblastos pelos carcinógenos são inibidas por retinóides e carotenóides, sendo que sua potência inibidora está correlacionada com sua capacidade para induzir a comunicação entre as uniões "gap". As uniões "gap" são canais entre as membranas que permitem a difusão de moléculas entre células conectadas, e estão provavelmente implicadas no número de vias de sinalização. Fazendo-se tratamentos com β -carotenóide e cantaxantina, as comunicações entre as uniões "gap" das células aumentam. Sendo que a cantaxantina, um carotenóide não-provitamina A, regula também a comunicação entre as uniões "gap", e são questionados se estes compostos influem diretamente neste processo ou devem ser metabolizados antes, nos retinóides ativos. Recentemente tem-se demonstrado que pelos menos um produto da decomposição da cantaxantina, é um indutor muito eficiente da comunicação entre as uniões "gap" *in vitro* (Hanusch et al., 1995). Tem sido identificado o ácido 4-oxoretinóico como um produto da autooxidação da cantaxantina com propriedades indutoras da comunicação entre as uniões "gap" comparadas com as do ácido retinóico. Deste modo, os carotenóides atuariam

como precursores dos retinóides com diversas estruturas das quais poderiam ter interessantes propriedades fisiológicas.

Os carotenóides não-beta caroteno não têm, contudo, sido submetidos a estudos detalhados de toxicidade (Gerster, 1993).

O efeito anticarcinogênico de carotenóides em modelos *in vitro* e *in vivo* foram extensivamente revisados em animais. Apesar do grande número de estudos, a conexão entre a função antioxidativa de carotenóides e o notável desempenho deles em muitos modelos de animais com câncer ainda precisa ser elucidado. Uma possibilidade é que eles inibem a ativação de procarcinogênicos que podem envolver reações de oxidação (Gerster, 1993).

2.5.2 . “*Extrato do urucum*”

O urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) é cultivado em quase todos os estados brasileiros e, principalmente, nos estados da Paraíba, Pará, Bahia, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Piauí e Paraná. Estima-se a produção brasileira em 12.000 toneladas de grãos anuais. Cerca de 60% dessa produção destina-se à fabricação de colorau (colorífico) e o restante é fornecido às indústrias de corantes e, ou, exportação. A fabricação do colorau é feita desde condições caseiras até agroindústrias de porte. O maior consumo deste condimento ocorre pelas populações nordestinas. As indústrias de corantes, denominados bixina/norbixina/norbixato, exportam ou comercializam, no mercado interno, os corantes em diferentes concentrações para as indústrias alimentícias (principalmente laticínios, salsicharias, massas, etc.), cosméticas e farmacêuticas. O mercado de colorau, estimado em 20 a 25 mil toneladas/ano, movimentava cerca de US\$ 12,0 milhões anuais, enquanto o de corantes cerca de US\$ 4,8 milhões e o pó e grãos em torno de US\$ 1,4 milhões (São Jose, 1998).

O urucum (Figura 15) pode ser conhecido por vários nomes, dentre eles, Annatto, Terra Orellana, Bixa Orellana, Roucou e Achiote.



Fonte: Ugaz, 1997.

Figura 15 – Sementes do urucum e seu corante.

A partir das sementes de urucum, pode-se obter vários tipos de corantes diferentes entre si na solubilidade e pigmentação. Dentre esses corantes, pode-se citar a bixina, norbixina, sal da norbixina e os produtos de degradação térmica da bixina.

Segundo Takahashi (1987) extratos de urucum são os produtos oleosos ou alcalinos obtidos por remoção da camada externa das sementes da árvore de urucum por vários processos. Estes extratos apresentam-se em forma de pós, pastas, suspensões ou soluções. Os extratos de urucum lipossolúveis são preparados por extração da camada externa das sementes por:

- remoção direta com óleos e ou gorduras comestíveis; e
- incorporação em óleos e ou gorduras comestíveis, do extrato obtido com solventes orgânicos (acetona, diclorometano, etanol, hexano, metanol, isopropanol, tricloroetileno), após remoção desses solventes.

Talvez o que torna o urucum uma das matérias primas mais interessantes para a extração de corantes seja a possibilidade de se obter, de um mesmo tipo de semente, corantes solúveis em água (hidrossolúveis) e corantes solúveis em óleo (lipossolúveis), apenas alterando o solvente de extração.

A bixina é o pigmento natural da semente de urucum, representando 80% de todos os carotenóides presentes. A partir dela, são obtidos os demais pigmentos, como a norbixina (lipossolúvel), o sal da norbixina (hidrossolúvel) e produtos de degradação térmica que têm como características a lipossolubilidade e uma coloração amarela mais estável, ideal para o uso em massa.

O sal de norbixina (figura 17) é obtido pela extração alcalina (hidróxido de sódio ou de potássio) dos pigmentos da semente do urucum. Este tipo de extração converte a bixina em um sal (sal da norbixina), que nesta forma é solúvel em soluções aquosas alcalinas. O sal da norbixina é precipitado na forma de norbixina pela neutralização do pH da solução (pH=7), que nesta forma não é solúvel em água.

Além do sal de norbixina, é possível a solubilização da bixina e da norbixina em água com a utilização de emulsificantes como os polissorbatos, propileno glicol e outros. Essas emulsões são importantes na aplicação do pigmento em alimentos com pH baixo, o que torna inviável a utilização do sal da

norbixina. Além disso, é possível obter, com o uso de emulsificantes, formulações solúveis tanto em água como em óleo.

Os principais aspectos tecnológicos que afetam o uso do sal da norbixina são a solubilidade, o pH, a estabilidade e a propriedade que este pigmento tem de se ligar a proteínas.

A hidrossolubilidade do sal de norbixina é limitada ao pH da solução, fazendo o seu uso restrito a produtos, cujo processo de aplicação do corante não exceda determinados limites. Todavia, este tipo de pigmento apresenta a característica única de se ligar à proteína, tornando-o altamente interessante para determinados tipos de produtos (Carvalho, 1992).

A fórmula molecular da bixina é $C_{25}H_{30}O_4$, sendo sua massa molar igual a 394,50 g/mol. A fórmula molecular da norbixina é $C_{24}H_{28}O_4$, enquanto sua massa molar é 380,48 g/mol.

A bixina tem 20 carbonos em cadeia conjugada com um grupo carboxílico e um grupo metil éster terminais (figura 16). A isomerização nos átomos de carbono 15-16 resultam nas formas trans e cis, chamados β e α , respectivamente (Zechmeister e Eswe, 1994).

Outros derivados da bixina, incluindo norbixina, têm um grupo carboxílico no final da estrutura com 20 carbonos conjugados; e metil bixina tem um grupo metil éster a cada terminal da cadeia.

O extrato de urucum lipossolúvel deve conter no mínimo 0,2% de carotenóides, expressos como bixina, enquanto o extrato de urucum hidrossolúvel deve conter no mínimo 0,2% de carotenóides, expressos como norbixina.

A fração lipossolúvel é insolúvel em água e pouco solúvel em etanol e a fração hidrossolúvel é solúvel em água e pouco solúvel em etanol.

Estes extratos produzem com o ácido sulfúrico concentrado coloração azul, devido a bixina; ou azul-esverdeado, devido a norbixina. Os extratos lipossolúveis, diluídos com clorofórmio, dão absorvância máxima a 439, 470 e 501 nm. Os extratos hidrossolúveis, diluídos em água, dão absorvância máxima a 453 e 483nm.

Os extratos de urucum lipossolúveis devem trazer no rótulo o teor total de carotenóides expressos como % de bixina.

Os extratos de urucum hidrossolúveis devem trazer no rótulo o teor total de carotenóides expressos como % de norbixina.

Nos dois casos, deverão ser acrescentadas as substâncias adicionadas como veículo.

Aos extratos de urucum, não poderão ser atribuídas atividades de pró-vitamina A.

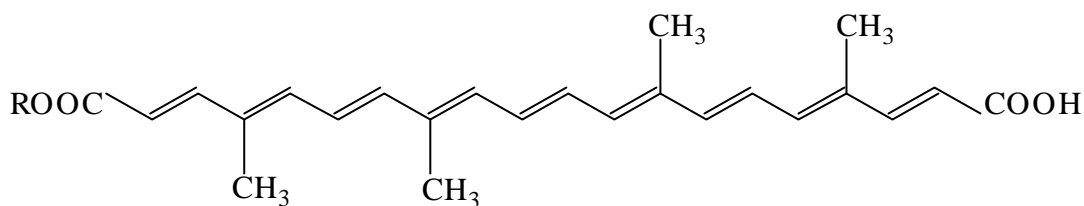


Figura 16 – Fórmula estrutural dos corantes naturais bixina (R = CH₃) e norbixina (R = H).

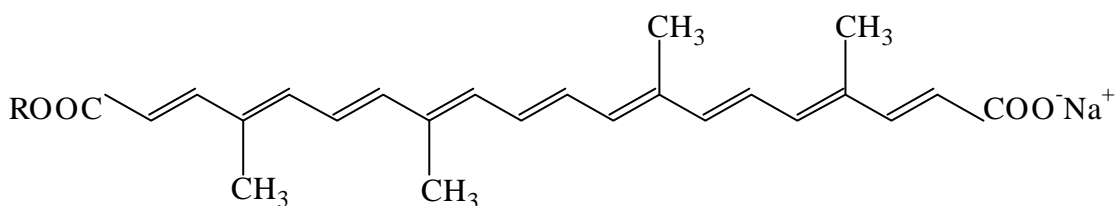


Figura 17 – Fórmula estrutural do sal de sódio da norbixina.

2.5.3 . Aplicações do corante do urucum

O corante de urucum é um aditivo largamente utilizado pela indústria de alimentos, graças à sua versatilidade de se obter pigmentos lipossolúveis, para melhorar a atratividade de produtos como manteiga, margarinas, óleo de milho, sobremesas, queijos, etc. Já os hidrossolúveis são aplicados em queijos, salsichas, sorvetes, derivados de cereais, confeites, bebidas e molhos (Pimentel, 1995; Prentice-Hernandez, 1993 E Takahasia e Yabiku, 1992).

Com a finalidade de investigar a recomendação popular do uso de urucum em problemas cardiovasculares, Luduving (1997) relata que após testes com cães, ratos e coelhos, comprovou-se a eficiência da água do urucum obtida por maceração das sementes (composto por mais de 80% de bixina como

pigmento), na redução significativa dos índices de colesterol. Em testes clínicos, os resultados se confirmaram num tempo de 10 dias de consumo, ao invés de 15 dias previstos inicialmente, pois havia pacientes com níveis de gorduras sangüíneas abaixo do normal. Credita-se aos resultados que esse pigmento tenha o poder de acelerar o metabolismo das gorduras, sendo o responsável pela redução das taxas de triacilgliceróis e colesterol que, por algum mecanismo, só abaixa a fração ruim deste último.

2.6 . Influência de produtos naturais no metabolismo lipídico

As plantas medicinais e seus derivados consistiram durante muito tempo a base da terapêutica e, atualmente, cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal, enquanto 50% são de origem sintética, mas relacionados aos princípios isolados de plantas medicinais (Ugaz, 1994; Cechinel Filho e Yunes, 1998). Isto se deve, em parte, à grande variedade de espécies (250-500 mil) de plantas existentes na flora mundial, muitas com importantes propriedades terapêuticas (Hamburger e Hostettmann, 1991). Nos últimos anos, tem-se verificado um grande aumento nos estudos que comprovam o que se conhece empiricamente, visto que a medicina popular é rica em exemplos de plantas utilizadas para diversos fins, que substituem, muitas vezes, a prescrição médica (Mitscher, et al., 1987 e Lozoya, 1997). Acredita-se que cerca de 80% da população mundial use as plantas como primeiro recurso terapêutico (Yamada, 1998).

A administração diária do extrato das cascas de *B. purpúrea* (2,5 mg/Kg i.p.) em ratas, com disfunção tiroídiana, revelou que esta planta é capaz de aumentar a atividade da glicose-6-fosfatase, assim como apresentou efeitos antiperoxidativos, indicado pela diminuição da peroxidação lipídica hepática e aumento da atividade enzimática antioxidante (Silva e Filho, 2002).

A ingestão de frutas e vegetais é associada com um risco reduzido de câncer e doenças cardiovasculares. Enquanto estes efeitos protetores foram atribuídos principalmente a beta-caroteno e ascorbato, componentes fenólicos também podem fazer este papel, principalmente os flavonóides. Amplamente

distribuído nas folhas, sementes, e flores, foram identificados mais de 6.000 flavonóides até esta data. Em plantas, estas combinações geram proteção contra radiação ultravioleta, defesa contra o ataque de patógenos, e herbívoros (Harborne e Williams, 2000). O copigmento de antocianinas em flores atrai insetos polinizadores (Harborne e Williams, 2000) e é responsável pelas cores vermelhas e azuis, características de vinhos e certos vegetais. Embora a ingestão dietética de flavonóides varie consideravelmente entre regiões geográficas e culturas, é calculada uma ingestão diária de 23 mg nos Países Baixos (Hertog et al., 1992).

A maioria dos efeitos benéficos para a saúde de flavonóides é atribuído aos seus efeitos antioxidantes e habilidades quelativas. Em virtude da sua capacidade para inibir a oxidação de LDL, os flavonóides tem demonstrado efeitos cardioprotetores únicos (Kondo et al., 1996 e Mazur et al., 1999). Foram mostradas que dietas ricas em flavonóides podem reduzir os danos miocárdiais pós-isquêmicos em ratos (Facino et al., 1999).

Flavonóide é uma classe fenólica secundária de plantas. Na dieta humana, estão na maioria concentrados em frutas, legumes, vinhos, chás e cacau. O efeito cardioprotetor deles estão na habilidade para inibir peroxidação de lipídeos, quelando metais redox-ativos e atenuando outros processos que envolvem espécies reativas de oxigênio. Flavonóides ocorrem em alimentos primeiramente como glicosídeos e polímeros que são degradados a extensões variáveis no trato digestivo. Embora o metabolismo destes compostos remanescentes seja evasivo, ocorre absorção entérica suficiente para reduzir índices plasmáticos de estado oxidante. A tendência de um flavonóide para inibir radicais livres mediando eventos é governada por sua estrutura química. Desde que estes compostos estejam baseados no núcleo de flavana, o número, posições e tipos de grupos substituídos influenciam na sua atividade quelante. A diversidade e mecanismos de múltiplas ações de flavonóides, junto com os numerosos métodos de iniciação, detecção e medida de processos oxidativos *in vitro* e *in vivo* oferecem explicações plausíveis para discrepâncias existentes em relações a sua estrutura-atividade. Apesar de algumas linhas incompatíveis de evidência, várias relações de estrutura-atividade são bem estabelecidas *in vitro*. Múltiplos grupos hidroxilas conferem na molécula efeitos antioxidantes, quelantes e atividades prooxidantes. Grupos metoxila introduzem efeitos

estéricos desfavoráveis e aumento da lipofilicidade e particionamento da membrana. Ligações duplas e funções carbonilas no heterociclo ou polimerização do aumento da atividade da estrutura nuclear conferem uma maior estabilidade aos radicais flavonóides pela conjugação e deslocalização de elétrons. Investigações futuras do metabolismo destes fitoquímicos é justificada para entender as relações entre estrutura-atividade como preventivo e estratégias nutricionais terapêuticas (Heim, et al., 2002).

Lee, et al. (2001) mostraram que o efeito anti-aterogênico de flavonóides cítricos, naringina e naringenina, em coelhos albinos da raça Nova Zelândia alimentados com uma dieta rica em colesterol (1% da dieta) é envolvido por uma atividade hepática diminuída da ACAT (acil-CoA: colesterol aciltransferase) e com uma baixa regulação da expressão gênica de VCAM-1 (molécula de adesão em células vascular-1) e MCP-1 (proteína quimostática em monócitos-1).

Lee, et al. (2003) sugeriram que a biogênese e esterificação do colesterol fossem concomitantemente reduzidos pelo derivado sintético da naringenina, a naringenina 7-O-acetila éter, como foi indicado pela redução das atividades da HMG-CoA redutase e da ACAT.

3 . MATERIAL E MÉTODOS

3.1 . Comparação dos níveis séricos de diferentes espécies animais submetidos a hipercolesterolemia.

Foram utilizados 16 coelhos albinos, *Oryctolagus cuniculus*, (figura 18), machos, da variedade Nova Zelândia, com peso médio de $2.200 \pm 100\text{g}$ e idade média de 56 dias, 16 ratos, *Rattus noruergicus*, machos (figura 19), da variedade Wistar, com peso médio de $200 \pm 20\text{g}$ e idade média de 56 dias de vida e 16 cobaias, *Cavia porcellus*, machos (figura 20), da variedade Peruana, com peso médio de 311g e idade média de 90 dias de vida.

Todos os animais receberam a ração comercial específica para cada tipo de animal e água *ad libitum*. Ficaram acondicionados em gaiolas próprias e individuais, com temperatura controlada ($26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas.

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com seis grupos contendo oito animais em cada um, que receberam os tratamentos conforme descrito abaixo:

- Grupo 1 (coelhos): Recebeu apenas ração (grupo controle).
- Grupo 2 (coelhos): Ração + Colesterol + Ácido cólico.
- Grupo 3 (ratos): Recebeu apenas ração (grupo controle).

- Grupo 4 (ratos): Ração + Colesterol + Ácido cólico.
- Grupo 5 (Cobaias): Recebeu apenas ração (grupo controle).
- Grupo 6 (Cobaias): Ração + Colesterol + Ácido cólico.



Figura 18 – Coelhos machos.



Figura 19 – Ratos machos.



Figura 20 – Cobaias machos.

A indução da hiperlipidemia foi testada, administrando-se, por via oral, colesterol a 1% + ácido cólico a 0,1% do peso da ração diária misturada à mesma.

Nos 30^o e 60^o dias de experimento, foram coletados amostras de sangue de todos os animais. Em seguida foram centrifugadas as amostras a 7100 x g, durante 15 minutos, para obtenção do soro (figura 21). As dosagens sorológicas foram feitas no equipamento multiparamétrico de Bioquímica (Alizé), Mod Lisabio B.652, utilizando kits da marca BioMérieux (figura 22) e os resultados foram expressos em mg/dL de colesterol, colesterol-HDL, triacilgliceróis e glicose.

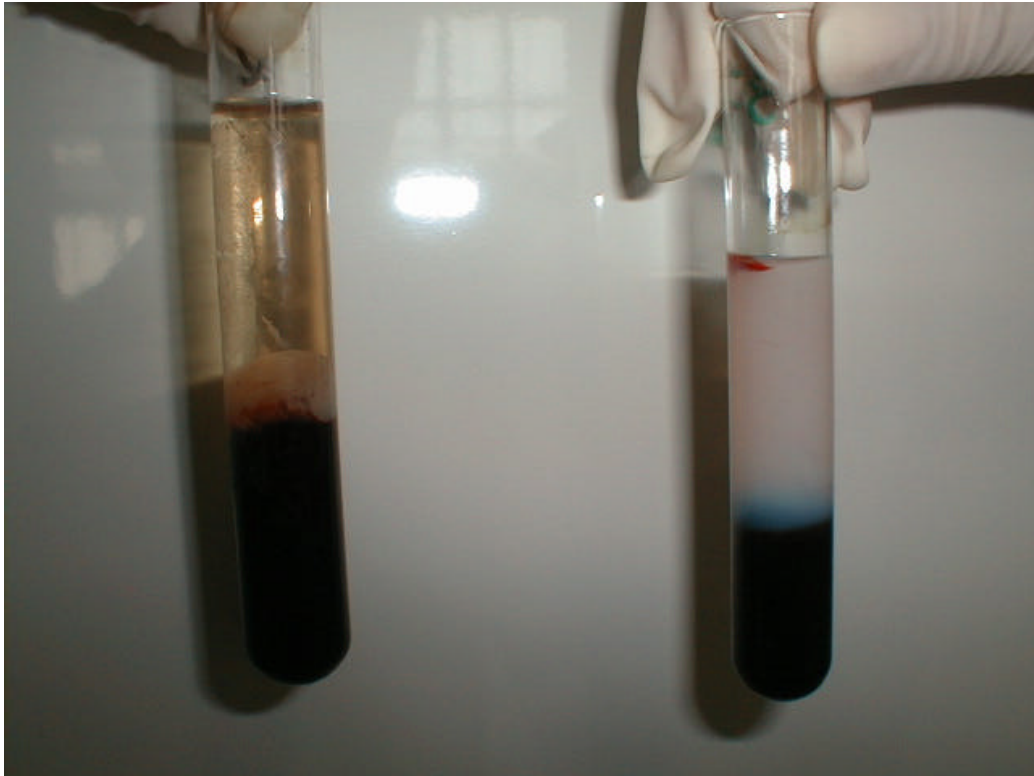


Figura 21 – Comparação visual entre um soro normal (à esquerda) e um soro hiperlipidêmico (à direita), coletado de coelhos.



Figura 22 – Equipamento multiparamétrico de Bioquímica (Alizé).

3.1.1 . Análise histopatológica

Após o término do experimento, foram coletadas amostras de fígado e arco aórtico dos animais, numa repetição de quatro amostras para cada grupo, escolhidos ao acaso. A seguir foi realizada a análise histopatológica, verificando-se o acúmulo de gordura hepática, caracterizada patologicamente como esteatose hepática e de alteração nas camadas da túnica íntima do arco aórtico. Estes cortes de tecido foram fixados em formol tamponado 10% por 24-48 horas.

