



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ROSSANE SERAFIM MATOS

**EFEITOS DO RESVERATROL EM MODELO
EXPERIMENTAL DE ATROSELEROSE**

**MESTRADO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE
PUCPR**

PUCPR
CURITIBA
2010

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO BIOLÓGICO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ROSSANE SERAFIM MATOS

**EFEITOS DO RESVERATROL EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ATEROSCLEROSE**

CURITIBA
2010

ROSSANE SERAFIM MATOS

**EFEITOS DO RESVERATROL EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ATEROSCLEROSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como pré-requisito para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Dalton Bertolim
Précoma

CURITIBA
2010

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

M433e Matos, Rossane Serafim
2010 Efeitos do resveratrol em modelo experimental de aterosclerose / Rossane Serafim Matos ; orientador, Dalton Bertolim Précoma. – 2010.
86 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2010
Bibliografia: f. 77-82

1. Sistema cardiovascular - Doenças. 2. Aterosclerose. 3. Alimentos funcionais. I. Précoma, Dalton Bertolim. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 610



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos vinte e nove dias do mês de novembro de 2010, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação "EFEITOS DO RESVERATROL EM MODELO EXPERIMENTAL DE ATEROSCLEROSE" apresentada por **ROSSANE SERAFIM MATOS** para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Dalton Bertolim Precoma PUCPR - Presidente	
Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita Souza PUCPR	
Profª. Drª. Gilberti Helena Hubscher Lopes UFSM	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Dalton Bertolim Precoma

Conceito: Aprovado

Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita Souza

Conceito: Aprovado

Profª. Drª. Gilberti Helena Hubscher Lopes

Conceito: Aprovado

Conceito Final: Aprovado

Observações da Banca Examinadora:

A título final, será concedido após a publicação do artigo

Prof. Dr. Dalton Bertolim Précoma
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho
Coordenador do PPGCS PUCPR

DEDICATÓRIA

Dedico esta monografia a memória dos meus queridos pais, que me guiaram pelos caminhos corretos, me ensinaram a fazer as melhores escolhas, e que devemos sempre lutar pelo que queremos.

A meus irmãos e irmãs, exemplos de garra, coragem e esperança, a quem tenho a honra de chamar de minha linda família.

Arnaldo, a você que está comigo em cada passo da vida, certo ou errado, sempre me apoiando, motivando e ensinando a ser uma pessoa melhor.

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu refúgio e força, onde sempre encontrei respostas para os meus problemas, que me iluminou e me deu forças, que me ajudou a não desistir diante das barreiras.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Dalton Bertolim Précoma, por seu amor e compromisso com os homens, pelo empenho, paciência e credibilidade, obrigada por tudo.

Ao meu marido Arnaldo, que, com muito carinho e apoio, não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Além, é claro, das palavras de acalento que fizeram – com que mesmo na adversidade – eu me doasse “de corpo e alma” ao meu objetivo maior: o estudo científico desse trabalho;

E agradeço, particularmente, a algumas pessoas pela contribuição direta na construção deste trabalho:

Ao Dr. Ruy Fernando Kuenzer Caetano da Silva, que com sua competência cirúrgica e dedicação, auxiliou-me na execução de uma parte fundamental do trabalho;

À Prof. Dra. Lúcia de Noronha, responsável pelo laboratório de patologia experimental, pela estimável contribuição no desenho do estudo e nas leituras histológicas;

Ao apoio do mestre e amigo Manoel Carlos Toth Quintilham que me ajudou na direção dos meus passos.

À professora Márcia Olandoski pela paciência na orientação e incentivo que tornou possível a conclusão deste trabalho.

Aos colegas da linha de pesquisa: Olimpio Franca, Alexandra Moro Caporal, Cristiane Campos, Leonardo Précoma, Mariane Vargas Basso pelo importante auxílio em diversas etapas do estudo e a Flávia Larissa Kaiber meu agradecimento especial.

Aos meus colegas de trabalho da Nutrimedical pela compreensão de minha ausência no ambiente de trabalho e pelas palavras amigas.

À minha grande amiga Camila R. Prim, meu eterno agradecimento pelo incentivo e apoio constantes, que me fez acreditar que nada é impossível.