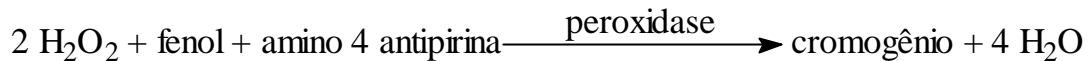
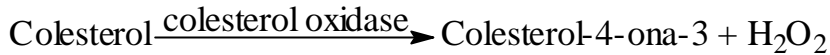
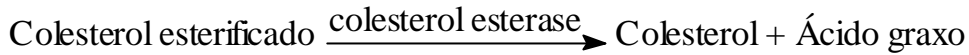
Para a confecção das lâminas, os fragmentos foram coletados e desidratados em álcoois de 70 à 95%, passando após por álcool absoluto por três vezes, após o que, passaram por uma mistura de álcool + xilol e por xilol três vezes. O tempo de permanência em cada solução alcoólica foi de 30 minutos para os álcoois 70 a 95%, 1 hora para cada banho de álcool absoluto, 30 minutos para a mistura de álcool + xilol e 50 minutos para cada banho de xilol. Foram imersos em parafina três vezes e incluídos na terceira solução de parafina de um dia para o outro. O tempo de permanência para cada banho de parafina foi de 1 hora. No dia seguinte, foram adaptados em suportes de madeira e levados desta forma para o micrótomo rotativo manual (American Optical Company), onde foram cortados em espessura de 5 µm e colocados nas lâminas. Procedeu-se a desparafinização e hidratação destes cortes com xilol (2 banhos de 10 minutos), álcoois absoluto 95%, 80% e 70% (3 minutos em cada) e água (5 minutos). As lâminas foram coradas com hematoxilina durante um minuto e eosina durante 30 segundos, deixados em água corrente e após, montagem, e secagem, analisadas ao microscópio Olympus BX 40.

As lâminas foram analisadas qualitativamente de acordo com a quantidade de gotículas de gordura depositadas nos tecidos para cada grupo, tendo sido comparadas entre si e aos grupos controle.

3.1.2 . Determinação do colesterol

A análise colorimétrica do colesterol no soro obtido baseou-se na transformação do colesterol esterificado em colesterol e ácido graxos, mediado pelo colesterol esterase. O colesterol formado é oxidado pelo colesterol oxidase

em colesterol-4-ona-3, liberando água oxigenada. Esta, juntamente com o fenol e amino 4 antipirina, pela ação da peroxidase, são transformados no cromógeno (que absorve em 500 nm) e em água, segundo as equações:



Para a dosagem, foi utilizado o equipamento multiparamétrico de Bioquímica (Alizé). Utilizando uma solução tampão fosfato pH 7,00 a 0,1 mol/L, contendo as respectivas enzimas solubilizadas e separadamente os soros sangüíneos a serem analisados.

Depois de programado o equipamento, ocorreu a mistura da solução mencionada acima com os determinados soros, que foram incubados por um tempo programado à 37°C e quantificados em 500 nm.

O aparelho subtraiu a absorvância encontrada do branco (solução tampão das enzimas com soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em mg/dL de colesterol no soro sangüíneo.

A fórmula geral para a conversão da absorvância na concentração em mg/dL foi a seguinte:

$$\frac{A_{amostra}}{A_{padrão}} \times [\text{padrão}]$$

em que $A = \text{absorvância}$

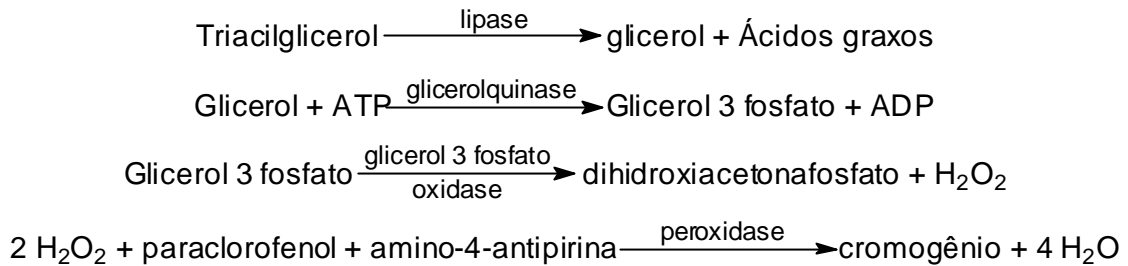
3.1.3. Determinação do triacilglicerol

A dosagem dos triacilgliceróis séricos foi feita por via inteiramente enzimática.

A lipase degrada os triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos. O glicerol obtido reage com ATP, em presença da glicerolquinase, obtendo glicerol-3

fosfato e ADP. O glicerol-3 fosfato é oxidado a dihidroxiacetona fosfato, pelo glicerol-3 fosfato oxidase, liberando água oxigenada. A água oxigenada, juntamente com paraclorofenol e amino 4 antipirina, em presença da peroxidase, transforma-se no cromógeno (que absorve em 505 nm), liberando água.

As equações são as seguintes:



Para a dosagem, foi utilizado o equipamento multiparamétrico de Bioquímica (Alizé). Foi utilizada uma solução tampão fosfato pH 7,00 a 0,1 mol/L, contendo as respectivas enzimas solubilizadas e separadamente os soros sangüíneos a serem analisados.

Depois de programado, este promoveu a mistura da solução mencionada acima com os determinados soros, que foram incubados por um tempo programado à 37°C e quantificados em 505 nm.

O aparelho subtraiu a absorvância encontrada do branco (solução tampão das enzimas com soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em mg/dL de triacilglicerol no soro sangüíneo.

A fórmula geral para a conversão da absorvância na concentração em mg/dL foi a seguinte:

$$\frac{A_{amostra}}{A_{padrão}} \times [padrão]$$

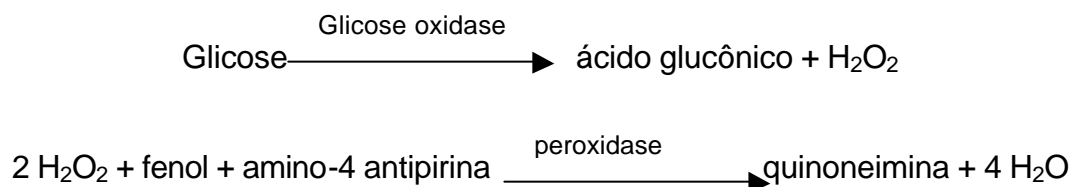
em que $A = \text{absorvância}$

3.1.4 . Determinação do colesterol-HDL

O método de dosagem se baseou na precipitação dos quilomícrons e da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e de baixa densidade (LDL) contidos no soro a ser analisado, pela adição do ácido fosfotungstico em presença do íon magnésio. O sobrenadante obtido por centrifugação contém as lipoproteínas de alta densidade (HDL), cujo colesterol é determinado pelo processo já descrito.

3.1.5 . Determinação da glicose

A glicose presente na amostra de soro se determina segundo o seguinte esquema reacional



Para a dosagem, foi utilizado o equipamento multiparamétrico de Bioquímica (Alizé). Foi utilizada uma solução tampão fosfato pH 6,5 a 225 mmol/L, contendo as respectivas enzimas solubilizadas e separadamente os soros sanguíneos a serem analisados.

Depois de programado, este promoveu a mistura da solução mencionada acima com os determinados soros, que foram incubados por um tempo programado à 37⁰C e analisados em um comprimento de onda de 505nm.

O aparelho subtraiu a absorvância encontrada do branco (solução tampão das enzimas com soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em mg/dL de glicose no soro sanguíneo.

A fórmula geral para a conversão da absorvância na concentração em mg/dL foi a seguinte:

$$\frac{A_{amostra}}{A_{padrão}} \times [padrão]$$

em que $A = \text{absorvância}$

3.2 . Comparação dos níveis séricos de coelhos hiperlipidêmicos de acordo com a via de indução.

Foram utilizados 84 coelhos albinos, machos, Nova Zelândia, peso médio $2.200 \pm 100\text{g}$ e idade média de 56 dias. Estes receberam a ração comercial Nutricoelhos e água à vontade. Os coelhos foram separados em quatorze grupos contendo seis animais em cada um, distribuídos ao acaso, que receberam os tratamentos conforme descrito abaixo:

Grupo 1: Ração (grupo controle).

Grupo 2: Ração + Colesterol + Ácido cólico (controle hiperlipidêmico), RCA.

Grupo 3: RCA + Biochanina A por via oral.

Grupo 4: RCA + Biochanina A por via intraperitoneal.

Grupo 5: RCA + Kaempferol por via oral.

Grupo 6: RCA + Kaempferol por via intraperitoneal.

Grupo 7: RCA + Naringina por via oral.

Grupo 8: RCA + Naringina por via intraperitoneal.

Grupo 9: RCA + Antocianina por via oral.

Grupo 10: RCA + Antocianina por via intraperitoneal.

Grupo 11: RCA + Bixina por via oral.

Grupo 12: RCA + Bixina por via intraperitoneal.

Grupo 13: RCA + Monascus por via oral.

Grupo 14: RCA + Monascus por via intraperitoneal.

A hiperlipidemia foi induzida, administrando-se, por via oral, colesterol a 1% + ácido cólico a 0,1% do peso da ração diária, misturada à mesma.

O colesterol + ácido cólico foram ministrados todos os dias, juntamente com a ração e as substâncias a serem testadas.

As substâncias em estudo foram fornecidas na dose de 5 mg/kg de peso corporal, por via oral, em cápsulas, utilizando o talco farmacêutico como veículo e por via intraperitoneal, utilizando-se o propileno glicol como veículo.

Decorridos 30 dias com este tratamento, o sangue dos animais foi coletado, no plexo retro-orbital. Em seguida, foram centrifugados a $7.100 \times g$, durante 15 minutos, para obtenção do soro. As dosagens sorológicas foram efetuadas e obtidas os resultados em mg/dL de colesterol, colesterol – HDL e triacilglicerol.

As análises de colesterol, colesterol – HDL e triacilglicerol foram feitas do mesmo modo como descritas na comparação entre as espécies.

3.3 . Comparação entre doses de alguns flavonóides no metabolismo lipídico de coelhos.

Foram utilizados 90 coelhos, Nova Zelândia, com peso médio variando de $1.550 \pm 100g$ e com idade de oito semanas a $2.200 \pm 100g$ após atingir doze semanas de idade. Eles receberam a ração comercial Nutricoeelhos na proporção de 100 gramas diárias e água à vontade.

Os coelhos foram separados em 18 grupos contendo 5 animais em cada um, distribuídos ao acaso, recebendo as substâncias conforme descritas abaixo:

Grupo 1: Ração (grupo controle).

Grupo 2: Ração + Colesterol + Ácido cólico

Grupo 3: Ração + Colesterol + Ácido cólico + 5 mg de Quercetina

Grupo 4: Ração + Colesterol + Ácido cólico + 10 mg de Quercetina

Grupo 5: Ração + Colesterol + Ácido cólico + 15 mg de Quercetina

Grupo 6: Ração + Colesterol + Ácido cólico + 30 mg de Quercetina

Grupo 7: Ração + Colesterol + Ácido cólico + 5 mg de Rutina

Grupo 8: Ração + Colesterol + Ácido cólico + 10 mg de Rutina

Grupo 9: Ração + Colesterol + Ácido cólico + 15 mg de Rutina

Grupo 10: Ração + Colesterol + Ácido cólico + 30 mg de Rutina

Grupo 11: Ração + Colesterol + Ácido cólico + 5 mg de Morina

Grupo 12: Ração + Colesterol + Ácido cólico + 10 mg de Morina

Grupo 13: Ração + Colesterol + Ácido cólico + 15 mg de Morina

Grupo 14: Ração + Colesterol + Ácido cólico + 30 mg de Morina

Grupo 15: Ração + Colesterol + Ácido cólico + 5 mg de Naringenina

Grupo 16: Ração + Colesterol + Ácido cólico + 10 mg de Naringenina

Grupo 17: Ração + Colesterol + Ácido cólico + 15 mg de Naringenina

Grupo 18: Ração + Colesterol + Ácido cólico + 30 mg de Naringenina

A hiperlipidemia foi induzida, administrando-se, por via oral, colesterol a 0,5% + ácido cólico a 0,1% de peso da ração diária.

O colesterol + ácido cólico foram ministrados todos os dias, juntamente com a ração e as substâncias testes. As substâncias em estudo foram fornecidas na dose especificadas acima, de acordo com peso corporal dos animais, por via oral, em cápsulas, utilizando o talco como veículo.

Após 28 dias com este tratamento, o sangue dos animais foi coletado. Em seguida, foram centrifugados a 7.100 x g, durante 15 minutos, para obtenção do soro. As dosagens sorológicas foram efetuadas e obtidas os resultados em mg/dL de colesterol, colesterol – HDL e triacilglicerol.

As análises de colesterol, colesterol – HDL e triacilglicerol foram feitas do mesmo modo como descritas anteriormente.

3.4 . Comparação entre os efeitos da aplicação de 10 mg de flavonóides e corantes no metabolismo lipídico de coelhos hiperlipidêmicos.

Para os ensaios biológicos, realizados com o objetivo de testar e comparar os efeito de alguns flavonóides e corantes, sob o metabolismo lipídico, foram utilizados coelhos albinos, machos, da raça Nova Zelândia, com peso médio $2.264 \pm 120g$ e idade média de 56 dias. Os animais foram distribuídos ao acaso em 14 grupos experimentais, contendo seis animais cada um, sendo que os animais receberam os seguintes tratamentos para cada substância teste:

Grupo 1 - Ração

Grupo 2 - Ração + Colesterol (1%) + Ácido cólico (0,1%)

Grupo 3 - Ração + Colesterol (1%) + Ácido cólico (0,1%) + baicaleína (10 mg)

Grupo 4 - Ração + Colesterol (1%) + Ácido cólico (0,1%) + morina (10 mg)

Grupo 5 - Ração + Colesterol (1%) + Ácido cólico (0,1%) + naringenina (10 mg)
Grupo 6 - Ração + Colesterol (1%) + Ácido cólico (0,1%) + naringina (10 mg)
Grupo 7 - Ração + Colesterol (1%) + Ácido cólico (0,1%) + quercetina (10 mg)
Grupo 8 - Ração + Colesterol (1%) + Ácido cólico (0,1%) + rutina (10 mg)
Grupo 9 - Ração + Colesterol (1%) + Ácido cólico (0,1%) + crisina (10 mg)
Grupo 10 - Ração + Colesterol (1%) + Ácido cólico (0,1%) + luteolina (10 mg)
Grupo 11 - Ração + Colesterol (1%) + Ácido cólico (0,1%) + apigenina (10 mg)
Grupo 12 - Ração + Colesterol (1%) + Ácido cólico (0,1%) + norbixina (10 mg)
Grupo 13 - Ração + Colesterol (1%) + Ácido cólico (0,1%) + bixina (10 mg)
Grupo 14 - Ração + Colesterol (1%) + Ácido cólico (0,1%) + colestiramina (10 mg)

Para induzir a hiperlipidemia, foi administrado diariamente, juntamente com a ração, 1% de colesterol + 0,1% de ácido cólico em relação ao peso da ração diária, num período de 30 dias.

As doses de antocianinas foram fornecidas em cápsulas, diariamente, por via oral, durante 30 dias.

No trigésimo dia foram coletadas amostras de sangue efetuadas pelo plexo venoso retro orbital utilizando-se capilar, quando os animais encontravam-se em jejum de doze horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 7100 x g, durante 15 minutos, para obtenção do soro. As dosagens sorológicas foram efetuadas no equipamento de dosagens multiparamétrico Bioquímica (Alizé), utilizando-se os “kits” Biolab e os resultados expressos em mg/dL de colesterol, colesterol-HDL e triacilgliceróis.

3.4.1 . Análise histopatológica

Após o término dos experimentos, foram coletadas amostras de fígado e arco aórtico dos animais, numa repetição de quatro amostras para os grupo naringina, rutina e baicaleína, escolhidos ao acaso, a fim de proceder à análise histopatológica, para se verificar se houve o acúmulo de gordura hepática e alterações nas camadas da túnica íntima do arco aórtico, como descritos no primeiro experimento.

3.5 . Efeito de modificadores químicos sobre a atividade de lipase.

Os flavonóides Luteolina e Apigenina e os corantes Bixina e Norbixina foram testados em presença de lipase.

A atividade enzimática foi determinada através do método de Cherry, 1932, utilizando-se o “kit” enzimático da Biobrás, em presença de éster de glicerol (balbi 6,7 g/L; Lauril sulfato de sódio 5,8 g/L) como substrato a 25^oC, em tampão tris-HCl 12,1 g/L, pH 8,55; azida sódica 0,5 g/L. As velocidades iniciais foram determinadas pela liberação de um cromóforo visível a 412 nm. Os estudos do efeito dos modificadores químicos foram realizados em presença e ausência dos compostos Luteolina, Apigenina, Bixina e Norbixina. Variando a concentração destes modificadores para concentrações fixas do substrato, a ação enzimática foi acompanhada pela medida da absorvância a 412 nm.

Foi feita uma solução com a concentração de 5×10^{-3} mol/L das substâncias a serem analisadas, sendo que a Luteolina, Apigenina e Bixina, foram solubilizadas com propileno glicol, enquanto a Norbixina com água destilada.

O estudo cinético foi realizado marcando-se 3 tubos de ensaio, sendo eles o branco (B), o controle (C) e os modificadores (M). As ordens de entrada dos reagentes na reação de cor foi criteriosamente seguida de acordo com o esquema:

Tabela 2: Esquema da ordem de entrada dos reagentes no meio reacional.

REAGENTES	BRANCO (B)	CONTROLE (C)	BRANCOS DOS MODIFICADORES (BM)	MODIFICADORES (M)
Tampão	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
Solução de lipase (1 µg/mL)*	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
Inibidor (PMSF 3,4 g/L)	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Reagente de cor**	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Substâncias a serem testadas	-	-	Variou-se o volume de 2-20 µL	Variou-se o volume de 2-20 µL

* A solução de lipase foi preparada dissolvendo-se 1 mg de lipase pancreática em 10 mL da solução tampão. Depois de misturados, retirou-se 1 mL desta solução e diluiu para 100ml com o tampão.

** O reagente de cor é uma solução de acetato de sódio 2,0 g/L; DTNB 1,2 g/L e azida sódica 0,5 g/L.

Homogeneizaram-se bem os tubos e incubou-se por 2 minutos em banho Maria a 37 °C. Adicionou-se o substrato apenas nos tubos controle e modificadores. Homogeneizou-se bem e incubou-se por exatamente 30 minutos a uma temperatura de 37 °C. Em seguida adicionou-se 1000 µL de lauril sulfato de sódio a 8 g/L em todos os tubos, para cessar a reação.

Depois de encerrada a reação, adicionou-se o substrato ao tubo com o branco, homogeneizou-se bem todos os tubos e efetuaram-se imediatamente as leituras fotométricas em 412nm. Aferiu-se o aparelho com o branco preparado como descrito acima.

Converteu-se as unidades espectrofotométricas de lipase em UI, utilizando-se a seguinte fórmula.

$$Lipase(UI) = \frac{Abs. \times 1000}{7};$$

Abs. = absorvância do controle e dos modificadores.

3.6 . Análises estatísticas

Realizou-se experimentos casualizados e os dados foram submetidos ao teste de Tukey para comparação entre as médias ($P > 0,05$), teste de Dunnett para comparação de cada grupo com os grupos controles ($P < 0,05$) e teste F para comparação entre os grupos controles ($P < 0,05$).

4 . RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 . Comparação dos níveis séricos de diferentes espécies animais submetidos a hipercolesterolemia.

A tabela 3 mostra os valores encontrados para as concentrações de colesterol, dos animais em estudo, avaliados após 30 e 60 dias de tratamento. Os dados mostram que em 30 dias os níveis séricos do colesterol dos coelhos e dos cobaias tiveram um aumento de 815,17% e 257,94%, respectivamente, sendo estatisticamente significativo se comparado ao grupo controle pelo teste F, enquanto que para os ratos este aumento foi de 4,67%, não sendo, portanto, estatisticamente significativo ao grupo controle pelo teste F.

Após 60 dias do início do experimento, fez-se uma nova coleta sanguínea para que se pudesse analisar novamente as concentrações séricas dos constituintes sanguíneos dos ratos em comparação aos dos coelhos, já que este último se mostrou como o animal em que melhor se induziu a hipercolesterolemia.

Pelos dados apresentados, no coelho obteve-se um aumento de 1049,71% de colesterol total, enquanto que nos ratos foi observada uma redução de 10,82%, sendo que este valor não foi estatisticamente significativo em relação ao grupo controle pelo teste F.

Tabela 3: Valores médios do colesterol total (\pm erro-padrão) no soro sanguíneo de coelhos, ratos e cobaias, avaliados aos 30 e 60 dias e seu respectivo percentual de variação em relação à ração.

Espécies animais	Colesterol (mg/dL)		% de variação em relação à ração aos:	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
1 – Coelhos	88,55 \pm 2,51	138,33 \pm 17,87	–	–
2 – Coelhos	810,38 \pm 187,81	1.590,40 \pm 136,75	+815,17 #	+1049,71 #
3 – Ratos	87,4 \pm 12	76,00 \pm 22,20	–	–
4 – Ratos	91,48 \pm 20,98	67,78 \pm 8,12	+4,67	-10,82
5 – Cobaias	45,53 \pm 12,40	–	–	–
6 – Cobaias	162,97 \pm 69,29	–	+257,94 #	–

Estatisticamente diferente do grupo-controle (ração) pelo Teste F ($P < 0,05$).

Coelhos – (grupos 1 e 2); ratos (grupos 3 e 4); cobaias (grupo 5 e 6).

– Não foram feitas as análises das cobaias aos 60 dias.

A tabela 4 mostra os valores encontrados para as concentrações séricas de colesterol-HDL. Após 30 dias de tratamento, os coelhos mostraram um aumento de 115,97% no teor de colesterol-HDL e as cobaias de 214,08%, sendo estes valores estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle pelo teste F, enquanto que os ratos mostraram uma redução de 7,26%, o que não foi estatisticamente significativo se comparado ao grupo controle pelo teste F.

Após 60 dias, os níveis do colesterol-HDL nos coelhos tiveram um aumento de 223,54% em relação ao grupo controle, o que é estatisticamente significatvo pelo teste F, já os ratos obtiveram um aumento de 8,66%, não sendo, portanto, estatisticamente significativo em relação ao grupo controle pelo teste F.

Tabela 4: Valores médios de colesterol-HDL (\pm erro-padrão) no soro sangüíneo de coelhos, ratos e cobaias, avaliados aos 30 e 60 dias e seu respectivo percentual de variação em relação àração.

Espécies animais	Colesterol-HDL (mg/dL)		% de variação em relação àração aos:	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
1 – Coelhos	42,70 \pm 4,05	47,96 \pm 2,96	–	–
2 – Coelhos	92,22 \pm 19,38	155,17 \pm 9,93	+115,97 #	+223,54 #
3 – Ratos	55,08 \pm 9,02	38,80 \pm 10,30	–	–
4 – Ratos	51,08 \pm 18,72	35,44 \pm 5,46	-7,26	+8,66
5 – Cobaias	12,01 \pm 6,01	–	–	–
6 – Cobaias	37,69 \pm 31,73	–	+214,08 #	–

Estatisticamente diferente do grupo-controle (ração) pelo Teste F (P<0,05).

Coelhos – (grupos 1 e 2); ratos (grupos 3 e 4); cobaias (grupo 5 e 6).

– Não foram feitas as análises das cobaias aos 60 dias.

Em relação ao triacilglicerol, apenas os coelhos tiveram um aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo controle pelo teste F aos 30 e 60 dias de tratamento, que foram de 110, 94% e 134,42%, respectivamente, de acordo com a tabela 5.

Os ratos obtiveram uma redução nestes níveis, aos 30 e 60 dias, que foram de 14,54 e 8,29, respectivamente, enquanto que as cobaias obtiveram um aumento de 8,53% aos 30 dias de tratamento, sendo estes valores estatisticamente igual ao grupo controle pelo teste F.

É de se esperar que as concentrações sanguíneas de lipídeos em ratos sejam menores, uma vez que possuem três tipos de HDL e três tipos de ácidos biliares (cólico, quenodesoxicólico e muricólico) (Leite, 1993).

Tabela 5: Valores médios de triacilglicerol (\pm erro-padrão) no soro sanguíneo de coelhos, ratos e cobaias, avaliados aos 30 e 60 dias e seu respectivo percentual de variação em relação à ração.

Espécies animais	Triacilglicerol (mg/dL)		% de variação em relação à ração aos:	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
1 – Coelhos	99,78 \pm 6,16	113,78 \pm 19,52	–	–
2 – Coelhos	210,48 \pm 1,54	266,72 \pm 60,96	+110,94 #	+134,42 #
3 – Ratos	83,22 \pm 36,59	72,99 \pm 10,23	–	–
4 – Ratos	71,12 \pm 17,87	66,94 \pm 4,18	-14,54	-8,29
5 – Cobaias	74,66 \pm 14,50	–	–	–
6 – Cobaias	81,03 \pm 50,32	–	+8,53	–

Estatisticamente diferente do grupo-controle (ração) pelo teste F ($P < 0,05$).

Coelhos – (grupos 1 e 2); ratos (grupos 3 e 4); cobaias (grupo 5 e 6).

– Não foram feitas as análises das cobaias ao 6^a dias.

Na tabela 6, são mostrados as concentrações de glicose nos coelhos, ratos e cobaias. Aos 30 dias de tratamento, obteve-se um aumento de 22,91% nos coelhos, 3,14% nos ratos e 4,19% nas cobaias, enquanto que aos 60 dias obteve-se um aumento de 23,00% nos coelhos e uma redução de 2,33% para os ratos em comparação com o grupo controle de cada espécie, sendo todas estas variações não estatisticamente significativas aos respectivos grupos controles pelo teste F.

Tabela 6: Valores médios de glicose (\pm erro-padrão) no soro sangüíneo de coelhos, ratos e cobaias, avaliados aos 30 e 60 dias e seu respectivo percentual de variação em relação à ração.

Espécies animais	Glicose (mg/dL)		% de variação em relação à ração aos:	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
1 – Coelhos	125,56 \pm 1,34	126,99 \pm 2,59	–	–
2 – Coelhos	154,33 \pm 4,77	156,20 \pm 10,46	+22,91	+23,00
3 – Ratos	285,48 \pm 86,68	225,25 \pm 44,35	–	–
4 – Ratos	294,45 \pm 30,35	220,00 \pm 65,4	+3,14	-2,33
5 – Cobaias	142,27 \pm 41,86	–	–	–
6 – Cobaias	148,23 \pm 34,45	–	+4,19	–

Estatisticamente diferente do grupo-controle (ração) pelo Teste F ($P < 0,05$).
 Coelhos – (grupos 1 e 2); ratos (grupos 3 e 4); cobaias (grupo 5 e 6).
 – Não foram feitas as análises das cobaias ao 6^a dias.

Äguila et al. (2002) mostraram um aumento pouco expressivo em um trabalho com ratos com duração de 180 dias, com uma dieta rica em diferentes tipos de lipídios, o que mostra que este tipo de animal, tratado com uma dieta rica em lipídeos não é um bom modelo experimental para trabalhos com hipercolesterolemia. Uma alternativa é o trabalho com ratos modificados geneticamente.

O coelho mostrou concentrações séricas extremamente altas em um curto intervalo de tempo, o que o faz ser um dos animais mais procurados atualmente para trabalhos com hiperlipidemias.

Em cobaias obteve-se também concentrações estatisticamente significativas, apesar de não apresentarem concentrações tão altas como os dos coelhos, ele apresenta a vantagem de ter, entre os animais estudados, o metabolismo lipídico mais parecido com o do ser humano.

4.1.1 . Análise histopatológica

Na análise histopatológica, verificou-se o acúmulo de gordura hepática nos coelhos e cobaias tratadas com colesterol e ácido cólico, caracterizado patologicamente como esteatose hepática.

O fígado é constituído por um grande número de unidades funcionais chamadas lóbulos, que têm a forma cilíndrica com uma estrutura venosa central, a veia centrolobular, que percorre seu maior eixo longitudinal. Os hepatócitos, que formam lâminas ou placas irregulares e interligadas, irradiam-se para o exterior a partir da veia centrolobular e constituem o parênquima do lóbulo. Essas lâminas de hepatócitos são separadas por capilares sinusóides que desembocam nas veias centrais dos lóbulos.

Ramos da artéria hepática e da veia porta são facilmente identificável no espaço porta. Esta descrição reflete as características dos animais do grupo controle, nos quais os hepatócitos e capilares sinusóides apresentaram-se com seu padrão normal. Os hepatócitos dos animais do grupo controle, assim como na maioria dos outros grupos, apresentaram vacuolizações citoplasmáticas. Segundo ROSS et al. (1995), estas lacunas representam depósitos de glicogênio que não foram imobilizados durante o processo de fixação, devido ao tipo de fixador utilizado. A arquitetura hepática dos animais controle é semelhante àquela encontrada em outros animais e em humanos (Ross et al., 1995; Junqueira & Carneiro, 1999). Não foi encontrado nos animais controle qualquer acúmulo lipídico nos hepatócitos, embora, segundo Ross et al. (1995), a quantidade de lipídeo e glicogênio no tecido hepático, em condições normais, reflitam a ingestão da dieta, não sendo incomum a presença de gotículas lipídicas em partes do parênquima hepático de animais normais.

A Figura 23 mostra um corte de tecido hepático de coelho pertencente ao grupo controle.

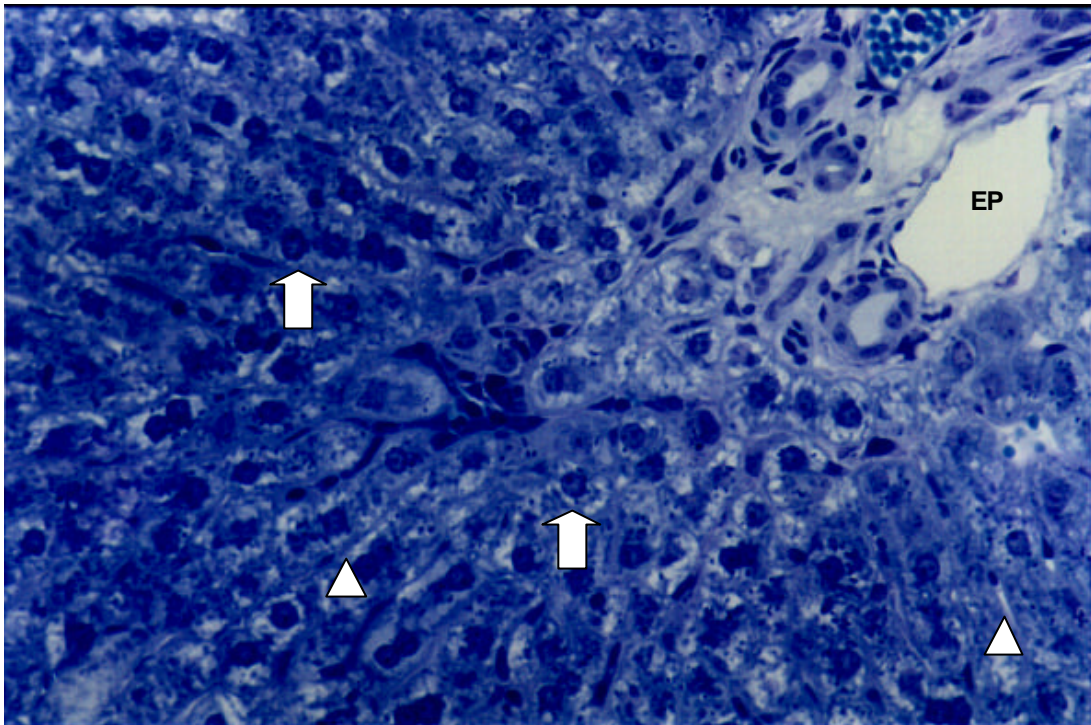


Figura 23 – Corte de tecido hepático de coelhos do grupo controle, que recebeu apenas ração, onde são observados hepatócitos (setas), capilares sinusóides entre cordões de hepatócitos (cabeças de seta) e espaço porta (EP). 395X

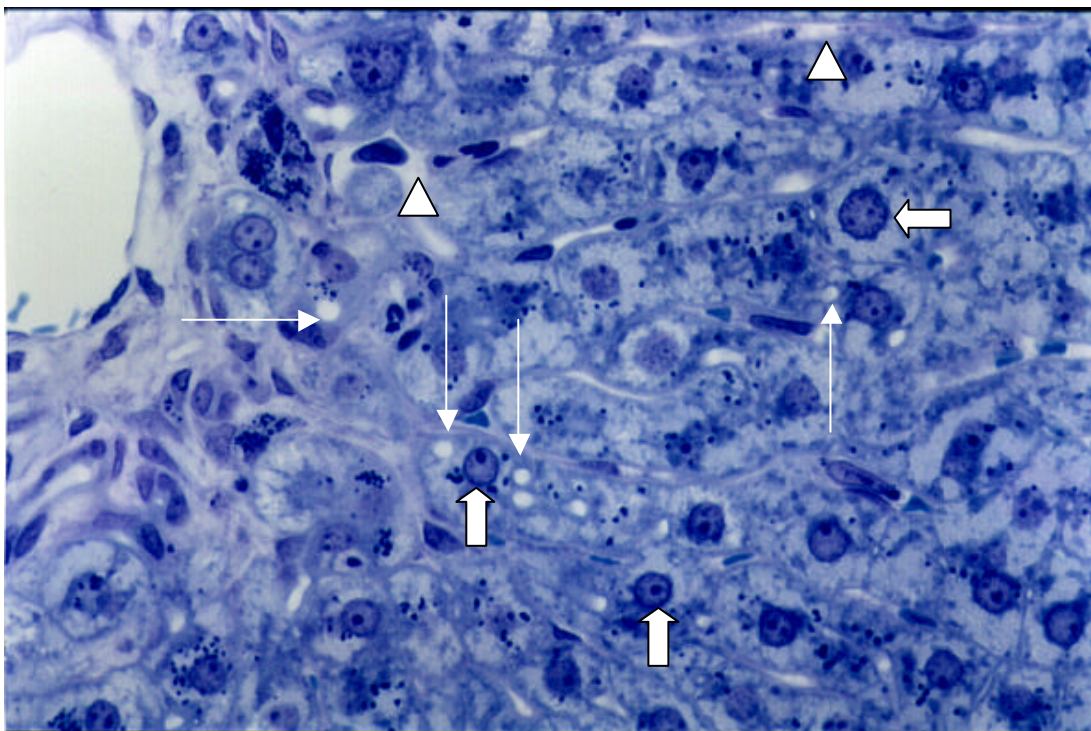


Figura 24 – Corte de tecido hepático de coelhos do grupo controle hipercolesterolêmico, que recebeu ração + colesterol + ácido cólico. São observadas gotículas de gordura (seta fina) no interior de hepatócitos (seta espessa), e capilares sinusóides (cabeças de seta). 415X

No Grupo Hipercolesterolêmico (R + AC + C) foram observados grupos de hepatócitos com gotículas de gordura citoplasmática. A ocorrência de espaços intracelulares nos hepatócitos certamente deveu-se à saída do glicogênio devido ao tipo de fixação utilizada. A presença de lesões focais foi evidenciada no parênquima hepático. A Figura 24 mostra um corte de tecido hepático de coelho pertencente a este grupo.

Na Figura 25, são apresentados cortes de tecido hepático de cobaias pertencentes ao grupo testemunha, que recebeu somente ração e água (25 A) e do grupo controle, que recebeu suplementação de colesterol e ácido cólico (25 B). Observam-se vacúolos de forma acentuada, no citoplasma dos hepatócitos (degeneração gordurosa), com distribuição centrolobular, para o grupo suplementado com colesterol, que pode ser caracterizada como esteatose hepática (Figura 25 B). No grupo testemunha, não foram observadas estas alterações histopatológicas (Figura 25 A).

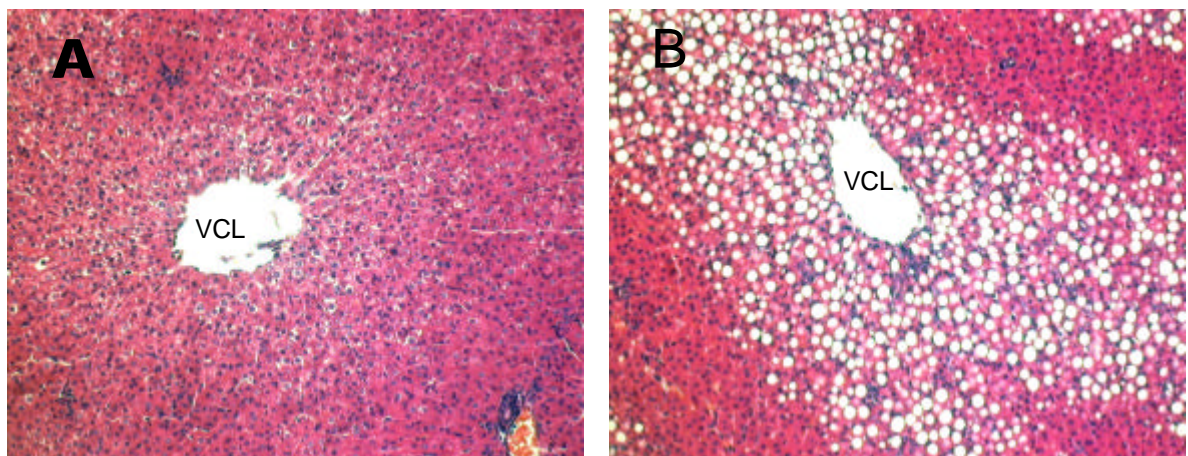


Figura 25 – Histologia do fígado de cobaias após seis semanas de experimentação. **A**, grupo testemunha (grupo 5) sem alterações histológicas. **B**, grupo controle (grupo 6), com distribuição centroglobular da degeneração gordurosa acentuada dos hepatócitos. VCL: veia centro lobular. HE. (70X)

A homeostase do colesterol é muito importante para a prevenção de doenças cardiovasculares. Geralmente, as concentrações plasmáticas são reguladas pela biossíntese de colesterol, remoção do colesterol circulante, absorção do colesterol da dieta e de sua excreção pela bile e fezes (Lee et al., 2003).

Duas enzimas que estão diretamente envolvidas na regulação do metabolismo do colesterol são: a 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), enzima limitante na via da biossíntese do colesterol, e a acil coenzima A colesterol aciltransferase (ACAT), uma enzima que esterifica o colesterol nos tecidos incluindo o fígado e o intestino delgado, contribuindo com a secreção hepática de VLDL. Assim sendo, a redução da síntese de colesterol pela inibição da HMG-CoA redutase reduzirá o colesterol plasmático e uma redução na atividade da ACAT poderá diminuir a secreção de VLDL no fígado (Carr et al., 1992), isto poderá contribuir com uma menor incidência de doenças cardiovasculares devido à presença reduzida do colesterol esterificado nas lesões ateroscleróticas (Helgerud et al., 1981; Brown e Goldstein, 1986; Endo, 1992).

O fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de triacilgliceróis e colesterol, assim como pela síntese de lipoproteínas. Um desequilíbrio permanente entre o influxo de ácidos graxos, utilização e secreção de VLDL geram um acúmulo de triacilgliceróis e ésteres de colesterol nos hepatócitos que podem levar a esteatose hepática (Studenik, 2000). Isto foi constatado em nosso estudo, ao avaliarmos o tecido hepático do grupo que recebeu suplementação de colesterol.

A fisiopatologia da esteatose hepática ainda não é bem compreendida. Porém, a redução da formação de VLDL, principal rota de exportação de lipídios hepáticos, que é determinada pela síntese de apoB-100 pode ser um fator importante no desenvolvimento da esteatose (Charlton et al., 2002). Segundo Lonardo (1999), esta alteração hepática geralmente é manifestada por alterações do metabolismo da glicose, hiperlipidemia e hipertensão.

Recentemente, Björkgren et al. (2002) desenvolveram um estudo com camundongos com ausência da MTP no fígado. Eles observaram que a secreção de VLDL foi quase completamente bloqueada e esteve acompanhada de uma esteatose hepática moderada, mas com os camundongos aparentemente saudáveis.

Pesquisas atuais também têm demonstrado um forte envolvimento da apoE na regulação da secreção de VLDL em nível hepático (Kuipers et al., 1997; Mensenkamp et al., 1999; Huang et al., 1999; Maugeais et al., 2000). Segundo estudo realizado por Mensenkamp et al. (1999), camundongos

deficientes em apoE desenvolveram esteatose hepática e mostraram redução na secreção de VLDL.

De acordo com os resultados em nosso estudo, os fatores envolvidos no desenvolvimento da esteatose deverão ser melhor investigados, posteriormente, pois segundo Reihner et al. (1990), cobaias sintetizam e catabolizam taxas moderadas de colesterol hepático.

4.2 . Comparação dos níveis séricos de coelhos hiperlipidêmicos de acordo com a via de indução.

A determinação da via de administração de um fármaco é bastante importante, pois dependendo da forma como o medicamento é ministrado no organismo ele poderá ter uma ação mais ou menos eficiente. A própria forma de como o medicamento é preparado, pode influenciar na ação das substâncias. Existem diversas formas de se preparar e administrar fármacos, sejam eles na forma sólida ou líquida.

É importante lembrar ainda que, um fármaco pode ser farmacologicamente ativo por uma determinada via e tóxico por outra.

Com relação à análise dos constituintes sanguíneos deste ensaio, a tabela 7 nos mostra que o grupo hiperlipidêmico, tratado com colesterol e ácido cólico (grupo 2), elevou em 740,34% a concentração de colesterol no soro em relação ao grupo tratado apenas com ração (grupo 1), sendo este valor estatisticamente significativo pelo teste F ($P < 0,05$). Com relação aos grupos que receberam as substâncias em estudo, todos obtiveram uma redução considerável em relação ao grupo tratado com ração + colesterol + ácido cólico. O melhor resultado foi obtido com o grupo tratado com Kaempherol administrado pela via intraperitoneal, que apresentou uma redução de 55,78%. Os animais que receberam o corante monascus, também pela via intraperitoneal, obtiveram a menor redução (25,04%). Todos os tratamentos foram estatisticamente significativos quando comparados aos grupos-controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Em termos gerais, todos os animais tratados com flavonóides, pela via intraperitoneal, tiveram uma redução maior nas concentrações de colesterol em relação aos tratados pela via oral, já os animais tratados com os corantes bixina e monascus tiveram uma redução maior pela via oral, o que nos induz a pensar que os flavonóides agem de modo semelhante entre si no metabolismo lipídico e diferentemente dos corantes aqui testados.