RESUMO

A doença aterosclerótica é responsável pela maioria dos óbitos em países industrializados e em desenvolvimento. Essa doença resulta de um mecanismo complexo e dinâmico que envolve excessiva resposta inflamatório-proliferativa a partir de várias formas de lesão endotelial e da musculatura lisa da parede arterial. Conhecer a interação entre os fatores de risco e as funções do endotélio vascular na gênese da aterosclerose é um importante recurso na busca de substâncias potencialmente capazes de bloquear ou retardar o desenvolvimento e progresso da doença. Nesse contexto a observação do fenômeno que ficou conhecido como “Paradoxo Francês” legitimou a ação protetora contra a aterosclerose de alguns componentes da dieta, dos quais fazem parte o resveratrol. Evidências clínicas enfatizam que o resveratrol apresenta efeitos cardioprotetores em virtude de suas propriedades antiinflamatórias, antioxidantes e anti agregação plaquetária, além de ser um potente vasodilatador. O presente estudo teve como objetivo avaliar os potenciais efeitos hipolipêmicos, anti-aterogênicos e antiinflamatórios do resveratrol em um modelo experimental com coelhos submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica com ovo liofilizado à 1% de colesterol. Para a realização do experimento, que teve duração de 8 semanas foram utilizados 20 coelhos machos da linhagem *New Zeland*. Os animais foram randomizados aleatoriamente em 2 grupos, com 10 animais em cada grupo, conforme o tratamento dietético recebido. O grupo G1 (controle) e o grupo G2 (resveratrol) receberam durante todo o período de experimentação a dieta padrão Nuvilab® acrescida a 1% de colesterol proveniente do ovo liofilizado. A partir da 5ª até a 8ª semana, o grupo resveratrol recebeu diariamente 2mg/kg de peso/dia. Amostras de sangue foram coletadas no momento inicial e no final para dosagens de CT, LDL – C, HDL – C e triglicérides. Os animais foram levados à eutanásia no quinquagésimo sexto dia para a remoção da aorta descendente. Os segmentos aórticos foram encaminhados para a análise histológica quantitativa e qualitativa e para análise imunohistoquímica. A oferta de resveratrol não influenciou nos níveis séricos de lipídios dos animais de forma significativa. Porém, os animais que receberam resveratrol apresentaram lesões ateroscleróticas menos avançadas quando comparadas com o grupo controle. Foram encontradas evidências estatísticas significativas para a área da camada íntima e razão íntima/média dos segmentos aórticos em ambos os grupos. A concentração de VCAM – 1, MCP-1 e IL-6 mostraram-se significativamente menor nos animais do grupo resveratrol. A administração do resveratrol não apresentou ação hipolipemiante, porém, apresentou efeitos antiinflamatórios e na prevenção da progressão da lesão aterosclerótica.

Palavras-chave: Doenças cardiovasculares. Alimentos funcionais. Resveratrol.

ABSTRACT

Atherosclerosis is responsible for most deaths in industrialized and developing countries. This disease results from a complex and dynamic mechanism that involves excessive and proliferative inflammatory response from several forms of endothelial and smooth muscle injury of arterial wall. To understand the interaction between risk factors and functions of vascular endothelium in atherogenesis is an important resource in the search for substances that can potentially block or delay the development and progress of atherosclerosis. In this context, the observation of the phenomenon known as the "French Paradox" legitimized the protective action against atherosclerosis of some dietary components, like resveratrol. Clinical evidences emphasize that resveratrol has cardioprotective effects due to its anti-inflammatory, antioxidant and anti platelet agregation properties, and is a potent vasodilator. The present study was aimed to evaluate the potential lipid-lowering, anti-atherogenic and anti-inflammatory effects of resveratrol in an experimental animal model with rabbits fed a hipercholesterolemic diet with liofilized egg (1% cholesterol). Twenty male rabbits (New Zealand) were used in this 8 weeks experiment. The animals were randomized in 2 groups: group I (control group); 10 animals, and group II (resveratrol group); 10 animals. Both groups were fed a especific diet (Nuvilab) plus 1% cholesterol from liofilized egg. From fifth to eighth weeks, the resveratrol group received 2mg/kg day of resveratrol. Blood samples were collected at baseline and in the end of the experiment to assess total cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C), LDL-cholesterol (LDL-C) and triglycerides. The animals were sacrificed in the fifty sixth day for removal of the descending aorta. The aortic segments were sent to quantitative and qualitative histological analyses and immunohistochemistry. Resveratrol did not influence significantly the serum lipid levels. The animals that received resveratrol had atherosclerotic lesions less advanced when compared with animals from control group. Significant statistic difference was found between intima layer area and intima/media ratio between groups. VCAM-1, MCP-1, and IL-6 levels were significantly lower in resveratrol group. Resveratrol showed no lipid-lowering action, however showed anti-inflammatory effects and prevented the progression of atherosclerotic lesions.