As concentrações elevadas de colesterol total sangüíneo têm sido relacionadas ao aumento do número de partículas de LDL. O colesterol-LDL transporta o colesterol do fígado para os tecidos periféricos. Nos últimos anos, tem sido relatada a capacidade dos flavonóides de aumentarem a atividade dos receptores de LDL no hepatócito, aumentando a endocitose, e levando a uma redução nos níveis sangüíneos de colesterol total (Kirk et al., 1998).

De Whaley et al. (1990) relataram que os flavonóides foram capazes de inibir o processo oxidativo da partícula de LDL. Os flavonóides reagiriam com íons superóxidos, via transferência de um elétron para o radical peróxido. Portanto, essa ação dos flavonóides é explicada como uma das formas de proteção da oxidação do LDL e redução do colesterol da circulação.

As antocianinas pertencem à classe dos flavonóides e são utilizadas como corantes naturais. Tem sido demonstrado que essas substâncias foram capazes de reduzir as concentrações sangüíneas de colesterol total em ratos submetido à dieta com colesterol e colato de sódio (Igaraschi et al., 1990, Valente, 1998).

Tabela 7: Valores médios comparativos entre as vias de administração dos fármacos para o teor do colesterol total (\pm erro-padrão) no soro sanguíneo de coelhos, avaliados após trinta dias de tratamento e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração e ração + colesterol + ácido cólico (RCA).

Tratamentos	Colesterol total (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	RCA
1 – Ração (R)	132,33 \pm 15,07	-	
2 – RCA	1.112,02 \pm 382,43	+740,34 #	
3 - RCA + bixina (oral)	622,40 \pm 144,83 a	+370,34 *	-44,03 *
4 – RCA + bixina (intpr)	686,67 \pm 58,04 a	+418,91*	-38,25 *
5 – RCA + biochanina A (oral)	718,92 \pm 23,70 a	+443,28 *	-35,35 *
6 – RCA + biochanina A (intpr)	513,20 \pm 71,05 b	+316,12 *	-53,85 *
7 – RCA + Kaempherol (oral)	661,32 \pm 22,61 a	+399,75 *	-40,53 *
8 – RCA + Kaempherol (intpr)	491,74 \pm 75,96 b	+271,60 *	-55,78 *
9 – RCA + naringina (oral)	603,94 \pm 25,22 a	+356,39 *	-45,69 *
10 – RCA + naringina (intpr)	518,98 \pm 54,67 b	+292,19 *	-53,33 *
11 – RCA + antocianina (oral)	767,74 \pm 28,23 a	+480,17 *	-30,96 *
12 – RCA + antocianina (intpr)	634,63 \pm 34,58 b	+379,58 *	-42,93 *
13 – RCA + monascus (oral)	664,32 \pm 23,14 b	+402,02 *	-40,26 *
14 – RCA + monascus (intpr)	833,57 \pm 113,79 a	+529,92 *	-25,04 *

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

* Estatisticamente significativo dos grupos-controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Estatisticamente diferente do grupo-controle (ração) pelo teste F ($P < 0,05$).
(intpr) = intraperitoneal.

O aumento provocado pelo grupo que recebeu colesterol e ácido cólico sob o nível de colesterol-HDL foi de 476,04% em relação ao grupo controle tratado apenas com ração, sendo este valor não estatisticamente significativo pelo teste F ($P < 0,05$), como mostrado na tabela 8.

As altas concentrações de colesterol-HDL reduzem os riscos de cardiopatias coronárias. Seu efeito é oposto ao do colesterol-LDL. Nas populações em que são altas as concentrações tanto de LDL como de colesterol-HDL, os indivíduos com concentrações menores de HDL estão mais expostos a cardiopatias coronárias. As partículas de HDL facilitam o transporte de colesterol dos tecidos periféricos ao fígado para a sua excreção (Fuentes, 1998).

Com relação a esta informação, os grupos que apresentaram melhores resultados foram os tratados com bixina e os tratados com naringina, ambos pela via intraperitoneal, que aumentaram os índices de colesterol-HDL em relação ao grupo tratado com RCA, nos respectivos valores de 42,50% e 14,01%, de acordo com a tabela 8, sendo que estes valores não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) e são estatisticamente significativo em relação ao tratamento 2, pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Pode-se observar também na tabela 8 que todas as substâncias administradas pela via intraperitoneal aumentaram as concentrações do colesterol-HDL em relação ao grupo hiperlipidêmico, enquanto que a maioria das substâncias administradas pela via oral diminuiu as concentrações deste constituinte.

Pode-se deduzir que a via de administração interfere no mecanismo de ação das substâncias envolvidas neste estudo, sendo a intraperitoneal a via mais eficiente no tratamento de dislipidemias.

Tabela 8: Valores médios comparativos entre as vias de administração dos fármacos para o teor do Colesterol-HDL (\pm erro-padrão) no soro sanguíneo de coelhos, avaliados após trinta dias de tratamento e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração e ração + colesterol + ácido cólico.

Tratamentos	Colesterol-HDL (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	RCA
1 – Ração (R)	42,70 \pm 4,05		
2 – RCA	245,97 \pm 136,49	+476,04 #	
3 - RCA + bixina (oral)	217,86 \pm 8,71 b	+410,20 *	-11,43
4 – RCA + bixina (intpr)	350,51 \pm 13,34 a	+720,86 *	+42,50 *
5 – RCA + biochanina A (oral)	215,89 \pm 27,80 a	+405,59 *	-12,23
6 – RCA + biochanina A (intpr)	268,70 \pm 18,25 a	+529,27 *	+9,24
7 – RCA + Kaempherol (oral)	206,00 \pm 13,81 a	+382,43 *	-16,25 *
8 – RCA + Kaempherol (intpr)	267,05 \pm 22,96 a	+525,41 *	+8,57
9 – RCA + naringina (oral)	191,14 \pm 15,82 b	+347,64 *	-22,29 *
10 – RCA + naringina (intpr)	280,43 \pm 34,17 a	+556,75 *	+14,01 *
11 – RCA + antocianina (oral)	265,13 \pm 14,43 a	+520,92 *	+7,79
12 – RCA + antocianina (intpr)	256,55 \pm 22,28 a	+500,81 *	+4,30
13 – RCA + monascus (oral)	263,33 \pm 17,24 a	+516,71 *	+7,06
14 – RCA + monascus (intpr)	256,18 \pm 28,39 a	+499,95 *	+4,15

Médias Seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

* Estatisticamente diferente dos grupos-controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Estatisticamente diferente do grupo-controle (ração) pelo teste F ($P < 0,05$)

A tabela 9, por sua vez, nos mostra que o grupo controle tratado com colesterol e ácido cólico elevou em 251,34% o nível de triacilglicerol em relação

ao grupo tratado apenas com ração, sendo este valor estatisticamente significativo pelo teste F ($P < 0,05$). Em relação aos animais tratados com bixina obteve valor estatisticamente não significativo ao grupo tratado com RCA pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$), sendo que pela via oral foi verificada uma redução de 14,22% e pela via intraperitoneal um aumento de 12,60% em relação ao grupo hiperlipidêmico. Os outros tratamentos reduziram os níveis de triacilglicerol e os valores foram estatisticamente significativos ao tratamento 2 pelo teste de Tukey ($P > 0,05$), sendo que as maiores reduções foram àquelas obtidas pelo tratamento efetuado pela via intraperitoneal, com exceção ao grupo que recebeu o corante monascus.

Os melhores resultados foram observados nos tratamentos realizados pelo kaempherol e naringina, ambos pela via intraperitoneal, sendo os percentuais de variação em relação ao grupo tratado com RCA iguais a 57,54% e 56,5%, respectivamente.

Os efeitos hipolipidêmicos de flavonóides sobre triacilgliceróis podem ser explicados, em parte, pelo aumento da atividade de lipases, provocada pelos flavonóides. Lima (1999) relata os efeitos dos flavonóides morina, naringina, naringenina e rutina, aumentando a atividade da enzima lipase. A lipase hidrolisa os triacilgliceróis, portanto, essa atividade é importante, pois promoverá maior mobilização dos ácidos graxos sanguíneos para o fígado, o tecido muscular e o tecido adiposo.

Tabela 9: Valores médios comparativos entre as vias de administração dos fármacos para o teor de triacilglicerol (\pm erro-padrão) no soro sanguíneo de coelhos, avaliados após trinta dias de tratamento e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração e ração + colesterol + ácido cólico.

Tratamentos	Triacilglicerol (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	RCA
1 – Ração (R)	87,95 \pm 12,68		
2 – RCA	309,00 \pm 0,69	+251,34 #	
3 - RCA + bixina (oral)	265,06 \pm 29,21 b	+211,18 *	-14,22
4 – RCA + bixina (intpr)	347,93 \pm 27,37 a	+295,60 *	+12,60
5 – RCA + biochanina A (oral)	168,87 \pm 50,20 cd	+92,00 *	-45,35 *
6 – RCA + biochanina A (intpr)	161,02 \pm 68,25 cd	+83,08 *	-47,89 *
7 – RCA + Kaempherol (oral)	167,20 \pm 40,31 cd	+90,11 *	-45,89 *
8 – RCA + Kaempherol (intpr)	131,20 \pm 33,06 c	+49,18	-57,54 *
9 – RCA + naringina (oral)	164,33 \pm 42,82 cd	+86,84 *	-46,82 *
10 – RCA + naringina (intpr)	134,42 \pm 34,37 d	+52,83	-56,50 *
11 – RCA + antocianina (oral)	216,52 \pm 41,73 bc	+146,18 *	-29,93 *
12 – RCA + antocianina (intpr)	194,30 \pm 48,78 c	+120,92 *	-37,12 *
13 – RCA + monascus (oral)	168,03 \pm 47,24 b	+91,06 *	-45,62 *
14 – RCA + monascus (intpr)	196,62 \pm 57,59 c	+123,55*	-36,37 *

Médias Seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

* Estatisticamente diferente dos grupos-controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Estatisticamente diferente do grupo-controle (ração) pelo teste F ($P < 0,05$)

Pelos resultados apresentados, a via intraperitoneal mostrou-se mais eficiente para tratamento com flavonóides, mas na prática esta via tem o inconveniente de ser mais dolorosa e stressante ao animal, o que muitas vezes

inviabiliza a sua utilização, sendo que estas substâncias deverão ser administradas diariamente.

Em se tratando de corantes, como a bixina e o monascus, a via na qual obtiveram-se melhores resultados para estas substâncias foi à via oral, sendo esta mais prática e menos penosa ao animal.

Segundo Lüllmann et al. (2000) as drogas ministradas através da via subcutânea ou intraperitoneal, são mais rapidamente absorvidas pela corrente sanguínea do que pela via oral, mas são eliminadas mais rapidamente, enquanto que as drogas ministradas por via oral, são absorvidas lentamente, permanecendo mais tempo na corrente sanguínea, sofrem mais modificações e enfrentam mais barreiras.

Pela praticidade e pelos resultados aqui apresentados, optou-se por administrar as substâncias a serem testadas, pela via oral, nos outros experimentos.

4.3 . Comparação entre doses de alguns flavonóides no metabolismo lipídico de coelhos.

O experimento foi realizado com um delineamento inteiramente casualizado, formando-se 18 grupos como descritos em materiais e métodos, contendo cinco animais em cada um (cinco repetições), avaliados as concentrações sorológicas dos constituintes bioquímicos após 28 dias de tratamento.

Os tratamentos foram constituídos por dois grupos controles, sendo os animais de um dos grupos alimentados só com ração e os animais do outro grupo com ração + colesterol + ácido cólico (RCA), e por outros animais em 16 grupos que receberam as seguintes substâncias: quercetina, rutina, morina e naringenina, nas doses de 5 mg, 10 mg, 15 mg e 30 mg.

Os resultados obtidos, para colesterol total, colesterol-HDL e triacilglicerol, no soro sanguíneo de coelhos, da raça Nova Zelândia, hipercolesterolêmicos, são apresentados nas tabelas 10, 11 e 12, expressos em mg/dL, com suas respectivas porcentagens de variações.

Tabela 10: Valores médios do colesterol total (\pm erro-padrão) no soro sanguíneo de coelhos, avaliados aos 28 dias e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração (R) e ração + colesterol + ácido cólico (RCA).

Tratamentos	Colesterol (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	RCA
1 – Ração	115,47 \pm 15,07	-	
2 – RCA	950,05 \pm 382,43	+722,77 #	
3 – RCA + quercetina 5mg	414,03 \pm 39,04 d	+258,56 *	-56,42 *
4 – RCA + quercetina 10mg	494,22 \pm 44,95 cd	+328,01 *	-47,98 *
5 – RCA + quercetina 15mg	540,48 \pm 66,96 c	+368,07 *	-43,11 *
6 – RCA + quercetina 30mg	661,80 \pm 48,70 ab	+473,13 *	-30,34 *
7 – RCA + rutina 5mg	427,52 \pm 46,97 d	+270,24 *	-55,00 *
8 – RCA + rutina 10mg	485,57 \pm 50,98 cd	+320,52 *	-48,89 *
9 – RCA + rutina 15mg	602,90 \pm 59,59 b	+422,13 *	-36,54 *
10 – RCA + rutina 30mg	740,94 \pm 58,41 a	+541,67 *	-22,01 *
11 – RCA + morina 5mg	531,74 \pm 47,80 c	+360,50 *	-44,03 *
12 – RCA + morina 10mg	551,98 \pm 14,72 c	+378,03 *	-41,90 *
13 – RCA + morina 15mg	529,56 \pm 48,18 c	+358,61 *	-44,26 *
14 – RCA + morina 30mg	769,25 \pm 52,72 a	+566,19 *	-19,03
15 – RCA + naringenina 5mg	586,18 \pm 37,46 c	+407,65 *	-38,30 *
16 – RCA + naringenina 10mg	436,64 \pm 35,93 d	+278,14 *	-54,04 *
17 – RCA + naringenina 15mg	653,25 \pm 42,75 ab	+465,73 *	-31,24 *
18 – RCA + naringenina 30mg	731,82 \pm 55,43 a	+533,78 *	-22,97 *

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

* Teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Teste F ($P < 0,05$)

De acordo com os resultados obtidos na tabela 10, o índice de colesterol no grupo 2 (ração + colesterol + ácido cólico) teve um aumento de 722,77% em comparação com o grupo controle que recebeu apenas ração, sendo este valor estatisticamente significativo pelo teste F.

Todos os tratamentos reduziram as concentrações de colesterol em relação ao grupo RCA, sendo estes resultados estatisticamente significativos do

referido grupo pelo teste de Dunnett, com exceção do tratamento com morina a 30 mg.

Os melhores resultados, mostrados na tabela 10, foram obtidos com as dosagens de 5 e 10 mg, sendo que as médias destes tratamentos não foram estatisticamente significativos pelo teste Tukey, com exceção do tratamento realizado com a naringenina, no qual obteve-se uma melhor redução na dosagem de 10 mg.

As melhores reduções conseguidas em relação ao grupo RCA foram observadas nos tratamentos com quercetina e rutina na dose de 5 mg e naringenina na dose de 10 mg, sendo estas variações de 56,42%, 55,00% e 54,04%, respectivamente, sendo estatisticamente significativo em relação ao tratamento 2 pelo teste de Dunnett e as médias entre os tratamentos não foram estatisticamente significativos pelo teste de Tukey (tabela 10).

Tabela 11: Valores médios de triacilgliceróis (\pm erro-padrão) no soro sangüíneo de coelhos, avaliados aos 28 dias e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração (R) e ração + colesterol + ácido cólico (RCA).

Tratamentos	Triacilgliceróis (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	RCA
1 – Ração	64,70 \pm 12,68		
2 – RCA	184,01 \pm 0,69	+184,40 #	
3 – RCA + quercetina 5mg	178,66 \pm 8,41 a	+176,13 *	-2,91
4 – RCA + quercetina 10mg	41,38 \pm 2,65 d	-36,04	-77,51*
5 – RCA + quercetina 15mg	175,71 \pm 3,88 a	+171,58 *	-4,51
6 – RCA + quercetina 30mg	103,76 \pm 5,32c	+60,38 *	-43,61*
7 – RCA + rutina 5mg	137,14 \pm 3,67 b	+111,96 *	-25,47*
8 – RCA + rutina 10mg	148,16 \pm 5,56 b	+129,00 *	-19,48*
9 – RCA + rutina 15mg	181,89 \pm 6,51 a	+181,13 *	-1,15
10 – RCA + rutina 30mg	94,05 \pm 4,74 c	+45,36	-48,89*
11 – RCA + morina 5mg	127,33 \pm 3,98 bc	+96,81 *	-30,80*
12 – RCA + morina 10mg	172,05 \pm 6,50 a	+165,92 *	-6,50
13 – RCA + morina 15mg	154,35 \pm 6,12 b	+138,56 *	-16,12
14 – RCA + morina 30mg	92,06 \pm 4,96 c	+42,29	-49,97*
15 – RCA + naringenina 5mg	168,87 \pm 8,23 a	+161,00 *	-8,23
16 – RCA + naringenina 10mg	138,82 \pm 4,56 b	+114,55 *	-24,56*
17 – RCA + naringenina 15mg	181,43 \pm 4,56 a	+180,42 *	-1,40
18 – RCA + naringenina 30mg	104,26 \pm 4,58 c	+61,14 *	-43,34*

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

* Teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Teste F ($P < 0,05$)

A tabelal 11 mostra um aumento de 184,40% na concentração de triacilgliceróis no grupo controle tratado com ração + colesterol + ácido cólico, em relação ao tratado apenas com ração, sendo este valor estatisticamente significativo pelo teste F. Houve redução em todos os tratamentos em comparação com o grupo controle (ração + colesterol + ácido cólico), mas os grupos 3, 5, 9, 12, 13, 15 e 17 tratados com quercetina 5 e 15 mg, rutina 15 mg,

morina 10 e 15 mg e naringenina 5 e 15 mg, respectivamente, tiveram seus valores obtidos não estatisticamente significativos se comparados com o grupo controle RCA pelo teste de Dunnett. Os tratamentos que diferiram deste controle em relação ao teste de Dunnett foram o da quercetina 10 mg (-77,51%), quercetina 30 mg (-43,61%), rutina 5 mg (-25,47%), rutina 10 mg (-19,48%), rutina 30 mg (-48,89%), morina 5 mg (-30,80%), morina 30 mg (-49,97%), naringenina 10 mg (-24,56%) e naringenina 30 mg (-43,34%). O melhor tratamento encontrado para este constituinte sanguíneo foi o com quercetina a 10 mg, sendo que esta redução abaixou a concentração de triacilglicerol destes animais a valores estatisticamente iguais ao grupo alimentado apenas por ração, pelo teste de Dunnett.

Tabela 12: Valores médios de colesterol-HDL (\pm erro-padrão) no soro sanguíneo de coelhos, avaliados aos 28 dias e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração (R) e ração + colesterol + ácido cólico (RCA).

Tratamentos	Colesterol-HDL (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	RCA
1 – Ração (R)	30,75 \pm 11,74		
2 – RCA	180,44 \pm 60,70	+486,81	
3 – RCA + quercetina 5mg	74,63 \pm 36,44 d	+142,70 *	-58,64*
4 – RCA + quercetina 10mg	74,99 \pm 49,45 d	+143,87 *	-58,44*
5 – RCA + quercetina 15mg	166,04 \pm 38,36 b	+439,97 *	-7,98
6 – RCA + quercetina 30mg	165,01 \pm 24,50 b	+436,63 *	-8,55
7 – RCA + rutina 5mg	135,29 \pm 31,47 c	+339,98 *	-25,02*
8 – RCA + rutina 10mg	139,44 \pm 37,88 c	+353,48 *	-22,72*
9 – RCA + rutina 15mg	117,47 \pm 22,79 c	+282,00 *	-34,90*
10 – RCA + rutina 30mg	167,61 \pm 20,81 b	+445,07 *	-7,11
11 – RCA + morina 5mg	110,77 \pm 32,90 c	+260,23 *	-38,61*
12 – RCA + morina 10mg	199,91 \pm 55,79 a	+550,11 *	+10,79
13 – RCA + morina 15mg	196,68 \pm 53,00 a	+539,61 *	+9,00
14 – RCA + morina 30mg	141,46 \pm 34,22 bc	+360,05 *	-21,6*
15 – RCA + naringenina 5mg	118,08 \pm 28,56 c	+284,00 *	-34,56*
16 – RCA + naringenina 10mg	170,21 \pm 45,67 b	+453,52 *	-5,67
17 – RCA + naringenina 15mg	160,39 \pm 42,11 b	+421,60 *	-11,11
18 – RCA + naringenina 30mg	174,09 \pm 41,43 b	+466,14 *	-3,52

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

* Teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Teste F ($P < 0,05$)

Já a concentração de colesterol-HDL do grupo tratado com ração + colesterol + ácido cólico, teve um aumento de 486,81% em relação ao grupo 1, de acordo com a tabela 12. As médias obtidas pelos tratamentos com as substâncias quercetina nas dosagens de 5 e 10mg, rutina 5, 10 e 15mg, morina 5 e 30mg e naringenina a 5 mg são estatisticamente significativas em relação ao controle hiperlipidêmico pelo teste de Dunnett, sendo o aumento significativo se compararmos com o grupo 1 (ração), pelo teste de Dunnett.

As LDL resultantes das VLDL transportam colesterol do fígado para os tecidos e uma pequena parte retorna ao fígado. As HDL desempenham o papel contrário, pois transportam o colesterol dos tecidos para o fígado, promovendo desta forma uma homeostase nas taxas de colesterol sanguíneas (Bevilacqua et al., 1998).

Em se tratando do colesterol-HDL, os melhores resultados são aqueles nos quais obteve-se os maiores aumentos possíveis. Frente a isto, o melhor efeito foi conseguido pelo tratamento com a morina nas dosagens de 10 e 15 mg, obtendo-se um aumento de 10,79% e 9,00%, respectivamente, em relação ao grupo 2, sendo que as médias destes tratamentos não são estatisticamente significativas entre si pelo teste de Tukey.

Um bom resultado também, foi conseguido nos tratamentos com quercetina nas dosagens de 15 e 30mg, rutina 30mg e naringenina a 10, 15 e 30mg, tendo-se aumentos de 439,97%, 436,63%, 445,07%, 453,52%, 421,60% e 466,14%, respectivamente, em relação ao grupo controle alimentado apenas com ração, sendo estes valores estatisticamente significativos em relação a este grupo pelo teste de Dunnett e as médias dos níveis do Colesterol-HDL sorológico, não foram estatisticamente significativas pelo teste de Tukey.

Estes valores mostram que para cada dose há uma resposta diferente em relação aos diferentes constituintes, mas de modo geral, a dosagem de 10 mg mostrou ser a dose que apresenta um melhor efeito nos diferentes constituintes aqui estudados.

Koshy e Vijayalakshmi (2001) citam a atividade hipolipidêmica dos flavonóides de *Garcinia cambogia* numa administração a 10 mg/kg/dia. Estes autores alertam ainda para um possível efeito tóxico destes flavonóides caso as dosagens sejam muito altas.

Para explicar o mecanismo de ação de alguns flavonóides, pesquisadores têm demonstrado diversos dos seus efeitos biológicos.

Tem-se verificado que os flavonóides são hábeis em inibir as enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico, tais como lipoxigenase e ciclooxigenase (Gryglewski et al. (1987), De Whalley et al. (1990) e Laughon et al. (1991)). O ácido araquidônico é um ácido graxo insaturado que serve como precursor de prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos. Todos estes são potentes mediadores no controle de uma série de processos

inflamatórios no corpo e em diversas patologias. Nos passos da formação desses compostos, o intermediário prostaglandina (G₂) e prostaglandina endoperóxido (PGG₂) é formado pela ação da enzima prostaglandina-endoperóxido sintetase, um complexo enzimático contendo ciclooxygenase e peroxidase. A ciclooxygenase produz PGG₂, tendo como substrato o ácido araquidônico e a peroxidase produz PGH₂ a partir de PGG₂. Durante a atividade da peroxidase, radicais orgânicos livres são produzidos, os quais originam a formação de intermediários de oxigênio reativo e a peroxidação lipídica patológica.

As ações biológicas de flavonóides em células de mamíferos vêm sendo pesquisadas. Muitos deles possuem atividade antioxidante, antialérgica e anti-hemorrágica. Eles também inibem diversas enzimas como as fosfolipases, ciclooxygenase, lipoxigenase, peroxidase e aldose redutase (Goker et al., 1995 e Fourie et al., 1984).

Kellis e Vickery (1984), mostram também o efeito de flavonóides sobre enzimas, tais como estrogênio sintetase citocromo P-450 que catalisa a conversão de androgênio para estrogênio. Diversos flavonóides têm ação inibidora sobre a aromatização da androstenediona para estrona e de testosterona para estradiol. Segundo estes pesquisadores, os flavonóides podem competir com os esteróides e sua interação com certas monoxigenases alteram o metabolismo dos hormônios esteroidais. Esta ação é importante, visto que os glicocorticóides aumentam a taxa de mobilidade de gordura pelo aumento da permeabilidade da membrana celular.

Isoflavonóides e ou flavonóides podem conter estrógenos endógenos através da ligação competitiva com receptores de estrógenos. A afinidade relativa desses compostos com o receptor de estrógeno é 0,05-1% da afinidade de ligação do 17- β -estradiol (Birt, 2001).

4.4 . Comparação entre os efeitos da aplicação de 10 mg de flavonóides e corantes no metabolismo lipídico de coelhos hiperlipidêmicos.

Nas tabelas 13, 14 e 15, estão representadas as médias relativas as concentrações de colesterol, colesterol-HDL, triacilglicerol e glicose, avaliadas no soro dos coelhos hiperlipidêmico, que receberam os flavonóides baicaleína, morina, naringenina, naringina, quercetina, rutina, crisina, luteolina e apigenina, os corantes naturais do urucum norbixina e bixina e o medicamento comercial hipolipidêmico colestiramina, após 30 dias de tratamento, comparando-os com as concentrações dos controles e entre si.

Tabela 13: Valores médios do colesterol total (\pm erro-padrão) no soro sanguíneo de coelhos, avaliados aos 30 dias e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração (R) e ração + colesterol + ácido cólico (RCA).

Tratamentos	Colesterol (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	RCA
1 – Ração (R)	115,47 \pm 15,07	-	
2 – RCA	950,05 \pm 382,43	+722,77 #	
3 – RCA + baicaleína	518,54 \pm 58,04 b	+349,07 *	-45,42 *
4 – RCA + morina	551,98 \pm 14,72 b	+378,03 *	-41,90 *
5 – RCA + naringenina	436,64 \pm 35,93 c	+278,14 *	-54,04 *
6 – RCA + naringina	482,05 \pm 59,84 c	+317,47 *	-49,26 *
7 – RCA + quercetina	494,22 \pm 44,95 c	+328,01 *	-47,98 *
8 – RCA + rutina	485,57 \pm 50,98 c	+320,52 *	-48,89 *
9 – RCA + crisina	422,20 \pm 78,86 c	+265,64 *	-55,56 *
10 – RCA + luteolina	450,42 \pm 41,29 c	+290,07 *	-52,59 *
11 – RCA + apigenina	476,16 \pm 21,67 c	+312,37 *	-49,88 *
12 – RCA + norbixina	709,21 \pm 195,54 a	+514,20 *	-25,35 *
13 – RCA + bixina	531,74 \pm 144,83 b	+460,50 *	-44,03 *
14 – RCA + colestiramina	760,99 \pm 320,47 a	+559,04 *	-19,90 *

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

* Teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Teste F ($P < 0,05$)

De acordo com a tabela 13, houve um aumento de 722,77% de colesterol do grupo 2 em relação ao grupo 1, sendo este valor estatisticamente significativo pelo teste (F). Os grupos tratados com as substâncias em estudos foram estatisticamente significativos em relação ao grupo 1 pelo teste de Dunnett.

Observou-se que todos os tratamentos reduziram as concentrações de colesterol, sendo os valores estatisticamente significativos em relação ao grupo controle hipercolesterolêmico pelo teste de Dunnett. As melhores reduções foram observadas nos tratamentos que receberam as substâncias naringenina,

54,04%, naringina, 49,26%, quercetina, 49,78%, rutina, 48,89%, crisina, 55,56%, luteolina, 52,58% e apigenina, 49,88%, uma vez que estas médias não são estatisticamente significativas entre si pelo teste de Tukey.

Todos os flavonóides estudados e o corante bixina reduziram as concentrações de colesterol a valores inferiores ao do medicamento colestiramina e suas médias foram estatisticamente significativas em relação a médias deste medicamento, pelo teste de Tukey.

Segundo Anila e Vijayalakshmi (2002), os flavonóides promovem uma redução no colesterol sanguíneo por promoverem uma redução na atividade da HMGCoA-redutase, um incremento na degradação e no consumo do colesterol e uma inibição na colesterogênese. Alguns estudos citam ainda a propriedade dos flavonóides de promover um decréscimo na atividade da hidroximetilglutaril-CoA redutase e do esterol *o*-aciltransferase, duas enzimas chaves para o metabolismo do colesterol (Kurowska et al., 2000).

De acordo com Best e Jenkins et al. (2001), a ênfase futura para a correção de anormalidades lipídicas, com decréscimo de desordens cardiovasculares, serão preferencialmente focadas na redução do LDL-colesterol, por meio de substâncias naturais, como os flavonóides e seus derivados.

O mecanismo de ação dos flavonóides na redução do LDL-colesterol foi postulado por Wilcox et al. (2001). De acordo com os autores, os flavonóides promovem um decréscimo na secreção de apo B, devido a uma redução da atividade e expressão da enzima acil-CoA colesterol acil transferase. E ainda que, os flavonóides reduzem a atividade e expressão da proteína de transferência de triacilgliceróis microsomais, promovendo um aumento na expressão dos receptores para LDL, o que resulta em um acréscimo na recaptção e degradação da LDL-colesterol. Tais eventos proporcionam uma redução na biodisponibilidade de lipídeos que contém a proteína apoB em sua estrutura.

Tabela 14: Valores médios do colesterol-HDL (\pm erro-padrão) no soro sangüíneo de coelhos, avaliados aos 30 dias e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração (R) e ração + colesterol + ácido cólico (RCA).

Tratamentos	Colesterol-HDL (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	RCA
1 – Ração (R)	30,75 \pm 11,74		
2 – RCA	180,44 \pm 60,70	+486,81	
3 – RCA + baicaleína	400,96 \pm 13,34 b	+1203,92 *	+122,21 *
4 – RCA + morina	199,91 \pm 55,79 d	+550,11 *	+10,79
5 – RCA + naringenina	170,21 \pm 45,67 e	+453,52 *	-5,67
6 – RCA + naringina	150,05 \pm 8,64 e	+387,98 *	-16,84
7 – RCA + quercetina	74,99 \pm 49,45 g	+143,87 *	-58,44 *
8 – RCA + rutina	139,44 \pm 37,88 f	+353,48 *	-22,72 *
9 – RCA + crisina	76,70 \pm 3,96 g	+149,45 *	-57,49 *
10 – RCA + luteolina	218,58 \pm 13,80 cd	+610,85 *	+21,14
11 – RCA + apigenina	688,61 \pm 1,82 a	+2139,39 *	+281,63 *
12 – RCA + norbixina	152,98 \pm 21,84 e	+397,49 *	-15,22
13 – RCA + bixina	159,82 \pm 8,71 e	+419,73 *	-11,43
14 – RCA + colestiramina	247,67 \pm 57,45 c	+705,44 *	+37,26 *

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

* Teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Teste F ($P < 0,05$)

Observou-se um aumento nas taxas de HDL-colesterol para o grupo controle hipercolesterolêmico em relação ao grupo controle ração, de 486,81%, de acordo com a tabela 14. Este resultado é significativo. Tais resultados refletem em segunda instância, um aumento nas concentrações de colesterol total, acompanhado de suas frações lipídicas.

Em relação aos flavonóides testados, observou-se que a apigenina, a baicaleína, o medicamento colestiramina, luteolina e morina, tiveram um efeito hipercolesterolêmico para esta fração lipídica do colesterol, que foram de 281,63%, 122,21%, 37,26%, 21,14% e 10,79%, respectivamente, sendo os

efeitos dos dois primeiros e da colestiramina foram estatisticamente significativos em relação ao grupo RCA pelo teste de Dunnett.

Os flavonóides naringina e naringenina e os corantes naturais bixina e norbixina tiveram efeitos hipolipidêmicos discretos, sendo que os níveis de redução em comparação com o grupo controle hiperlipidêmico foram de 5,67%, 16,84%, 15,22% e 11,43%, respectivamente, sendo que estes valores não foram estatisticamente significativos em relação ao grupo controle mencionado pelo teste de Dunnett.

Já os efeitos hipolipidêmicos apresentados pelos flavonóides quercetina, 58,44%, crisina, 57,49%, e rutina, 22,72%, foram mais acentuados e estatisticamente significativos em relação ao grupo controle hiperlipidêmico pelo teste de Dunnett.

O efeito hipolipidêmico destes compostos evidencia seus efeitos nas reduções das taxas de colesterol total. Tais compostos reduzindo as concentrações de colesterol total sanguíneo, conseqüentemente reduzem os níveis de HDL-colesterol, uma de suas frações lipídicas.

Estudos epidemiológicos tem estabelecido que uma baixa concentração de HDL-colesterol no plasma sanguíneo é um fator de risco independente para desordens coronárias. Uma baixa concentração nas taxas de HDL é uma anormalidade lipídica comum observada em pacientes com desordens coronárias. O "Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Trial", tornou verídica a hipótese de que uma alta concentração de HDL-colesterol poderia reduzir o risco de desordens coronárias e a mortalidade em pacientes com anormalidades lipídicas (Brousseau e Schaefer, 2001).

Tabela 15: Valores médios do triacilglicerol (\pm erro-padrão) no soro sangüíneo de coelhos, avaliados aos 30 dias e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração (R) e ração + colesterol + ácido cólico (RCA).

Tratamentos	Triacilglicerol (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	RCA
1 – Ração (R)	64,70 \pm 12,68		
2 – RCA	184,01 \pm 0,69	+184,40 #	
3 – RCA + baicaleína	27,88 \pm 22,11 f	-56,91 *	-84,85 *
4 – RCA + morina	172,05 \pm 6,50 b	+165,92 *	-6,50
5 – RCA + naringenina	138,82 \pm 4,56 d	+114,55 *	-24,56 *
6 – RCA + naringina	176,91 \pm 27,37 b	+173,43 *	-3,86
7 – RCA + quercetina	41,38 \pm 2,65 e	-36,04	-77,51 *
8 – RCA + rutina	148,16 \pm 5,56 c	+129,00 *	-19,48 *
9 – RCA + crisina	73,73 \pm 15,64 e	+13,96	-59,93 *
10 – RCA + luteolina	187,51 \pm 51,83 a	+189,81 *	+1,90
11 – RCA + apigenina	194,33 \pm 10,93 a	+200,36 *	+5,61
12 – RCA + norbixina	201,67 \pm 25,22 a	+211,71 *	+9,60
13 – RCA + bixina	157,84 \pm 29,21 c	+143,96 *	-14,22
14 – RCA + colestiramina	152,21 \pm 35,66 c	+135,26 *	-17,28

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

* Teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Teste F ($P < 0,05$)

Analisando a tabela 15, observou-se que os grupos tratados com baicaleína (3), quercetina (7), crisina (9), naringenina (5), e rutina (8), obtiveram uma redução significativa na concentração de triacilglicerol quando comparado com o grupo 2, pelo teste de Dunnett, sendo estes valores de -84,85%, -77,51%, -59,93%, -24,26%, e -19,48%, respectivamente.

Os melhores efeitos observados na redução dos triacilgliceróis plasmáticos foram conseguidos pelos flavonóides baicaleína, quercetina e crisina. A baicaleína e a rutina diminuíram os níveis de triacilglicerol a valores inferiores ao do grupo controle alimentado apenas com ração, sendo que os

valores conseguidos pela baicaleína (-56,91%) foram estatisticamente significativos em relação a este grupo controle pelo teste de Dunnett.

A maior parte dos flavonóides estudados tiveram um melhor efeito sobre o triacilglicerol do que o medicamento colestiramina e apresentaram a vantagem de não produzirem efeitos tóxicos nas concentrações estudadas.

Diversos experimentos com a utilização de flavonóides tem mostrado um efeito hipotrigliceridêmico. Uma das possíveis explicações para este fato tem sido um aumento na atividade da lipase. Esta enzima hidrolisa os triacilgliceróis ocasionando uma maior mobilização dos ácidos graxos sanguíneos para o fígado, tecido muscular e tecido adiposo (Lima, 1999).

4.4.1 . Análise histopatológica

Na análise histopatológica dos grupos tratados com os flavonóides naringina, rutina e baicaleína não foram observadas diferenças histopatológicas significativas em relação ao grupo hiperlipidêmico, ou seja, todos os grupos que receberam flavonóides também apresentaram vacúolos, de forma acentuada, nos hepatócitos. Porém, os vacúolos do grupo controle apresentaram uma distribuição centrolobular, enquanto que os grupos tratados apresentaram uma distribuição centrolobular e em direção a periferia do lóbulo (Figura 26).

Os cortes da artéria aorta dos animais não apresentaram nenhuma alteração histológica, quando comparados com o grupo testemunha.

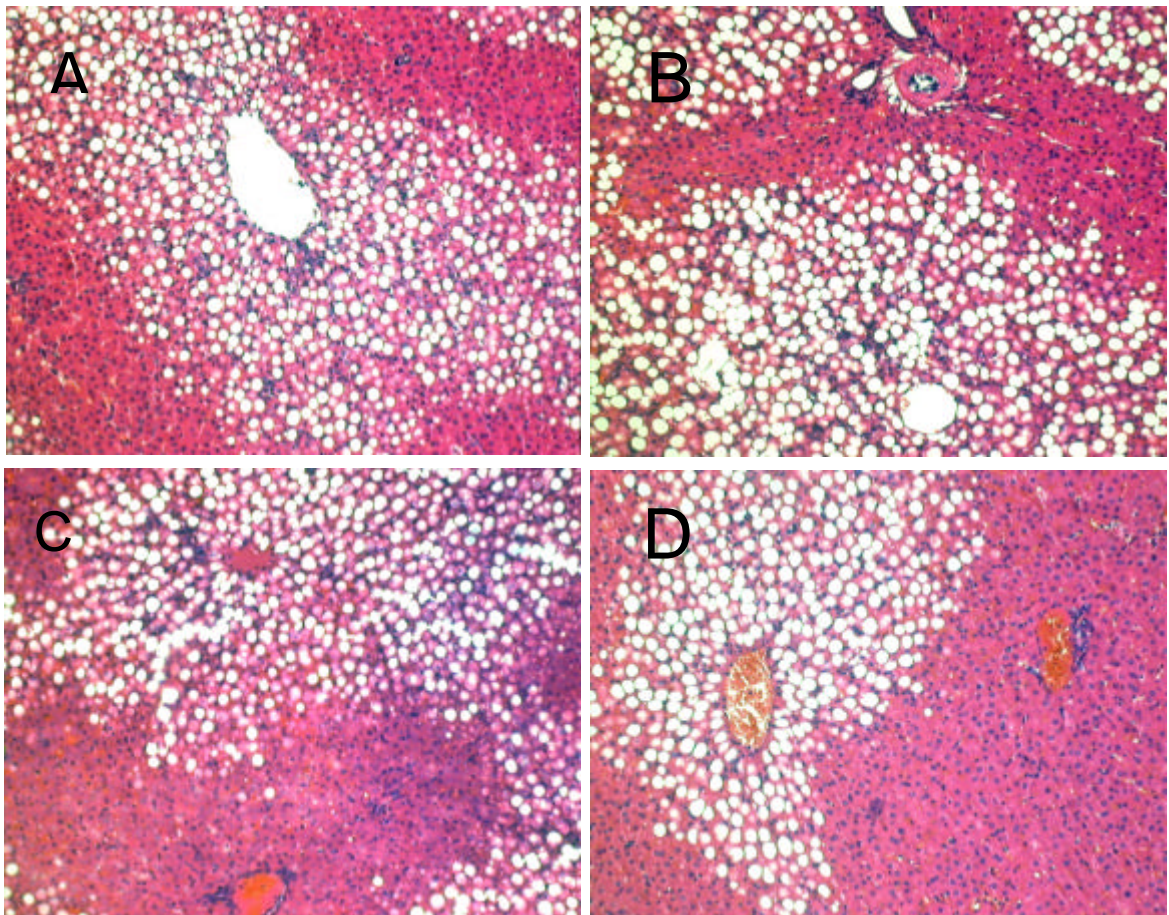


Figura 26 – Histologia do fígado de coelhos após trinta dias de experimentação. **A**, grupo 2 (ração, colesterol e ácido cólico). **B**, grupo 6 (naringina). **C**, grupo 8 (rutina). **D**, grupo 3 (baicaleína). (70X). HE.

Os cortes da parede do arco aórtico dos animais tratados não apresentaram alteração histológica, quando comparados com o grupo testemunha.

4.5 . Efeito de modificadores químicos sobre a atividade de lipase.

Este experimento não foi instalado seguindo um delineamento experimental, sendo cada amostra constituída por três repetições. Assim, não foi possível proceder à análise de variância dos dados de atividade enzimática, procedendo-se a dispersão dos mesmos.

De posse da dispersão, não foi possível ajustar equações de regressão, tendo como variável dependente à atividade enzimática e independente, a concentração do modificador.

Estes dados não permitem ainda a realização do teste de média, uma vez que as concentrações utilizadas do modificador são tratamentos quantitativos.

Os resultados obtidos na determinação da atividade de lipase em presença dos corantes (bixina e norbixina) e dos flavonóides (apigenina e luteolina) extraídos do urucum, encontram-se apresentados na tabela 16 e na figuras 27.

Tabela 16: Atividade de lipase em presença dos modificadores apigenina, bixina, luteolina e norbixina.