Keywords: Cardiovascular illnesses. Functional foods. Resveratrol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Estrutura química dos isômeros trans – resveratrol e cis resveratrol....	23
Figura 02 – Caixa que auxilia no procedimento anestésico dos animais.....	32
Figura 03 – Localização da artéria descendente para remoção.....	33
Figura 04 – Aorta descendente removida do animal.....	33
Figura 05 – Pinças do tipo punch.....	37
Figura 06 – Mapa que orienta a confecção do bloco receptor.....	37
Figura 07 – Mapa em plano cartesiano do TMA controle.....	38
Figura 08 – Concentração plasmática de CT observada no grupo controle e no grupo resveratrol.....	42
Figura 09 – Concentração plasmática de LDL- C observada no grupo controle e no grupo resveratrol.....	43
Figura 10 - Concentração plasmática de HDL – C observada no grupo controle e no grupo resveratrol.....	44
Figura 11 - Concentração plasmática de TGL observada no grupo controle e no grupo resveratrol.....	44
Figura 12 – Grau de lesão aterosclerótica na aorta descendente dos coelhos estudados.....	45
Figura 13 – Cortes histológicos da aorta descendente dos animais estudados.....	46
Figura 14 – Área da camada íntima da aorta descendente dos grupos estudados..	47
Figura 15 – Área da camada média da aorta descendente dos grupos estudados..	47
Figura 16 – Área da camada íntima do arco aórtico positiva para VCAM nos grupos estudados.....	48
Figura 17 - Fotomicrografia do segmento da aorta descendente de coelhos.....	49
Figura 18 – Áreas positivas para MCP-1 dos grupos estudados.....	50
Figura 19 – Fotomicrografia do segmento do arco aórtico de coelhos.....	51
Figura 20 – Áreas positivas para IL-6 dos grupos estudados.....	51
Figura 21 – Fotomicrografia do segmento do arco aórtico de coelhos.....	52
Figura 22 - Mecanismo antioxidante na prevenção da aterosclerose.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Demonstrativo do delineamento experimental.....	28
Tabela 02 – Grau de lesão aterosclerótica de acordo com os critérios classificatórios.....	35
Tabela 03 – Valores médios, medianos, mínimos e máximos para colesterol total nos grupos estudados.....	41
Tabela 04 - Análise dos valores médios de LDL – C nos grupos estudados.....	43
Tabela 05 – Valores médios, medianos, mínimos e máximos para TG dos grupos estudados.....	45
Tabela 06 – Valores médios, mínimos e máximos das áreas da camada média, da camada íntima dos grupos estudados.....	48
Tabela 07 – Valores médios, medianos, e desvio padrão da presença de VCAM nos segmentos aórticos estudados.....	49
Tabela 08 – Valores médios, medianos, e desvio padrão da presença de MPC-1 nos segmentos aórticos estudados.....	51
Tabela 09 – Valores médios, medianos, e desvio padrão da presença de IL - 6 nos segmentos aórticos estudados.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGP	Ácidos graxos poliinsaturados
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CT	Colesterol Total
DAB	Dakocytomation
DCI	Doença cardíaca isquêmica
ELAM – 1	Molécula de adesão endotelial
EMMPRIN	Indutor extracelular de matriz metaloproteinase
GSH	Glutathiona
HDL-C	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina – eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IAM	Infarto agudo do miocárdio
ICAM - 1	Molécula de adesão intercelular
IL – 1	Interleucina 1
IL – 6	Interleucina 6
LDL – C	Lipoproteína de baixa densidade
LDH	Lactato desidrogenase
MCP – 1	Proteína de quimioatração dos monócitos
MCS-F	Fatores estimuladores de colônia monocitária
MMP	Metaloproteinase
MTT	Metiltiazol tetrazólio
NO	Óxido Nítrico
OH	Hidroxila
OxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
O ₂	Superóxido
PECAM	Molécula de adesão plaqueta endotelial
PPAR	Receptores de atividade e proliferação dos peroxisomos
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
PVPI	Polivinil pirrolidona iodo
RO	Radicais Livres
ROS	Espécies reativas de oxigênio

RV	Resveratrol
SOD	Superóxido dismutase
TG	Triglicérides
TMA	Tissue Microarray
TNF – alfa	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM – 1	Molécula de adesão celular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 LESÃO ATEROSCLERÓTICA.....	16
2.2 MOLÉCULA DE ADESÃO.....	18
2.2.1 Integrinas	18
2.2.2 Selectinas	19
2.2.3 Imunoglobulinas	19
3 ALIMENTOS FUNCIONAIS	19
3.1 ORIGEM DOS ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	20
3.2 SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS.....	21
4 RESVERATROL	22
4.1 RESVERATROL NA ATEROSCLEROSE E MECANISMOS DE AÇÃO.....	23
4.1.1 Radicais Livres	24
4.1.2 Atividades Antioxidantes e Antiaterogênicas do Resveratrol	24
5 OBJETIVOS	26
5.1 OBJETIVO GERAL.....	26
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
6 MATERIAS E MÉTODOS	27
6.1 MATERIAIS.....	27
6.2 METODOLOGIA.....	27
6.2.1 Delineamento experimental	27
6.2.2 Desenho do estudo	29
6.2.3 Ambiente de Experimentação	30
6.2.4 Preparo da Ração Suplementar	31
6.2.5 Aferições	31
6.2.6 Normas Adotadas	31
6.3 COLETA DE AMOSTRAS.....	31
6.3.1 Sangue	31
6.3.2 Remoção das Artérias	32
6.4 AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS.....	34