Concentração do modificador [M]	Apigenina (UI)	Luteolina (UI)	Bixina a 95% (UI)	Norbixina (UI)
0	27,50 ± 0,96	27,50 ± 0,96	27,50 ± 0,96	27,50 ± 0,96
0,6 x 10 ⁻⁵	23,09 ± 2,38	23,38 ± 0,27	28,76 ± 1,70	24,81 ± 2,76
1,2 x 10 ⁻⁵	26,98 ± 2,79	28,36 ± 2,21	24,82 ± 0,55	27,97 ± 1,20
1,8 x 10 ⁻⁵	29,54 ± 8,69	25,19 ± 5,07	29,08 ± 6,67	28,11 ± 4,26
2,4 x 10 ⁻⁵	26,60 ± 2,27	29,99 ± 1,02	38,83 ± 1,34	33,37 ± 1,39
3,0 x 10 ⁻⁵	29,85 ± 3,48	34,56 ± 6,32	31,12 ± 1,63	29,02 ± 2,53
3,6 x 10 ⁻⁵	20,77 ± 0,35	27,93 ± 0,72	25,69 ± 1,86	30,81 ± 6,71
4,2 x 10 ⁻⁵	30,81 ± 5,23	30,86 ± 0,25	26,34 ± 0,95	23,46 ± 0,29
4,8 x 10 ⁻⁵	32,97 ± 5,27	67,37 ± 6,06	41,46 ± 2,99	38,80 ± 9,13
5,4 x 10 ⁻⁵	39,36 ± 3,46	45,54 ± 2,78	67,40 ± 10,24	47,05 ± 3,65
6,0 x 10 ⁻⁵	25,56 ± 1,06	50,73 ± 12,18	57,23 ± 18,03	23,15 ± 4,45

Média ± erro-padrão.

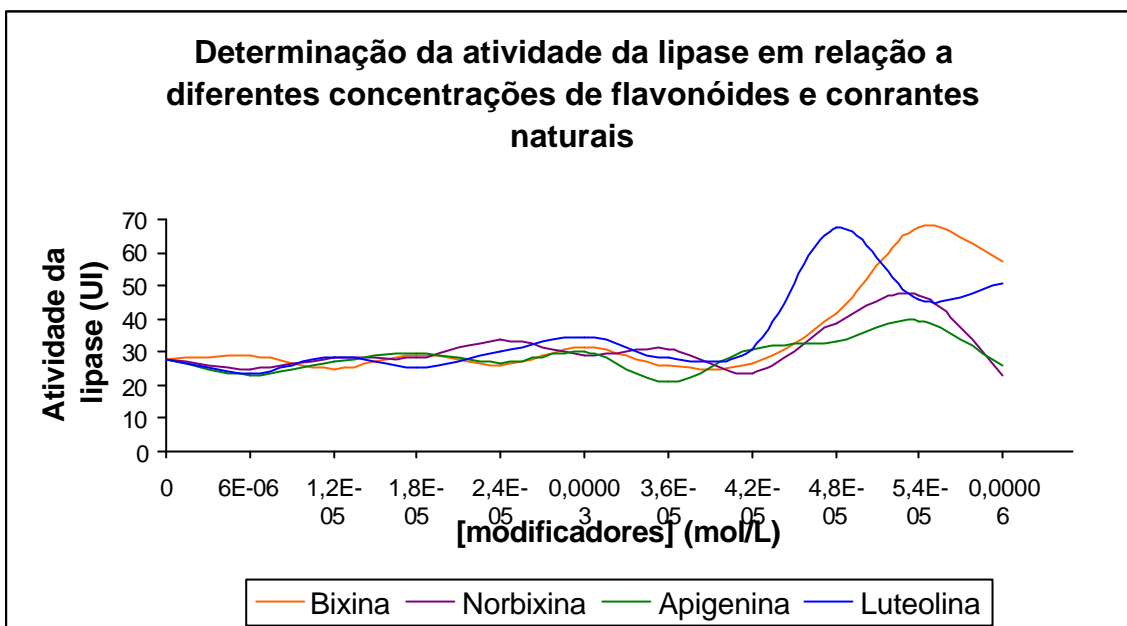


Figura 27 - Determinação da atividade da lipase na presença de várias concentrações de modificadores.

De acordo com a tabela 16 e a figura 27, observou-se que o melhor resultado apresentado pela apigenina foi obtido com uma concentração de $5,4 \times 10^{-5}$ mol/L, sendo esta atividade de 39,36 UI, o que proporciona um aumento de 43,13%.

A melhor ativação para a bixina foi de 67,40 UI, na concentração de $5,4 \times 10^{-5}$ mol/L, obtendo-se uma porcentagem de ativação de 145% em relação ao experimento controle, que não recebeu a substância.

Já para a luteolina, a concentração na qual obteve-se um melhor resultado foi a de $4,8 \times 10^{-5}$ mol/L, sendo esta ativação de 67,37 UI, ou seja, um aumento de 145%.

A norbixina por sua vez, apresenta-se com uma atividade de 47,05 UI, na concentração de $5,4 \times 10^{-5}$ mol/L, o que proporciona uma ativação de 71% em comparação com o controle.

Notou-se que em todos os gráficos a variação na atividade da lipase permanece praticamente inalterada em concentrações abaixo de $4,8 \times 10^{-5}$ mol/L, sendo que nesta concentração começa a aumentar a atividade, tendo seu ápice na concentração de $5,4 \times 10^{-5}$ mol/L, com exceção da luteolina (que apresenta o melhor resultado na concentração de $4,8 \times 10^{-5}$ mol/L), que volta a diminuir com o aumento da concentração.

Os melhores resultados, porém foram da bixina e luteolina, que alcançaram um aumento de 145% na atividade da lipase em relação aos testes feitos sem a adição dos modificadores.

Analisando a figura 16 e 17 da Revisão de Literatura, podemos ver que a estrutura da bixina e norbixina são muito semelhantes a dos ácidos graxos (que são substrato da lipase) e, portanto devem estar ocupando regiões na molécula da enzima, possivelmente na região do centro ativo, modificando sua conformação e otimizando a catálise.

A bixina, como é lipossolúvel, apresentou uma maior porcentagem de atividade do que a norbixina. Esses resultados mostram que um corante lipossolúvel tem maior efeito no aumento da atividade de lipase do que um hidrossolúvel.

Flavonóides (figura 12 e 14) podem estar apenas associados à molécula da enzima, modificando sua conformação. Eles podem interagir em regiões hidrofóbicas da enzima e serem estabilizados por pontes de hidrogênio.

Estes resultados mostram que os flavonóides e corantes testados modificam a atividade da lipase, uma enzima que, no organismo, degrada os triacilgliceróis liberando ácido graxo e glicerol (Borel et al, 1989). Sugeriu-se então para explicar este mecanismo de ação, a formação de quelatos entre a enzima e esses compostos. Esses quelatos induzem a mudança conformacional da enzima, modificando, porém seu centro ativo (Moulin et al., 1994).

Lima et al. (1999) sugeriram uma estreita correlação entre a redução dos níveis de triacilgliceróis no soro e fígado de ratos com hiperlipidemia induzida por triton e a ativação da enzima lipase pelos flavonóides, sugerindo uma possível ação de flavonóide sobre os níveis de triacilgliceróis, mostrando uma inter-relação entre o aumento da atividade da lipase e maior hidrólise dos triacilgliceróis.

5 . CONCLUSÕES

Os resultados evidenciados no trabalho indicaram uma eficaz ação dos flavonóides e corantes naturais sob o metabolismo lipídico de coelhos e sua ação ativadora sobre a lipase *in vitro*.

No primeiro ensaio biológico foram utilizados coelhos, *Oryctolagus cuniculus*, da variedade Nova Zelândia, ratos, *Rattus noruergicus*, da variedade Wistar e cobaias, *Cavia porcellus*, da variedade Peruana, na tentativa de elucidar quais destes animais que melhor sofrem induções da hiperlipidemia através de uma dieta contendo 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol do peso médio da ração consumido diariamente. Neste ensaio, a indução mais eficiente em provocar a hiperlipidemia foi conseguida nos coelhos, mostrando concentrações séricas extremamente altas em um curto intervalo de tempo, o que o faz ser um dos animais mais procurado atualmente para trabalhos com hiperlipidemias.

Em cobaias obteve-se também concentrações estatisticamente significativas, apesar de não apresentarem concentrações tão altas como os dos coelhos, eles apresentam a vantagem de ter, entre os animais estudados, o metabolismo lipídico mais parecido com o do ser humano. Na análise histopatológica, verificou-se o acúmulo de gordura hepática nos coelhos e cobaias tratadas com colesterol e ácido cólico, caracterizado patologicamente como esteatose hepática.

Os ratos não apresentaram nenhuma alteração significativa nos níveis lipídicos estudados, o que mostra que este tipo de animal, tratado com uma dieta rica em lipídeos e em um curto intervalo de tempo, não é um bom modelo experimental para trabalhos com hipercolesterolemia. Uma alternativa é o trabalho com ratos geneticamente modificados.

No segundo ensaio biológico, optou-se então por utilizar coelhos da raça Nova Zelândia na determinação da melhor via de administração dos flavonóides e corantes naturais, que são utilizados atualmente no estudo de seus efeitos farmacológicos como agentes hipolipidêmicos.

Pelos resultados aqui apresentados as drogas ministradas através da via intraperitoneal, são mais rapidamente absorvidas pela corrente sanguínea do que pela via oral, mas são eliminadas mais rapidamente, enquanto que as drogas ministradas por via oral, são absorvidas lentamente e permanecem mais tempo na corrente sanguínea.

De acordo com o que foi observado e pela praticidade na administração, optou-se por administrar as substâncias a serem testadas, pela via oral, nos outros experimentos.

Um terceiro ensaio biológico foi realizado no intuito de se determinar a melhor concentração na qual os flavonóides e corantes atuam como fármacos hipolipidêmicos. As melhores reduções conseguidas na redução da concentração do colesterol total em relação ao grupo hiperlipidêmico foram observadas nos tratamentos com quercetina e rutina na dose de 5 mg e naringenina na dose de 10 mg, sendo estas variações de 56,42%, 55,00% e 54,04%, respectivamente, sendo significativo pelo teste de Dunnett.

O melhor tratamento encontrado na redução das concentrações de triacilgliceróis foi o com quercetina a 10 mg, sendo que esta tratamento abaixou o nível de triacilglicerol destes animais em 77,51% quando comparado com o grupo hipertriglicêmico.

Em relação ao colesterol-HDL, foi considerado mais eficiente a substância que promoveu um maior aumento no nível deste constituinte no soro. O melhor efeito foi conseguido pelo tratamento com a morina nas dosagens de 10 e 15 mg, obtendo-se um aumento de 10,79% e 9,00%, respectivamente, em relação ao grupo hiperlipidêmico.

Em um último ensaio biológico, comparou-se os efeitos dos flavonóides baicaleína, morina, naringenina, naringina, quercetina, rutina, crisina, luteolina e apigenina, os corantes naturais do extraídos do urucum norbixina e bixina e o medicamento comercial hipolipidêmico colestiramina na dosagem de 10 mg/Kg de peso corporal, por via oral, em cápsula, utilizando o talco farmacêutico como veículo. Sendo esta forma de mais fácil manejo, menos sacrificante para o animal e com uma maior garantia das concentrações ingeridas.

Todas as substâncias reduziram as concentrações de colesterol no soro sanguíneo dos coelhos, sendo que as melhores reduções foram observadas nas substâncias naringenina, 54,04%, naringina, 49,26%, quercetina, 49,78%, rutina, 48,89%, crisina, 55,56%, luteolina, 52,58% e apigenina, 49,88.

Todos os flavonóides estudados e o corante bixina reduziram as concentrações de colesterol a valores inferiores ao do medicamento colestiramina e suas médias foram estatisticamente significativas em relação a média deste medicamento, pelo teste de Tukey. Isto é uma vantagem, pois, a colestiramina vêm sendo substituída por apresentar vários efeitos colaterais.

Estes resultados mostram que as substâncias estudadas podem ser mais eficiente no combate a hipercolesterolemias dos que alguns dos medicamentos atualmente no mercado, com a vantagem de serem menos tóxicos que estes.

Os melhores efeitos observados na redução do triacilglicerol plasmático foram conseguidos pelos flavonóides baicaleína, quercetina e crisina. A baicaleína e a rutina diminuíram os níveis de triacilglicerol a valores inferiores ao do grupo controle alimentado apenas com ração, sendo que os valores conseguidos pela baicaleína (-56,91%) foram estatisticamente diferente deste grupo controle pelo teste de Dunnett.

A maior parte dos flavonóides aqui estudados tiveram um melhor efeito sobre o triacilglicerol do que o medicamento colestiramina.

As substâncias que promoveram um maior aumento no nível de colesterol-HDL foram os flavonóides baicaleína, apigenina, morina e luteolina e o medicamento colestiramina. Estas substâncias tiveram um efeito hipercolesterolêmico para esta fração lipídica do colesterol, que foram de 122,21%, 281,63%, 10,79%, 21,14% e 37,26%, respectivamente.

O fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de triacilgliceróis e colesterol, assim como pela síntese de lipoproteínas. Um desequilíbrio permanente entre o influxo de ácidos graxos, utilização e secreção de VLDL geram um acúmulo de triacilgliceróis e ésteres de colesterol nos hepatócitos que podem levar à esteatose hepática (STUDENIK, 2000). Isto foi constatado em nosso estudo, ao avaliarmos o tecido hepático do grupo controle, que recebeu suplementação de colesterol bem como dos grupos que além da suplementação do colesterol foram tratados com flavonóides.

De acordo com os resultados em nosso estudo, os fatores envolvidos no desenvolvimento da esteatose deverão ser melhor investigados, posteriormente.

De uma maneira geral, pode-se observar que as substâncias estudadas apresentaram uma ação farmacológica bastante acentuada no metabolismo lipídico de coelhos hiperlipidêmicos, sem sobretudo causar efeitos de toxicidade, aparentemente.

No ensaio *in vitro*, procurou-se caracterizar o efeito dos flavonóides luteolina e apigenina e dos corantes bixina a 95% e a norbixina sobre a atividade da lipase, variando-se as concentrações das substâncias em estudo.

Todos os compostos testados apresentaram ação ativadora na lipase nas concentrações variando de 4,8 a $5,4 \times 10^{-5}$ mol/L, sendo os melhores resultados apresentados pela bixina e luteolina.

O aumento da atividade da lipase por essas substâncias podem ser usados para explicar, em parte, os níveis reduzidos de triacilgliceróis encontrados nos ensaios biológicos, porém não se pode comparar as concentrações utilizadas no ensaio da lipase com as utilizado nos animais, uma vez que a forma de expressar as concentrações são diferentes e também as concentrações ideais em um experimento *in vitro*, pode diferir do experimento *in vivo*.

Este trabalho demonstrou os efeitos benéficos de alguns flavonóides e corantes naturais sob o metabolismo lipídico de coelhos, porém, novas pesquisas devem ser realizadas para que estes compostos possam ser utilizados como medicamento e testados no homem, inclusive mais estudos envolvendo a bioquímica e a toxicologia destas substâncias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALTO-SETALA, K.; FISHER, E.A.; CHEN, X.; CHAJEK-SHAUL, T.; HAYEK, T.; ZECHNER, R.; WALSH, A.; RAMAKRISHNAN, R.; GINSBERG, H.N.; BRESLOW, J.L. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles. **J Clin Invest**, 90:1889–1900, 1992.

AALTO-SETALA, K.; WEINSTOCK, P.H.; BISGAIER C.L.; WU, L.; SMITH, J.D.; BRESLOW, J.L. Further characterization of the metabolic properties of triglyceride-rich lipoproteins from human and mouse apoC-III transgenic mice. **J Lipid Res**, 37:1802–1811, 1996.

ABOObAKER, V.S.; BALGI, A.D.; BHATTACHARYA, R.K. In vivo effect of dietary factors on the molecular action of aflatoxin B1: Role of non-nutrient phenolic compounds on the catalytic activity of liver fraction. **In Vivo**, 8:673-84, 1994.

ÁGUILA, M.B.; LOUREIRO, C.C.; PINHEIRO, A.R.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A.; Lipid metabolism in rats fed diets containing different types of lipids. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, 78(1):32-38, 2002.

ALBERTO, F.L.; FIGUEIREDO, M.S.; ZAGO, M.A.; ARAÚJO, A.G.; DOS-SANTOS, J.E. The Lebanese mutation as an important cause of familial hypercholesterolemia in Brazil. **Braz J Med Biol Res**, 32(6):739-745, 1999.

AMIN, D.; GUSTAFSON, S.K.; WEINACHT, J.M.; CORNELL, S.A.; NEUENSCHWANDER, K.; SCOTese, A.C.; REGAN, J. R.; PERRONE, M.H. RG 12561(Dalvastatin): A novel synthetic inhibitor of HMG-CoA reductase and cholesterol lowering agent. **Pharmacology**, 46:13-22, 1993.

- AMRI, E.Z.; BONINO, F.; AILHAUD, G.; ABUMRAD, N.A.; GRIMALDI, P.A. Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in pre-adipocytes: homology to peroxisome proliferator-activated receptors. **J Biol Chem**, 270:2367–2371, 1995.
- ANILA, L.; VIJAYALAKSHMI, N.R. Flavonoids from *emblica officinalis* and *Mangifera indica*-effectiveness for dyslipidemia. **J Ethnophar**, 79(1):81-7, 2002.
- BACILA, M. Bioquímica veterinária. São Paulo: Varela, 2003.
- BALKAN, J.; KANBAGH, O.; HATIPOGLU, A.; KÜÇÜK, M.; ÇEVİKBAS, U.; AYKAÇ-TOKER, G.; UYSAL, M. Improving effect of dietary taurine supplementation on the oxidative stress and lipid levels in the plasma, liver and aorta of rabbits fed on a high-cholesterol diet. **Biosci Biotechnol Biochem**, 66:1755-1758, 2002.
- BALKAN, J.; DOGRU-ABBASOGLU, S.; AYKAÇ-TOKER, G.; UYSAL, M. The effect of a high cholesterol diet on lipids and oxidative stress in plasma, liver and aorta of rabbits and rats. **Nutrition Research**, 24:229-234, 2004.
- BARD, J. M.; PARRA, H. J.; CAMARE, R.; LUC, G.; ZIEGLER, O.; DACHET, C.; BRUCKERT, E.; DOUSTE-BLAZY, P.; DROUIN, P.; JACOTOT, B. A multicenter comparison of the effects of simvastatin and fenofibrate therapy in severe primary hypercholesterolemia, with particular emphasis on lipoproteins defined by their apolipoprotein composition. **Metabolism**, 41:498–503, 1992.
- BARICHELLO, A.W.; FEDOROFF, S. Effect of ileal by-pass and alfalfa on hypercholesterolemia. **Brazil Journal Experimental Pathology**, 52:81-87, 1971.
- BARROSO, S.G.; ABREU, V.G.; FRANCISCHETTI, E.A. A partição do tecido visceral na gênese da hipertensão e doença cardiovascular aterogênica. Um conceito emergente. **Arq Bras Cardiol**, 78(6):618-630, 2002.
- BASTIE, C.; HOLST, D.; GAILLARD, D.; JEHL-PIETRI, C.; GRIMALDI, P.A. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor PPAR δ promotes induction of PPAR γ and adipocyte differentiation in 3T3C2 fibroblasts. **J Biol Chem**, 274:21920–21925, 1999.
- BASTIE, C.; LUQUET, S.; HOLST, D.; JEHL-PIETRI, C.; GRIMALDI, P. A. Alterations of peroxisome-activated receptor δ activity affect fatty acid-controlled adipose differentiation. **J Biol Chem**, 275(49):38768-38773, 2000.
- BATLOUNI, M. Hipótese oxidativa da arteriosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronária. **Arq Bras Cardiol**, 68(01):55-63, 1997
- BEISIEGEL, U.; ST. CLAIR, R.W. An emerging understanding of the interactions of plasma lipoproteins with the arterial wall that leads to the development of atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol**, 7:265–268, 1996.

- BERGER, J.; LEIBOWITZ, M.D.; DOEBBER, T.W.; ELBRECHT, A.; ZHANG, B.; ZHOU, G.; BISWAS, C.; CULLINAN, C.A.; HAYES, N.S.; LI, Y.; TANEN, M.; VENTRE, J.; WU, M.S.; BERGER, G.D.; MOSLEY, R.; MARQUIS, R.; SANTINI, C.; SAHOO, S.P.; TOLMAN, R.L.; SMITH, R.G.; MOLLER, D.E. Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ and PPAR δ ligands produce distinct biological effects. **J Biol Chem**, 274:6718–6725, 1999.
- BESNARD, P.; MALLORDY, A.; CARLIER, H. Transcriptional induction of the fatty acid binding protein gene in mouse liver by bezafibrate. **FEBS Lett**, 327:219–223, 1993.
- BEST, J.D.; JENKINS, A.J. Novel agents for managing dyslipidaemia. **Expert Opin Investing Drugs**, 10(11):1901-11, 2001.
- BERTHOU, L.; *et al.* Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice. **J Clin Invest**, 97:2408–2416, 1996.
- BEVILACQUA, F.; BENSOUSSAN E.; JANSEN, J.M.; SPÍNOLA E CASTRO, F. **Fisiopatologia Clínica**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 1998. 646p.
- BEYMAN, A.C. Rabbit: A source of healthful meat? **Journal Appl Rabbit Research**, 7:133-134, 1984.
- BHAGAVAN, N. V. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Interamerican, 1977.
- BILHEIMER, D.W.; STONE, N.J.; GRUNDY, S.M. Metabolic studies in familial hypercholesterolemia. Evidence for a gene-dosage effect in vivo. **J Clin Invest**, 64:524-533, 1979.
- BIRT, D.F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, 90:157-177, 2001.
- BJÖRKEGREN, J.; BEIGNEUX, A.; BERGO, M.O. *et al.* Blocking the secretion of hepatic very low density lipoproteins renders the liver more susceptible to toxin-induced injury. **J Biol Chem**, 277:5476-5483, 2002.
- BOCAN, T.M.A. Animal models of atherosclerosis and interpretation of drug intervention studies. **Curr Pharm Des**, 4:37-52, 1998.
- BOONE, C.; MOUROT, J.; GREGOIRE, F.; REMACLE, C. The adipose conversion process: regulation by extracellular and intracellular factors. **Reprod Nutr Dev**, 40:325–358, 2000.
- BRAISSANT, O.; FOUFELLE, F.; SCOTTO, C.; DAUCA, M.; WAHLI, W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. **Endocrinol**, 137:354–66, 1996.

- BRANDES, R.; KAIKAUS, R.M.; LYSENKO, N.; OCKNER, R.K.; BASS, N.M. Induction of fatty acid binding protein by peroxisome proliferators in primary hepatocyte cultures and its relationship to the induction of peroxisomal beta-oxidation. **Biochim Biophys Acta**, 1034:53– 61, 1990.
- BRAVO, L.; ABIA, R.; EASTWOOD, M.A.; SAURA-CALIXTO, F. Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and faecal output. **Brit J Nutr**, 71:933-946, 1994.
- BROUSSEAU, M.E.; SCHAEFER, E.J. New developments in the prevention of atherosclerosis in patients with low-density lipoprotein cholesterol. **Curr Atheros Repr**, 3(5):365-72, 2001.
- BROWN, A.J. Atherosclerosis: Cell biology and lipoproteins. **Curr Opin Lipidol**, 11:667–669, 2000.
- BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, 232:34-47, 1984.
- BRUN, R. P.; TONTONOZ, P.; FORMAN, B.M.; ELLIS, R.; CHEN, J.; EVANS, R.M.; SPIEGELMAN, B.M. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. **Genes Dev**, 10:974–984, 1996.
- BULUR, H.; OZDEMIRLER, G.; OZ, B.; TOKER, G.; OZTURK, M.; UYSAL, M. High cholesterol diet supplemented with sunflower seed oil but not olive oil stimulates lipid peroxidation in plasma, liver, and aorta of rats. **J Nutr Biochem**, 6:547-50, 1995.
- BURTON, G.W.; INGOLD, K.U. β -Carotene: na unusual type of lipid antioxidant. **Science**, 224:569-573, 1984.
- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Artmed, 2001. 752p.
- CARR, T.P.; PARKS, J.S.; RUDEL, L.L. Hepatic ACAT activity in african green monkeys in highly correlated to plasma LDL cholesteryl enrichment and coronary artery atherosclerosis. **Arterioscler Thromb**, 12:1274-1283, 1992.
- CARVALHO, P.R.N. Corantes de urucum hidrossolúveis. **Rev Bras Cor Nat**, 1(1):242-243, 1992.
- CASLAKE, M.J.; PACKARD, C.J.; GAW, A.; MURRAY, E.; GRIFFIN, B.A.; VALLANCE, B.D.; SHEPHERD, J. Fenofibrate and LDL metabolic heterogeneity in hypercholesterolemia. **Arterioscler Thromb**, 13:702–711, 1993.
- CATTIN, L.; DA COL, P.G.; FERUGLIO, F.S.; FINAZZO, L.; RIMONDI, S.; DESCOVICH, G.; MANZATO, E.; ZAMBON, S.; CREPALDI, G.; SIEPI, D. Efficacy of ciprofibrate in primary type II and IV hyperlipidemia: the Italian multicenter study. **Clin Ther**, 12:482–488, 1990.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quim Nova**, 21(1):99-105, 1998.

CHARLTON, M.; SREEKUMAR, R.K.; RASMUSSEN, D. et al. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, 35:898-904, 2002.

CHAVES, F.J.; PUIG, O.; GARCIA-SOGO, M.; REAL, J.; GIL, J.V.; ASCASO, J.; CARMENA, R.; ARMEGOD, M.E. Seven DNA polymorphisms in the LDL receptor gene: application to the study of familial hypercholesterolemia in Spain. **Clin Genet**, 50:28-35, 1996.

CHEEKE, P.R. Nutritional and physiological implication of saponins: A review. **Can Journal Animal Sci**, 51:621-632, 1970.

CHEEKE, P.R.; SHULL, L.R. **Natural toxicants in feeds and poisonous plants**. Westport, Connecticut: AVI, 1985.

CHEEKE, P.R. **Alimentación y nutrición del conejo**. Zaragoza, ES: Acribia, 1995. 429p.

CHERRY, J.S. **American Journal Physiology**, v. 100, p. 266, 1932.

CHINETTI, G.; et al. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. **Circulation**, 101:2411–2417, 2000.

CHINETTI, G.; et al. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. **Nat Med**, 7:53–58, 2001.

CLAVEY, V.; LESTAVEL-DELATTRE, S.; COPIN, C.; BARD, J.M.; FRUCHART, J. Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII, and E. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 15:963–971, 1995.

COHEN, B.I.; MOSBACH, E.H.; MATOBA, N.; SUH, S.O.; MCSHERRY, C.K. The effect of Alfafa-Corn diets on cholesterol metabolism and gallstones in prairie dogs. **Lipids**, 25(3):143-147, 1990.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardio protective effects, and dietary sources – review. **J Nut Biochem**, 7(1):66-76, 1996.

DAS, N.P. Studies on flavonoid metabolism: Absorption and metabolism of (+) – catechin in man. **Biochem Pharmacol**, 20:3435-3445, 1971.

DE FAIRE, U.; ERICSSON, C.G.; HAMSTEN, A.; NILSSON, J. Design features of a five-year Bezafibrate Coronary Atherosclerosis Intervention Trial (BECAIT). **Drugs Exp Clin Res**, 21:105–124, 1995.

DE FAIRE, U.; ERICSSON, C.G.; GRIP, L.; NILSSON, J.; SVANE, B.; HAMSTEN, A. Secondary preventive potential of lipid-lowering drugs. The Bezafibrate Coronary Atherosclerosis Intervention Trial (BECAIT). **Eur Heart J**, 17(F):37–42, 1996.

DE LA CRUZ, J.P.; QUINTERO, L.; VILLALOBOS, M.A.; DE LA CUESTA, F.S. Lipid peroxidation and glutathione system in hyperlipemic rabbits: influence of olive oil administration. **Biochim Biophys Acta**, 1485:36-44, 2000.

DEL BOCCIO G.; LAPENNA D.; PORRECA, E.; PENNELI, A.; SAVINI, F.; FELICIANI, P.; RICCI, G.; CUCCURULLO, F. Aortic antioxidant defense mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. **Atherosclerosis**, 81:127-35, 1990.

DEVLIN, T.M. **Textbook of biochemistry with clinical correlations**. 4. ed. New York, N.Y: Wiley-Liss, 1997. 1186 p.

DE WHALEY, C.V.; RANKIN, S.M.; HOULT, J.R.S.; JESSUP, W.; LEAKE, D.S. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. **Biochemical Pharmacology**, 39(11):1743-1750, 1990.

DREYER, C.; KREY, G.; KELLER, H.; GIVEL, F.; HELFTENBEIN, G.; WAHLI, W. Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. **Cell**, 68:879– 887, 1992.

DUARTE, J.; VIZCAÍNO, F.P.; UTRILLA, P.; JIMÉNEZ, J.; TAMARGO, J.; ZARZUELO, A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure activity relationships. **Biochem Pharmacol**, 24:857-862, 1993.

DUPLUS, E.; GLORIAN, M.; FOREST, C. Fatty acid regulation of gene transcription. **J Biol Chem**, 275(40) :30749-30752, 2000.

EBARA, T.; RAMAKRISHNAN, R.; STEINER, G.; SHACHTER, N.S. Chylomicronemia due to apolipoprotein CIII overexpression in apolipoprotein E-null mice. Apolipoprotein CIII-induced hypertriglyceridemia is not mediated by effects on apolipoprotein E. **J Clin Invest**, 99:2672–2681, 1997.

ENDO A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **J Lipid Res**, 33:1569-1582, 1992.

ERICSSON, C.G.; HAMSTEN, A.; NILSSON, J.; GRIP, L.; SVANE, B.; DE FAIRE, U. Angiographic assessment of effects of bezafibrate on progression of coronary artery disease in young male postinfarction patients. **Lancet**, 347:849–853, 1996.

Estatinas: el desarrollo de la enfermedad cardiovascular y su tratamiento con inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa.

http://medscape.elmundo.es/medscape/terapeuticas/26/terapeuticas_26_imprimir.html. 2001

FACINO, R.M.; CARINI, M.; ALDINI, G.; BERTI, F.; ROSSONI, G.; BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. Diet enriched with procyanidins enhances antioxidant activity and reduces myocardial post-ischaemic damage in rats. **Life Sci**, 64:627-642, 1999.

FERGUSON, T.L.; WALES, J.H.; SINNHUBER, R.O.; LEE, D.J. Cholesterol level, arterosclerosis and liver morphology in rabbits fed cyclopropenoid fatty acids. **Food Cosmet Toxicology**, 14:15-18, 1976.

FERRANDIZ, M.L., ALCARAZ, M.J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agent Actions**, 32:283-288, 1991.

FISHER, K.D. Evaluation of the health aspects of hesperidin, naringin, and citrus flavonoid extract as food ingredients. Washington, Bureau of Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Contract No FDA. 223-78-2100. 1982.

FOOTE, C.S.; DENNY, R.W. Chemistry of singlet and transport of carotenoids. Carotene. **J Am Chem Soc**, 90:6233-6235, 1968.

FORMAN, B.M.; TONTONNOZ, P.; CHEN, J.; BRUN, R.P.; SPIEGELMAN, B.M.; EVANS, R.M. **Cell**, 83:803-812, 1995.

FOURIE, T.G.; SNYCKERS, F.O. A flavone with anti-inflammatory activity from the roots of rhus undulata. **Journal of Natural Products**, 47:1057, 1984.

FRICK, M.H.; SYVANNE, M.; NIEMINEN, M.S.; KAUMA, H.; MAJAHALME, S.; VIRTANEN, V.; KESANIEMI, Y.A.; PASTERNAK, A.; TASKINEN, M.R. Lipid Coronary Angiography Trial (LOCAT) Study Group. Prevention of the angiographic progression of coronary and vein graft atherosclerosis by gemfibrozil after coronary bypass surgery in men with low levels of HDL cholesterol. **Circulation**, 96:2137-2143, 1997.

FRUCHART, J.C.; DURIEZ, P.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol**, 10:245-257, 1999.

FRUCHART, J.C.; STAELS, B.; DURIEZ, P. PPARs metabolic disease and atherosclerosis. **Pharmacol Res**, 44(5):345-352, 2001.

FUENTES, J.A.G. **Que alimentos convêm ao coração? Higiene Alimentar**, 12(53):7-11, 1998.

GERSTER, H. Anticarcinogenic effects of common carotenoids. **International Journal of Vit Nutrition Research**, 63:93-121, 1993.

GLASS, C.K.; ROSE, D.W.; ROSENFELD, M.G. **Curr Opin Cell Biol**, 9:222-232, 1997.

GOKER, H.; TUNCBILEK, M.; LEONCINI, G.; BUZZI, E.; MAZZEI, M.; ROLLAND, Y.; ERTAN, R. Synthesis and inhibitory activities na platelet aggregation of some flavonoid analogues. *Arznim-Forsch. Drug Research*, 45(1), 1995.

GOLDBOURT, U.; BRUNNER, D.; BEHAR, S.; REICHER-REISS, H. Baseline characteristics of patients participating in the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Study. *Eur Heart J*, 19(H):42–47, 1998.

GOMES, S.M. **Efeitos de flavonóides sobre o metabolismo lipídico**. 1998, 129f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

GOTTLICHER, M.; WIDMARK, E.; LI, Q.; GUSTAFSSON, J.A. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 89:4653–4657, 1992.

GRAMACHO, R.C.T. **Análise de indicadores de estilo de vida de indivíduos hipercolesterolêmico e efeito de flavonóides e proteínas no controle do metabolismo lipídico**. 1998,143f. Dissertação (Mestrado em Economia Doméstica)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

GREGOIRE, F.M. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Society for Exp Biol Med*, 226(11):997-1002, 2001.

GRYGLEWSKI, R.J.; KORBUT, R.; ROBAK, J.; SWIES, J. On the mechanism of anti-thrombotic action of flavonoids. *Biochemistry Pharmacology*, 36:317-322, 1987.

GUGLER, R.; LESCHIC, M.; DENGLER, H.J. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur J Clin Pharmacol*, 9:229-234, 1975.

GUO, X.; LIAO, K. Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Gene*, 251:45–53, 2000.

GURNELL, M.; WENTWORTH, J.M.; AGOSTINE, M.; ADAMS, M.; COLLINGWOOD, T.N.; PROVENZANO, C.; BROWNE, P.O.; RAJANAYAGAM, O.; BURRIS, T.P.; SCHWABE, J.W.; LAZAR, M.A.; CHATTERJEE, V.K.K.J. *Biol Chem*, 275:5754–5759, 2000.

HAAS, H. *Arzneipflanzenkunde*. **B I Wissenschaftsverlag**, p.13-17, 1991.

HAKIM, I.A.; WEISGERBER, U.M.; HARRIS, R.B.; BALENTINE, D.; VAN-MIERLO, C.A.J.; ROBINSON, P. Preparation, composition and consumption patterns of tea-based beverages in Arizona. *Nutrition Reseach*, 20(12):1715-24, 2000.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMAN, K. *Phytochemistry*, 30:3864-3870, 1991.

HAMM, J.K.; PARK, B.H.; FARMER, S.R. A role for C/EBP β in regulating peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. **J Biol Chem**, 276:18464–18471, 2001.

HANSEN, J.B.; ZHANG, H.; RASMUSSEN, T.H.; PETERSEN, R.K.; FLINDT E.N.; KRIS-TIANSEN, K. PPAR δ -mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling. **J Biol Chem**, 276:3175–3182, 2001.

HANUSCH, M.; STAHL, W.; SCHULZ, W.A.; SIES, H. Induction of gap junctional communication by 4-oxo-retinoic acid generated from its precursor canthaxanthin. **Arch Biochem Bioph**, 317:423-428, 1995.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, 55:481-504, 2000.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J Nutr Biochem**, 13:572-584, 2002.

HELGERUD, P.; SAAREM, K.; NORUM, K.R. Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in human small intestine: its activity and some properties of the enzyme reaction. **J Lipids Res**, 22:271-277, 1981.

HELLER, F.; HARVENGT, C. Effects of clofibrate, bezafibrate, fenofibrate and probucol on plasma lipolytic enzymes in normolipaemic subjects. **Eur J Clin Pharmacol**, 25:57–63, 1983.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **J Agric Food Chem**, 40:2379-2383, 1992.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B.; KROMHOUT, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. **Nutr Cancer**, 20:21-29, 1993.

HOBBS, H.; BROWN, M.; GOLDSTEIN, J. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. **Human Mutation**, 1:445-466, 1992.

HOSSAIN, M.Z.; ZHANG, L.X.; BERTRAM, J.S. Retinoids and carotenoids upregulate gap-junctional communication: correlation with enhanced growth control and cancer prevention. **Prog Cell Research**, 3:301-309, 1993.

HUANG, Y.; Ji, Z.S.; BRECHT, W.J.; RALL, S.C.Jr. et al. Overexpression of apolipoprotein E3 in transgenic rabbits causes combined hyperlipidemia by stimulating hepatic VLDL production and impairing VLDL lipolysis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 19:2952-2959, 1999.

HUMPHRIES, S.E.; KING-UNDERWOOD, L.; GUDNASON, V.; SEED, M.; DELATTRE, S.; CLAVEY, V.; FRUCHART, J. CH. Six DNA polymorphisms in the low density lipoprotein receptor gene: their genetic relationship and an example of their use for identifying affected relatives of patients with familial hypercholesterolemia. **J Med Genet**, 30:273-279, 1993.

IGARASCHI, K.; ABE, S.; SATOH, J. Effects of Atsumi-kabu (Red Turnip, Brassica Campestris L.) anthocyanin on serum cholesterol levels in cholesterol-fed rats. **Agricultural Biological Chemistry**, 54(1):171-5, 1990.

ISHII, K.; FURUTA, T.; KASUYA, Y. Determination of naringenin in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, 683:225-29, 1996.

ISSEMANN I.; GREEN S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, 347:645–650, 1990.

JEON, S.M.; BOK, S.H.; JANG, M.K.; LEE, M.K.; NAM, K.T.; PARK, Y.B.; RHEE, S.J.; CHOI, M.S. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high-cholesterol rabbits. **Life Sciences**, 69:2855-2866, 2001.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999. 552p.

KAHRI, J.; SANE, T.; VAN TOL, A.; TASKINEN, M.R. Effect of gemfibrozil on the regulation of HDL subfractions in hypertriglyceridaemic patients. **J Intern Med**, 238:429–436, 1995.

KAPLINSKY, E.; BRUNNER, D. The Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study results. In: **XXth Congress of the European Society of Cardiology**, Vienna, August 22–August 26, 1998. Abstract.

KELLER, H.; DREYER, C.; MEDIN, J.; MAHFOUDI, A.; OZATO, K.; WAHLI, W. **Proc Natl Acad Sci USA**. 90:2160–2164, 1993.

KELLIS, J.T.; VICKERY, L.E. Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones. **Science**, 225:1032-1034, 1984.

KELLY, L. J.; et al. Peroxisome proliferator-activated receptors gamma and alpha mediate *in vivo* regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression. **Endocrinology**, 139:4920–4927, 1998.

KERSTEN, S.; MANDARD, S.; TAN, N.S.; ESCHER, P.; METZGER, D.; CHAMBON, P.; GONZALEZ, F.J.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. **J Biol Chem**, 275:28488–28493, 2000.

- KESANIEMI, Y.A.; GRUNDY, S.M. Influence of gemfibrozil and clofibrate on metabolism of cholesterol and plasma triglycerides in man. **JAMA**, 251:2241–2246, 1984.
- KIM, H.J.; OH, G.T.; PARK, Y.B.; LEE, M.K.; SEO, H.J.; CHOI, M.S. Naringenin alters the cholesterol biosynthesis and antioxidant enzyme activities in LDL receptor-knockout mice under cholesterol fed condition. **Life Sciences**, 74:1621-34, 2004.
- KIRK, E.A.; SUTHERLAND, P.; WANG, S.A.; CHAIT, A.; LEBOEUF, R.C. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficiente mice. **American Society for Nutritional Sciences**, 954-959, 1998
- KLIEWER, S.A.; UMESONO, K.; NOONAN, D.J.; HEYMAN, R.A.; EVANS, R.M. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. **Nature**, 358:771–774, 1992.
- KLIEWER, S.A.; SUNDSETH, S.S.; JONES, S.A.; BROWN, P.J.; WISELY, G.B.; KOBLE, J.M. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. **Proc Natl Acad Sci USA**, 94:4318-4323, 1997.
- KO, W.G.; KANG, T.H.; LEE, S.L.; KIM, N.Y.; KIM, Y.C.; SOHN, D.H.; LEE, B.H. Polymethoxyflavonoids from *Vitex rotundifolia* inhibit proliferation by inducing apoptosis in human myeloid leukemia cells. **Food and Chem Tox**, 38(10):861-5, 2000.
- KONDO, K.; HIRANO, R.; MATSUMOTO, A.; IGARASHI, O.; ITAKURA, H. Inhibition of LDL oxidation by cocoa. **Lancet**, 348:1514-1518, 1996.
- KOSHY, A.S.; VIJAYALAKSHMI, N.R. Impact of certain flavonoids on lipid profiles – potential action of *garcinia cambogia* flavonoids. **Phytother Res**, 15(5):395-400, 2001.
- KUIPERS, F.; LIN, Y.; HAVINGA, R.; BLOKS, V. et al. Impaired production of very low density lipid proteins by apolipoprotein E-deficient mouse hepatocytes in primary culture. **J Clin Invest**, 100:2915-2922, 1997.
- KUROWSKA, E.M.; SPENCE, J.D.; JORDAN, J.; WETMORE, S.; FREEMAN, D.J.; PICHÉ, L.A.; SERRATONE, P. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. **Am J Clin Nutr**, 72(5):1095-100, 2000.

LADIAS, J.A.; HADZOPOULOU-CLADARAS, M.; KARDASSIS, D.; CARDOT, P.; CHENG, J.; ZANNIS, V.; CLADARAS, C. Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII, and ApoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3. **J Biol Chem**, 267:15849–15860, 1992.

LAMBEV, I.; KRUSHKOV, I.; ZHELIAZKOV, D.; NIKOLOV, N. Antiexudative effect of naringenin in experimental pulmonary edema and peritonitis. **Eksperimentalna Meditsina I Morfologija**, 19:207-212, 1980.

LAUGHTON, M.J.; EVANS, P.J.; MORONEY, A.; HOULT, J.R.S.; HALIWELL, B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship dietary additives: Relationship to antioxidant activity and to iron reducing ability. **Biochemistry. Pharmacology**, 42:1673-1681, 1991.

LAWRENCE, J.W.; KROLL, D.J.; EACHO, P.I. Ligand-dependent interaction of hepatic fatty acid-binding protein with the nucleus. **J Lipid Res**, 41:1390–1401, 2000.

Leal, L.H.M. **Atlas digital de histologia**.
<http://www2.uerj.br/~micron/atlas/Adiposo/adip0.htm>.

LEE, C.H.; JEONG, T.S.; CHOI, Y.K.; HYUN, B.H.; OH, G.T.; KIM, E.H.; KIM, J.R.; HAN, J.I.; BOK, S.H. Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, associated with hepatic ACAT and aortic VCAM-1 and MCP-1 in high cholesterol-fed rabbits. **Biochem Biophys Res Commun**, 284:681-688, 2001.