6.4.1 Preparo das amostras	34
6.4.2 Análise histológica qualitativa	35
6.4.3 Análise Morfométrica quantitativa	36
6.4.4 Análise Imunohistoquímica	36
6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
7 RESULTADOS	41
7.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	41
7.2 VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS.....	41
7.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	45
7.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	46
7.5 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	48
8 DISCUSSÃO	53
8.1 EFEITO DO RESVERATROL NAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS ANÁLISADAS	53
8.2 EFEITO DO RESVERATROL NA PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE.....	57
8.3 EFEITO DO RESVERATROL NO PROCESSO ANTIINFLAMATÓRIO.....	60
9 CONCLUSÃO	64
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	71
ANEXO A – LAUDO TÉCNICO DO RESVERATROL UTILIZADO NA PESQUISA.....	72

1 INTRODUÇÃO

A aterosclerose, principal causa de Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), Acidente Vascular Cerebral (AVC) e Doença arterial periférica é responsável pela maioria das mortes nos países industrializados e em desenvolvimento ¹. A doença resulta de um mecanismo complexo e dinâmico que envolve excessiva resposta inflamatório-proliferativa a partir de várias formas de lesão endotelial e da musculatura lisa da parede arterial. O processo compreende uma série de fatores de crescimento, citocinas e moléculas vasoativas. O conhecimento das etapas iniciais da doença facilita o diagnóstico precoce, bem como o desenvolvimento de agentes terapêuticos capazes não só de regredir os estágios da lesão, mas também de prevenir sua formação ².

O endotélio em condições normais desempenha funções capazes de regular a resposta vascular às agressões à superfície arterial. No entanto, quando submetido a fatores de risco como a hipercolesterolemia e outras desordens que levam a aterosclerose, manifesta redução da atividade do óxido nítrico (NO) decorrente da diminuição de síntese ou aumento da degradação. A menor atividade do NO favorece a vasoconstricção, adesão e agregação plaquetárias, aderência de monócitos, proliferação celular e geração de radicais livres ³.

A deposição de leucócitos sobre o endotélio e sua penetração no espaço subendotelial é mediada por moléculas de adesão, expressas tanto por células endoteliais, quanto por células circulantes. Entre as moléculas de adesão se destacam a VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*), a ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*), a E-selectina tida como molécula de adesão da fase aguda, e a ELAM-1 (*endothelial leukocyte adhesion molecule*). A secreção de moléculas de adesão é regulada por citocinas como interleucina-1 (IL-1), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6) e o TNF-alfa (fator de necrose tumoral-alfa) sintetizadas pelo endotélio arterial e cuja concentração se eleva na vigência de disfunção endotelial. Um fator importante para migração de monócitos é exercido pela MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), um poderoso agente quimiotático de linfócitos T produzido pela molécula de LDL-C oxidada.

A mudança de estilo de vida que inclui prática regular de exercícios e controle alimentar é o principal fator modificador na história natural das doenças cardiovasculares ⁴. Nesse contexto, alguns alimentos considerados funcionais, têm a propriedade de proteger lipídios, proteínas e DNA celular do processo oxidativo ⁵. Uma adequada proteção antioxidante seria responsável por inibir os processos ateroscleróticos bem como suas complicações.

Conhecer a interação entre os fatores de risco e as funções do endotélio vascular na gênese da aterosclerose é um importante recurso na busca de substâncias potencialmente capazes de bloquear ou retardar o desenvolvimento e progresso da doença. Nesse contexto a observação do fenômeno que ficou conhecido como “Paradoxo Francês” legitimou a ação protetora contra a aterosclerose de alguns componentes da dieta ⁶. De acordo com essa teoria o consumo moderado de vinho tinto está associado à menor ocorrência de doenças cardiovasculares ⁷. Isso porque a bebida apresenta altas concentrações de resveratrol, um flavonóide abundante na uva, na amora, no amendoim e em outras espécies de plantas ^{8, 9}. Seu potencial biológico é bastante amplo e inclui propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, antiagregantes, entre outras.

A ação antioxidante está diretamente ligada à sua estrutura molecular cujos grupamentos hidroxila funcionam como aceptores de radicais livres ¹⁰. Nesse contexto uma de suas principais funções é a de impedir a oxidação da molécula de LDL-C e evitar a formação de histiócitos subendoteliais ^{11, 12}. Em células tratadas com resveratrol observou-se inibição da expressão de TNF-alfa e consequente diminuição da expressão da molécula quimiotática MCP-1 ¹³. Além disso, a substância polifenólica que tem ação antiinflamatória inibe a síntese de prostaglandinas, entre outras, a IL-6 e com isso regula a expressão de moléculas de adesão como a ICAM-1 ¹⁴. Em modelo animal a administração oral de resveratrol por 2-3 semanas se mostrou tão eficaz, quanto o pré-tratamento com resveratrol na redução da área de infarto do miocárdio ex vivo, e melhora da função ventricular esquerda após lesão por isquemia/reperfusão *in vivo* ¹⁵. Redução do estresse oxidativo, da apoptose e aumento da formação capilar são mecanismos propostos para proteção cardiovascular exercida pelo resveratrol.

Observam-se, na literatura científica, vários estudos que relatam a propriedade do resveratrol na redução das concentrações de colesterol total e LDL – colesterol, assegurando, dessa forma um efeito cardioprotetor. Porém, é de extrema importância analisar em protocolos experimentais os efeitos do resveratrol nas moléculas de adesão e citocinas inflamatórias, envolvidas no processo aterosclerótico, com o intuito de perceber a atividade antiinflamatória do resveratrol, assim como também, estabelecer sua dosagem terapêutica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LESÃO ATEROSCLERÓTICA

O processo aterosclerótico se caracteriza por uma cascata de eventos que envolvem desde o dano tissular até a formação da placa madura. A lesão ocorre principalmente em grandes e médias artérias elásticas e musculares e pode levar a isquemia cardíaca, cerebral e de extremidades ocasionando infartos. O aumento do colesterol no plasma, em particular do LDL-C, consiste no principal fator para gênese do processo e contribui com isso para o aparecimento das doenças cardiovasculares. Por outro lado, a doença aterosclerótica envolve, além do acúmulo de lipídios, uma série de respostas celulares e moleculares que caracterizam a gênese oxidativo inflamatória da patologia ¹⁶.

Nesse contexto, o dano endotelial figura como etapa inicial e primordial para o desenvolvimento da doença. As possíveis causas da disfunção endotelial incluem elevado e modificado padrão de LDL-C; aumento dos radicais livres ocasionado pelo tabagismo, hipertensão e *diabetes mellitus*; predisposição genética; elevada concentração de homocisteína sérica; infecções por microorganismos, entre outros ¹⁷.

A partir da agressão inicial, a resposta proliferativa da parede arterial, por meio da migração, da proliferação e da atividade das células da camada muscular lisa, leva ao desenvolvimento da placa. Esse processo apresenta características inflamatórias com infiltração mono e linfocitária. A oxidação das

lipoproteínas no espaço subendotelial, outro importante fator para o surgimento da placa, legitima a hipótese oxidativa da aterogênese ¹.

Segue-se à disfunção endotelial, o maior aprisionamento de LDL-C no espaço subendotelial, bem como o aparecimento de moléculas de adesão leucocitária no endotélio, em particular a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) nos estágios iniciais. O início da oxidação do LDL-C aprisionado se dá em função de produtos oxidativos das células da parede arterial, como o endotélio, células musculares lisas e macrófago. Nesse estágio de oxidação leve, a fração proteica não é alterada mantendo-se íntegra a apolipoproteína-B. O endotélio apresenta maior adesão de monócitos em função do aumento da expressão das moléculas de adesão e de proteínas quimiotáticas de monócitos como a MCP-1. Além disso, há o aumento dos fatores estimuladores de colônia monocitária (MCS-F), que potencializam a transformação de monócitos em macrófagos, os quais têm alto poder oxidativo e progride a oxidação. A partir da alteração da fração proteica da lipoproteína, a molécula é dita oxidada e passa a ser reconhecida por receptores “*scavenger*” e CD-36 na superfície dos macrófagos ¹.

O aparecimento das células espumosas, macrófagos ricos em conteúdo lipídico, caracteriza as estrias de gordura, lesão mais precoce do processo de aterosclerose. Outra importante ação da LDL oxidada é a produção de interleucina-1, que estimula a migração e a proliferação de células musculares lisas da camada média. Tais células ao migrarem, passam a produzir não só citocinas e fatores de crescimento como também a matriz extracelular, que formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica madura ¹.

A evolução da lesão aterosclerótica é lenta e ao longo do processo apresenta diferentes padrões que a caracterizam anatomopatologicamente. As lesões ateroscleróticas representam uma proteção inflamatório-fibroproliferativa em resposta aos diferentes agentes causadores da doença. Com o insulto crônico a resposta se torna excessiva e caracteriza o processo da doença. Agir sobre os variados fatores de risco é uma forma de inverter a resposta exacerbada do organismo. Abordagens específicas para modificar interações celulares, fatores de crescimento ou moléculas sinalizadoras intracelulares podem assegurar a oportunidade de prevenção, ou regressão da doença.