LEE, M.K.; MOON, S.S.; LEE, S.E.; BOK, S.H.; JEONG, T.S.; PARK, Y.B.; CHOI, M.S. Naringenin 7-O-cetyl ether as inhibitor of HMG-CoA reductase and modulator of plasma and hepatic lipids in high cholesterol-fed rats. **Bioorg Med Chem**, 11:393-398, 2003.

LEHMAN, J.M.; MOORE, L.B.; SMITH-OLIVER, T.A.; WILKISON, W.O.; WILLSON, T.M.; KLIEWER, S A. **J Biol Chem**, 270:12953–12956, 1995.

LEITE, J.I.A. **Mecanismo de ação da goma guar sobre o metabolismo de colesterol: ausência de participação da flora microbiana**. 1993. 124p. Dissertação – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LEMOS, V.S.; FREITAS, M.R.; MULLER, B.; LINO, Y.D.; QUEIROGA, C.E.G.; CÔRTEZ, S.F. Dioclein, a new nitric oxide and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. **European Journal Pharmacology**, 386:41-46, 1999.

LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; OLIVEIRA, M.G.A.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; GOMES, S.M.; FILHO, J.T S. Determinação da atividade de lipase na presença de Morina, Naringenina, Naringina e Rutina. **Ciência Agrotécnica de Lavras**, 23(3)626-631, 1999.

LONARDO, A. Fatty liver na nonacoholic steatohepatitis. Where do we stand and where are we going? **Med and Gastroent**, 17:80-89, 1999.

LOVASTATIN STUDY GROUPS I THROUGH IV, 1993. Lovastatin 5-year safety and efficacy study. **Archives of Internal Medicine**, 153:1079-87, 1993.

LOZOYA, X. **Investigación Y Ciencia**, 4, 1997.

LUDUVING, M.M. Conheça os inimigos do colesterol. **Saúde! É vital! São Paulo Azul**, p. 169, 1997.

LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; ZIEGLER, A.; BIEGER, B. **Color Atlas of pharmacology**. 2. ed. New York: Thiem Stuttgart, 2000.

MAHLFOUZ, M.M.; KUMMEROW, F.A.; Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peoxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. **J Nutr Bichem**, 11:293-302, 2000.

MALMENDIER, C.L.; DELCROIX, C. Effects of fenofibrate on high and low density lipoprotein metabolism in heterozygous familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, 55:161–169, 1985.

MARCEAU, P.; BIRON, S.; HUOLD, F.S.; MARCEAU, S.; SIMARD, S.; THUNG, S.N.; KRAL, J.G. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, 84(5):1513-1517, 1999.

MASCOLO, N.; BORRELLI, F.; CAPASSO, R.; DI CARLO, G.; IZZO, A.A.; CASTALDO, S.; LONGO, R. Natural products and cardiovascular disturbances. **Phytotherapy Research**, 12:S121-S123, 1998.

MAUGEAIS, C.; TIETGE, U.J.F.; TSUKAMOTO, K. et al. Hepatic apolipoprotein E expressim promotes very low density lipoprotein-apolipoprotein B production in vivo in mice. **J Lipid Res**, 41:1673-1979, 2000.

MAZUR, A.; BAYLE, D.; LAB, C.; ROCK, E.; RAYSSIGUIER, Y. Inhibitory effect of procyanidin-rich extracts on LDL oxidation in vitro. **Atherosclerosis**, 145:421-422, 1999.

McCLURE, T.D.; LIEBLER, D.C. A rapid method for profiling the products of antioxidants reactions by negative ion chemical ionization mass spectrometry. **Chem R Toxicol**, 8:128-135, 1995.

MENSENKAMP, A.R.; JONG, M.C.; VAN GOOR, H. et al. Apolipoprotein E participates in the regulation of very low density lipoprotein-triglyceride secretion by the liver. **J Biol Chem**, 274:35711-35718, 1999.

MITSCHER, L.A.; DRAKE, S.; GOLLAPUDI, S.R.; OKUNTE, K.A. **J Nat Prod**, 50:1025-1030, 1987.

- MORRISON, R.F.; FARMER, S.R. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. **J Nutr**, 130:3116S–3121S, 2000.
- MOULIN, A.; TEISSERE, M.; BERNARD, C.; PIERONI, G. Lipases of the Euphorbiaceae family: purification of a lipase from *Euphorbia characias* latex and structure function relationships with the B chain of ricin. **Proc. National Academy of Sciences**, 91:24, 1994.
- MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Harper: bioquímica**. 8. ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2000. 763p.
- NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.; HOORN, D.E.C.; et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr**, 74:418-425, 2001.
- NOLTE, R.T.; WISELY, G.B.; WESTIN, S.; COBB, J.E.; LAMBERT, M.H.; KUROKAWA, R.; ROSENFELD, M.G.; WILLSON, T.M.; GLASS, C.K.; MILBURN, M.V. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor. **Nature**, 395:137–143, 1998.
- NTAMBI, J.M.; YOUNG-CHEUL, K. Adipocyte differentiation and gene expression. **J Nutr**, 130:3122S–3126S, 2000.
- PALOZZA, P.; MOUALLA, S.; KRINSKY, N.I. Effects of β -carotene and α -tocopherol on radical-initiated peroxidation of microsomes. **Free Radical Biological Medical**, 13:127-136, 1992.
- PETERS, J.M.; HENNUYER, N.; STAELS, B.; FRUCHART, J.C.; FIEVET, C.; GONZALEZ, F.J.; AUWERX, J. Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. **J Biol Chem**, 272:27307–27312, 1997.
- PIMENTEL, F.A. **Avaliação de métodos de obtenção e da estabilidade de pigmentos de semente de urucum (*Bixa orellana* L.)**. 1995. 132f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.
- PINCKNEY, E.R.; PINCKNEY, C. **The cholesterol controversy, shepoune**. Los Angeles, 1973. 162 p
- PLUG, O.; CHAVES, F.J.; GARCIA-SOGO, M.; REAL, J.; GIL, J.V.; ASCASO J.; ARMEGOD, M.E. A three-allelic polymorphic system in exon 12 of the LDL receptor gene is highly informative for segregation analysis of familial hypercholesterolemia in the Spanish population. **Clinical Genetics**, 50:50-53, 1996.
- PRENTICE-HERNANDES, C. Influência de aquecimento da degradação térmica de bixina em extratos alcalinos de urucum (*Bixa orellana* L.). **Arquivo de Biologia e Tecnologia**, 36(4):319-328, 1993.

- QI, C.; ZHU, Y.; REDDY, J.K. Peroxisome proliferator-activated receptors, coactivators, and downstream targets. **Cell Biochem Biophys**, 32:187–204, 2000.
- QUARFORDT, S.H.; MICHALOPOULOS, G.; SCHIRMER, B. The effect of human C apolipoproteins on the in vitro hepatic metabolism of triglyceride emulsions in the rat. **J Biol Chem**, 257:14642–14647, 1982.
- RANGWALA, S.M.; LAZAR, M.A. Transcriptional control of adipogenesis. **Annu Rev Nutr**, 20:535–559, 2000.
- RAO, D.R.; CHAWAN, C.B.; CHEN, C.P.; SUNKI, G.R. Nutritivi value of rabbit meat. In “The domestic Rabbit: Potencials, Problems, and Current Research” (P. R. Cheke, ed.), **OSU Rabbit Research Center**, 53-59, 1979.
- REIHNER, E.; ANGELIN, B.; RUDLING, M. et al. Regulation of hepatic cholesterol metabolism in humans: Stimulatory effects of cholestyramine on HMGCoA redutase activity and low density lipoprotein receptor expression in gallstone patients. **J lipid Res**, 31:2219-2226, 1990.
- REUSCH, J.E.; COLTON, L.A.; KLEMM, D.J. CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Mol Cell Biol**, 20:1008–1020, 2000.
- ROSEN, E.D.; SPIEGELMAN, B.M. Molecular regulation of adipogenesis. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 16:145–171, 2000.
- ROSS, M.H.; REITH, E.J.; ROMRELL, L.J. **Histologia – atlas**. 2. ed. São Paulo: Panamericana, 1995. 779p.
- ROSS, S.E.; HEMATI, N.; LONGO, K.A.; BENNETT, C.N.; LUCAS, P.C.; ERICKSON, R.L.; MACDOUGALD, O.A. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. **Science**, 289:950–953, 2000.
- RUBINS, H. B.; et al. Veterans Affairs High-density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. **N Engl J Med**, 341:410–418, 1999.
- RUOTOLO, G.; ERICSSON, C.G.; TETTAMANTI, C.; KARPE, F.; GRIP, L.; SVANE, B.; NILSSON, J.; DE FAIRE, U.; HAMSTEN, A. Treatment effects on serum lipoprotein lipids, apolipoproteins and low density lipoprotein particle size and relationships of lipoprotein variables to progression of coronary artery disease in the Bezafibrate Coronary Atherosclerosis Intervention Trial (BECAIT). **J Am Coll Cardiol**, 32:1648–1656, 1998.
- SALAZAR, L.A.; CAVALLI, S.A.; HIRATA, M.H.; DIAMENT, J.; FORTI, N.; GIANNINI, S.D.; NAKANDAKARE, E.R.; BERTOLAMI, M.C.; HIRATA, R.D.C. Polymorphisms of the low-density lipoprotein receptor gene in Brazilian individuals with heterozygous familial hypercholesterolemia. **Brazilizn Journal of Medical and Biological Research**, 33:1301-1304, 2000.

SÃO JOSÉ, A. R. **A cultura do urucum: diagnóstico e perspectivas para a região do sudoeste da Bahia.** [14/01/1999].
<http://sudoeste.uesb.br/sbcn/cultura.html>. 1998

SCARTEZINI, M. Dislipidemias. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS, XXVII, 2000, Recife. **Curso 09.** 12p.

SCARTEZINI, M.; LOPES, L.M.; IHARA, S.S.M.; PICHETH, G.; MARTINEZ, T.L.R. Metabolismo dos lipídes e lipoproteínas. In: Conduta clínica nas dislipidemias. Ed. Martinez, T.L.R.: Belo Horizonte. **Health.** 1997. p 25-40.

SCHAEFER, E.J.; LAMON-FAVA, S.; COLE, T.; SPRECHER, D.L.; CILLA, D.D.J.; BAL-AGTAS, C.C.; ROWAN, J.P.; BLACK, D.M. Effects of regular and extended-release gemfibrozil on plasma lipoproteins and apolipoproteins in hypercholesterolemic patients with decreased HDL cholesterol levels. **Atherosclerosis**, 127:113–122, 1996.

SCHOONJANS, K.; PEINADO-ONSURBE, J.; LEFEBVRE, A.M.; HEYMAN, R.A.; BRIGGS, M.; DEEB, S.; STAELS, B.; AUWERX, J. PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. **EMBO J**, 15:5336–5348, 1996.

SCHWENKE, D.C. Antioxidants and atherogenesis. **J Nutr Biochem**, 9:424-445, 1998.

SELVARAJAN, S.; LUND, L.R.; TAKEUCHI, T.; CRAIK, C.S.; WERB, Z.A. plasma kallikrein-dependent plasminogen cascade required for adipocyte differentiation. **Nat Cell Biol**, 3:267–275, 2001.

SHIN, Y.W.; BOK, S.H.; JEONG, T.S.; BAE, K.H.; JEOUNG, N.H.; CHOI, M.S.; LEE S.H.; PARK, Y.B. Hypocholesterolemic effect of naringin associated with hepatic cholesterol regulating enzyme changes in rats. **Int J Vit Nutrition Research**, 69(5):341-347, 1999.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Europe J Biochem**, 215:213-219, 1993.

SILVA, K.L.; FILHO, V.C. Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico. **Quim Nova**, 25(3):449-454, 2002.

SMITH, S.J.; COOPER, G.R.; MYERS, G.L.; SAMPSON, E.J. Biological variability in concentrations of serum lipids: sources of variation among results from published studies and composite predicted values. **Clin Chem**, 39:1012-1022, 1993.

SO, F.V.; GUTHRIE, N.; CHAMBERS, A.F.; MOUSSA, M.; CARROL, K.K. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. **Nutrition and Cancer**, 26:167-181, 1996.

- SOUTAR, A.K. Update on low density lipoprotein receptor mutations. **Cur Opin Lipidol**, 9:141-147, 1998.
- SPIEGELMAN, B.M.; FLIER, J.S. **Cell**, 87:377–389, 1996.
- SPIEGELMAN, B. M. **Diabetes**, 47:507–514, 1998.
- SPIEGELMAN, B.M.; PUIGSERVER, P.; WU, Z. Regulation of adipogenesis and energy balance by PPAR; and PGC-1. **Int J Obes Relat Metab Disord**, 24(4):S8– S10, 2000.
- STAELS, B.; VU-DAC, N.; KOSYKH, V.A.; SALADIN, R.; FRUCHART, J.C.; DALLONGEVILLE, J.; AUWERX, J. Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates. **J Clin Invest**, 95:705–712, 1995.
- STAHL, W.; SIES, H. Physical quenching of singlet oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids. **Ann NY Academy Science**, 691:10-19, 1993.
- STANGE, E.F.; FRUHHOLZ, M.; OSENBRUGGE, M.; REIMANN, F.; DITSCHUNEIT, H. Bezafibrate fails to directly modulate HMG-CoA reductase or LDL catabolism in human mononuclear cells. **Eur J Clin Pharmacol**, 40(1):S37–S40, 1991.
- STEBBENS, W. An appraisal of cholesterol feeding in experimental atherosclerosis. **Prog Cardiovasc Dis**, 29:107-28, 1986.
- STEINER, G. The Diabetes Atherosclerosis Intervention Study (DAIS): a study conducted in cooperation with the World Health Organization. The DAIS Project Group. **Diabetologia** 39:1655–1661, 1996.
- STEINMETZ, A.; SCHWARTZ, T.; HEHNKE, U.; KAFFARNIK, H. Multicenter comparison of micronized fenofibrate and simvastatin in patients with primary type IIA or IIB hyperlipoproteinemia. **J Cardiovasc Pharmacol**, 27:563–570, 1996.
- STRYER, L. **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1996. 1000p.
- STUDENIK, P. Lipid disorders in liver diseases. **Vnitr Lek**, 46:547-8, 2000.
- SUL, H.S.; SMAS, C.; MEI, B.; ZHOU, L. Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation. **Int J Obes Relat Metab Disord**, 24(4):S15–S19, 2000.
- SYVANNE, M.; NIEMINEN, M.S.; FRICK, M.H.; KAUMA, H.; MAJAHALME, S.; VIRTANEN, V.; KESANIEMI, Y.A.; PASTERNAK, A.; EHNHOLM, C.; TASKINEN, M.R. Associations between lipoproteins and the progression of coronary and vein-graft atherosclerosis in a controlled trial with gemfibrozil in men with low baseline levels of HDL cholesterol. **Circulation**, 98:1993–1999, 1998.

TAKAHASHI, M.Y.; YABIKU, H. Corantes naturais: usos, restrições e perspectivas. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, 1(1):246-247, 1992.

TAKAHASHI, M.Y. **Monografia de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade**. 2. ed. São Paulo: Câmara Brasileira do Livro, 1987. p 22-29.

THOMPSON, G.R.; NAOUMOVA, R.; WATTS, G.F. Role of cholesterol in regulating apolipoprotein B secretion by the liver. **Journal of Lipid Research**, 37:439-447, 1996.

TILLY-KIESI, M.; TIKKANEN, M.J. Low density lipoprotein density and composition in hypercholesterolaemic men treated with HMG CoA reductase inhibitors and gemfibrozil. **J Intern Med**, 229:427-434, 1991.

TONG, Q.; DALGIN, G.; XU, H.; TING, C.N.; LEIDEN, J.M.; HOTAMISLIGIL, G. S. Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. **Science**, 290:134-138, 2000.

TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B.M. **Cell**, 79:1147-1156, 1994.

TRUSCOTT, T.G. New trends in photobiology: the photophysics and photochemistry of the carotenoids. **J Photochem Photobiol B**, 6:359-371, 1990.

UGAZ, O.L.S. **Colorantes Naturales**. Fondo Editorial. Lima: Pontificia Universidad Católica del Peru, Lima, 1997.

UGAZ, O.L.S. **Investigación Fitoquímica**. Fondo Editorial. Lima: Pontificia Universidad Católica del Peru, Lima, 1994.

UYVAL, M.; KUTALP, G.; SEÇKIN, S. The effect of cholesterol feeding on lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in the liver of rats. **Int J Vitam Nutr Res**, 58:339-342, 1988.

VALENTE, S. T. X. **Efeito de corantes naturais nos níveis de colesterol e triacilgliceróis séricos em ratos hiperlipidêmicos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 102 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.

VAN VELDHoven, P.P.; MANNAERTS, G.P.; DECLERCQ, P.; BAES, M. Do sphingoid bases interact with the peroxisome proliferator activated receptor A (PPAR-A)? **Cell Signal**, 12:475-479, 2000.

VARRET, M.; RABES, J.P.; VILLEGGER, L.; JUNIEN, C.; BEROUD, C.; BOILEAU, C. Analysis of the 525 point mutation in the human LDL receptor gene database. **Atherosclerosis**, 144:182-183, 1999.

VOSPER H.; KHOUDOLI, G.A.; GRAHAM, T.L.; PALMER, C.N.A. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists, hyperlipidaemia, and atherosclerosis. **Pharmacol Therapeutics**, 95:47-62, 2002.

VU-DAC, N.; SCHOONJANS, K.; LAINE, B.; FRUCHART, J.C.; AUWERX, J.; STAELS, B. Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. **J Biol Chem**, 269:31012–31018, 1994.

VU-DAC, N.; SCHOONJANS, K.; KOSYKH, V.; DALLONGEVILLE, J.; FRUCHART, J.C.; STAELS, B.; AUWERX, J. Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. **J Clin Invest**, 96:741–750, 1995.

VU-DAC, N.; GERVOIS, P.; PINEDA TORRA, I.P.; FRUCHART, J.C.; KOSYKH, V.; KOOISTRA, T.; PRINCEN, H.M.; DALLONGEVILLE, J.; STAELS, B. Retinoids increase human apo C-III expression at the transcriptional level via the retinoid X receptor. Contribution to the hypertriglyceridemic action of retinoids. **J Clin Invest**, 102:625–632, 1998.

XU, H.E.; LAMBERT, M.H.; MONTANA, V.G.; PARKS, D.J.; BLANCHARD, S.G.; BROWN, P.J.; STERNBACH, D.D.; LEHMANN, J.M.; WISELY, G.B.; WILLSON, T.M.; KLIEWER, S.A.; MILBURN, M.V. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. **Mol Cell**, 3:397–403, 1999.

YAMADA, C.S.B. **Racine**, 2:50-56, 1998.

YAMAKOSHI, J.; KATAOKA, S.; KOGA, T.; ARIGA, T. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Atherosclerosis**, 142:139-149, 1999.

YOON, J.C.; CHICKERING, T.W.; ROSEN, E.D.; DUSSAULT, B.; QIN, Y.; SOUKAS, A.; FRIEDMAN, J.M.; HOLMES, W.E.; SPIEGELMAN, B.M. Peroxisome proliferator-activated receptor- δ target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation. **Mol Cell Biol**, 20:5343–5349, 2000.

YOUNG, I.S.; McENENY, J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. **Biochem Soc Transact**, 29:358-362, 2001.

WATTENBERG, L. W.; PAGE, M. A.; LEONG, J. L. Induction of increased benzpyrene hydroxylase activity by flavones and related compounds. **Cancer Res**, 28:934, 1968.

WATTS, G.F.; NAOUMOVA, R.; CUMMINGS, M.H.; UMPLEBY, A.M.; SLAVIN, B.M.; SÖNKEN, P.H.; THOMPSON, G.R. Direct correlation between cholesterol synthesis and hepatic secretion of apolipoprotein B-100 in normolipidaemic subjects. **Metabolism**, 44, 1052-1057, 1995.

WILCOX, L.J.; BORRADAILE, N.M.; DE DREU, L.E.; HUFF, M.W. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. **J Lipid Res**, 42(5):725-43, 2001.

WILLSON, T.M.; BROWN, P.J.; STERNBACH, D.D.; HENKE, B.R. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. **J Med Chem**, 43:527–550, 2000.

WINDLER, E.; CHAO, Y.; HAVEL, R.J. Regulation of the hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins in the rat. Opposing effects of homologous apolipoprotein E and individual C apoproteins. **J Biol Chem**, 255:8303–8307, 1980.

ZAMBON, D.; ROS, E.; RODRIGUEZ-VILLAR, C.; LAGUNA, J.C.; VAZQUEZ, M.; SANLLEHY, C.; CASALS, E.; SOL, J.M.; HERNANDEZ, G. Randomized crossover study of gemfibrozil versus lovastatin in familial combined hyperlipidemia: additive effects of combination treatment on lipid regulation. **Metabolism**, 48:47–54, 1999.

ZECHMEISTER, L.; ESWE, R. B. A stereochemical study of methyl bixin. **J Am Chem Soc**, 66:322, 1994.

ZHAO, L.; GREGOIRE, F.; SOOK SUL, H. Transient induction of ENC-1, a Kelch-related actin-binding protein, is required for adipocyte differentiation. **J Biol Chem**, 275:16845–16850, 2000.

ZHU, Y.; QI, C.; JAIN, S.; RAO, M.S.; REDDY, J.K. Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator- activated receptor. **J Biol Chem**, 272:25500– 25506, 1997.