2.2 MOLÉCULAS DE ADESÃO

Grande parte do processo de aterosclerose se dá a partir da infiltração de células da circulação sanguínea para locais específicos do endotélio. A quimiotaxia e a adesão leucocitária às células endoteliais figuram como denominadores comuns dentre os fatores de risco para a doença. Nesse contexto se observa a ação efetiva de um grupo de moléculas conhecidas como moléculas de adesão responsáveis pelas complexas interações entre glicoproteínas da superfície dos leucócitos e seus correspondentes receptores nas células endoteliais. Tais moléculas participam ativamente de processos como migração celular, sinalização e aderência. Encontram-se aumentadas nos processos inflamatórios agudos e crônicos, e atualmente algumas delas são consideradas importantes marcadores da evolução da doença aterosclerótica. A compreensão dos mecanismos em que atuam esse grupo de moléculas possibilita a intervenção terapêutica precoce no processo de aterosclerose ¹⁸.

As moléculas de adesão podem ser divididas em três grupos: a família das selectinas (ELAM-1; GMP-140; LECCAM), as integrinas (LFA-1, MAC-1) e a superfamília das imunoglobulinas (ICAM-1 e VCAM).

2.2.1 Integrinas

As moléculas de integrinas são heterodímeros unidade alfa e beta ligadas não covalentemente. A combinação entre as unidades formam os diversos tipos de integrinas existentes. Essas moléculas contêm uma porção externa à célula e uma transmembrana com parte dessa já intracitoplasmática que se liga a componentes do citoesqueleto celular. Determinadas de acordo com a superfamília, a distribuição celular e o tipo de lesão em que aparecem são particulares. As integrinas beta-1 têm ação de adesão celular a proteínas de matriz extracelular, as beta-2 são exclusivas de leucócitos interagem com fibrinogênio e imunoglobulinas. Já as beta-3 quando ativadas agregam plaquetas pela adesão com o fibrinogênio, a fibronectina e o fator de von Willebrand. Tanto as integrinas beta-1, quanto as beta-3 estão relacionadas à

fisiopatologia da aterosclerose pela expressão em moléculas como fibronectina, fibrinogênio, tromboplastina, vitronectina, laminina e colágeno tipo I¹⁹.

2.2.2 Selectinas

Dentre as moléculas de adesão as selectinas realizam o primeiro passo da adesão de leucócitos ao endotélio por apresentarem ligações de baixo grau de aderência e rápida ativação-desativação o que permite o rolamento de leucócitos sobre esse tecido. Atuam principalmente no mecanismo de interação leucócito- endotélio²⁰.

A L – selectina característica de leucócitos imaturos é o primeiro mediador, se liga aos receptores endoteliais de forma inespecífica e transitória. Ao ativar o leucócito, a L – selectina se desprende da membrana celular e em seguida é substituída por molécula de integrina²⁰.

A E- selectina é expressa em células endoteliais já estimuladas por outras citocinas como a interleucina-1 (IL-1), ou fator de necrose tumoral (TNF-alfa), de quatro a seis horas após ativação. Reconhece células como granulócitos, monócitos ou linfócitos T de memória. A molécula P-selectina, também, é expressa pelo endotélio que já sofreu ativação pelas moléculas inflamatórias²⁰.

2.2.3 Imunoglobulinas

Essas moléculas têm como função principal reconhecimento de integrinas de leucócitos e plaquetas além de transdução de sinais intracelulares. Compõe esse grupo molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular-1 e 2 (ICAM-1 e ICAM-2) e molécula de adesão plaqueta-endotelial(PECAM). A subfamília VCAM-1 serve como ligante de integrinas e é ativada por IL-1 e TNF- alfa²⁰.

3 ALIMENTOS FUNCIONAIS

A portaria nº 398 de 30/04/99, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde no Brasil fornece a definição legal de alimento funcional: "todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos á saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica ²¹."

Esses produtos podem variar de nutrientes isolados, compostos de biotecnologia, suplementos dietéticos, alimentos geneticamente construídos até alimentos processados e derivados de plantas. Alguns parâmetros devem ser observados com relação aos alimentos funcionais. Dentre esses o efeito metabólico, ou fisiológico que contribui para a saúde física e para a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas. Além disso, é indispensável que tais alimentos integrem a dieta usual e a partir disso proporcionem efeitos positivos em quantidades não tóxicas ²².

3.1 ORIGEM DOS ALIMENTOS FUNCIONAIS

A baixa incidência de doenças em alguns povos chamou a atenção para a sua dieta. Os esquimós, com sua alimentação baseada em peixes e produtos do mar ricos em ômega 3 e 6, têm baixo índice de problemas cardíacos, assim como os franceses consumidores de vinho tinto. Os orientais, devido ao consumo de soja, que contém fitoestrogênios, têm pouco câncer de mama. Nesses países o costume de consumir frutas e verduras também resulta em uma redução do risco de doenças coronarianas e de câncer, comprovada por dados epidemiológicos ²³.

O termo alimentos funcionais foi inicialmente introduzido pelo governo do Japão em meados dos anos 1980, com o propósito de desenvolver alimentos saudáveis à população que envelhecia ²⁴.

Alimento funcional é aquele semelhante em aparência ao alimento convencional, consumido normalmente, capaz de produzir efeitos metabólicos ou fisiológicos desejáveis na manutenção da saúde. Adicionalmente as suas funções nutricionais, como fonte de energia e de substrato para a formação de

células e tecidos, possui, em sua composição, uma ou mais substâncias capazes de agir no sentido de modular os processos metabólicos. Estes atuam melhorando as condições de saúde, prevenindo o aparecimento precoce de doenças degenerativas, que levam a uma diminuição da longevidade ²⁴.

Nesse contexto, o termo “nutracêutico introduzido em 1989, foi criado para tentar diferenciar os alimentos funcionais dos medicamentos. Nutracêuticos podem ser definidos como componentes ou nutrientes isolados que apresentam propriedades funcionais. No contexto dessa pesquisa, a uva seria o alimento funcional, enquanto que o resveratrol é o nutracêutico ²⁴.

3.2 SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

Substâncias fenólicas, especialmente polifenóis com vários grupos hidroxila diretamente associados ao anel benzênico cíclico são amplamente distribuídas em plantas. Os mais importantes compostos fenólicos são os ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos), os polifenóis e os flavonóides. Tais elementos são responsáveis pelo sabor amargo e adstringente da maioria dos alimentos e bebidas que os contém. Os taninos, de alto peso molecular, estão presentes nos vinhos e dão o sabor adstringente. Os de baixo peso molecular tendem ao sabor amargo ²⁵.

A composição fenólica do vinho é particularmente alta (0,01% em branco e até 0,2% em vinhos tintos) e tem recebido atenção especial devido à hipótese de que os polifenóis podem apresentar benefícios à saúde. Várias propriedades químicas e biológicas dos efeitos dietéticos dos polifenóis podem estar envolvidas na defesa contra o risco de doenças cardiovasculares. A capacidade de diminuir a taxa de eventos obstrutivos, isquêmicos pode ser atribuída em parte à propriedade de retardar os eventos iniciais da doença aterosclerótica, bem como sua progressão. São propostos diversos mecanismos de ação para os polifenóis sobre o organismo humano, sendo que alguns não estão ainda bem definidos. De acordo com estudos, dietas ricas em polifenóis apresentam ação antiproliferativas, antioxidante e propriedades antiinflamatórias, além de atuarem sobre a regulação de óxido nítrico no endotélio vascular ²⁵.

Dentre os inúmeros polifenóis conhecidos, o mais pesquisado quanto às propriedades biológicas é o Resveratrol (RV). Isso porque na década de noventa pesquisadores apresentaram a comunidade científica um conceito baseado em estudos epidemiológicos conhecido como Paradoxo Francês. Nesse contexto, Renaud et al (1992)⁵, em estudo da Organização Mundial de Saúde (projeto MONICA), evidenciaram que a incidência de doença cardíaca isquêmica (DCI) é menor na França do que em outros países industrializados, apesar de naquele país a dieta ser rica em gorduras e a incidência de fumantes na população alta, evidenciando-se todos os fatores de risco: consumo de gordura saturada, nível de colesterol sérico, pressão arterial, índice de massa corporal, tabagismo e sedentarismo. Isso foi atribuído ao consumo regular de vinho pelos franceses e ao potencial efeito protetor dos componentes fenólicos contidos na bebida.

4 RESVERATROL

Resveratrol, ou 3, 5,40-trihydroxy-trans-estilbeno é um composto natural da família das fitoalexinas que está presente em maior quantidade na uva, além de inúmeras outras plantas. De acordo com estudos, a molécula apresenta uma variedade bastante ampla de atividades biológicas principalmente relacionadas a problemas de saúde crônicos como câncer e aterosclerose, além de abrandar fatores ligados ao envelhecimento. Dentre as principais propriedades da substância a atividade antioxidante tem sido relatada com maior ênfase. O composto age contra a peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipossomas, se caracteriza também como um potente inibidor da lipoxigenase, e é capaz de proteger ratos de lesão cardíaca por reperfusão após isquemia. A atividade antioxidante do resveratrol é relacionada com os seus grupos hidroxila (OH) capazes de reagir com os radicais livres produzidos *in vivo*²⁶.

O Resveratrol (RV) é sintetizado quase que inteiramente na casca das uvas, sendo que o pico de produção ocorre pouco antes de a fruta atingir maturidade. O terminal enzimático estilbeno sintetase é ativado para biossíntese da substância em resposta a fatores de estresse exógenos como

raios UV, infecções fúngicas. Os níveis de RV atingem pico máximo aproximadamente 24h após exposição aos fatores agressores, declinam cerca de 42 a 72h após ter sido ativada a estilbeno oxidase. Os níveis de RV são bastante variáveis, e estão diretamente ligados ao tipo da uva e ao fator exógeno a que estão expostas. Sendo assim as concentrações do flavonóide encontradas nos vinhos são diferentes, uma vez que dependem de fatores como a região produtora da uva, e da época da colheita. Além disso, o processo de produção da bebida também afeta a concentração final do trans-resveratrol os níveis aumentam com maior temperatura, altos índices de SO₂, ou baixo pH²⁶.

O RV existe em duas isoformas, cis - e trans-resveratrol (figura 01), sendo essa última mais amplamente estudada, embora o cis-resveratrol também possa possuir propriedades promotoras da saúde. No vinho tinto o resveratrol pode também ser encontrado em parte como resveratrol-glucósideo. De acordo com estudos a absorção intestinal de RV é baixa, a concentração da substância é maior no sangue e o metabolismo hepático. Apresenta meia-vida curta 8 a 14min para a molécula inicial²⁷.

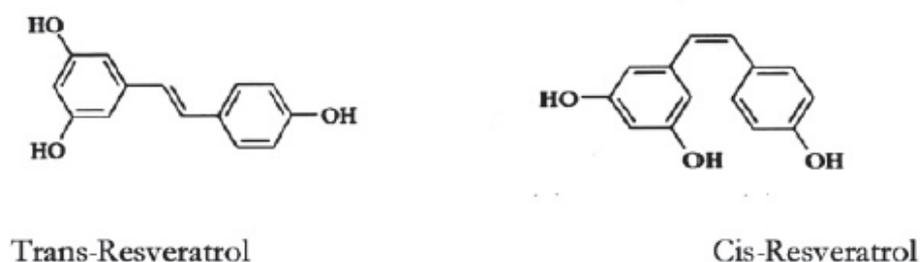


Figura 01 – Estrutura química dos isômeros trans – resveratrol e cis – resveratrol.
Fonte: Adaptado de Soleas (1997)²⁷.

4.1 RESVERATROL NA ATEROSCLEROSE

O RV protege o sistema cardiovascular e por um grande número de mecanismos atenua os danos ocasionados pelas lesões de reperfusão pós-isquemia, promove vaso relaxamento à custa do NO, apresenta atividade

antiinflamatória sobre o endotélio, inibe a oxidação da fração LDL-C, além de agir na supressão da agregação plaquetária ²⁵.

4.1.1 Radicais Livres

O metabolismo celular normal gera uma série de moléculas reativas a partir do oxigênio, conhecidas como radicais livres (RO). Dentre essas o superóxido (O₂⁻), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e o radical hidroxila (OH). O equilíbrio fisiológico entre oxidantes e antioxidantes é regulado a partir da produção de enzimas intracelulares tais como a glutathiona (GSH), a superóxido dismutase (SOD), e a catalase capazes de neutralizar a ação dos RO. O acúmulo anormal de moléculas oxidantes ocasiona o estado de estresse oxidativo. A ação dos RO tem grande potencial deletério e modificador sobre macromoléculas (lipídios, proteínas, e ácidos nucleicos). Um bom exemplo é o da modificação oxidativa de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) implicada na aterosclerose e no aumento da incidência de doença coronariana. Considerando que a endocitose normal das moléculas de LDL é estreitamente regulamentada, uma vez oxidada a LDL passa a apresentar um sistema receptor *scavenger* não regular, o que gera um acúmulo anormal de LDL nos monócitos subendoteliais, as chamadas células espumosas. As lipoproteínas oxidadas passam fornecer um ambiente permissivo para a formação do ateroma e agregação plaquetária, o que estimula o processo de aterosclerose ²⁸.

4.1.2 Atividade Antioxidante e Antiaterogênica do Resveratrol

Os compostos fenólicos presentes no vinho apresentam atividade antioxidante e antiaterogênica por prevenir a oxidação do LDL-C. Dados epidemiológicos demonstram que a ingestão moderada de vinho tem uma relação positiva com a diminuição no risco de doença arterial coronariana. Dentre os polifenóis o RV é o mais potente inibidor da oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados (AGP) componentes do LDL-C. Num estudo em ratos o

RV mostrou ação protetora sobre a peroxidação de lípidos plasmáticos e oxidação da membrana de eritrócitos induzida pelo agente oxidante bromato de potássio (KBrO₃)¹¹.

Outra importante ação do RV está em proteger o endotélio dos danos ocasionados pela oxLDL²⁹. Isso porque quando expostas à molécula de oxLDL as células endoteliais ativam o processo de apoptose a partir da redução do potencial transmembrana mitocondrial, concomitante a liberação da proteína mitocondrial citocromo-c e subsequente ativação da caspase-3 o que culmina na morte celular. A ação benéfica do RV foi comprovada a partir de um estudo com células endoteliais provenientes de veia umbilical humana. Tais células foram expostas a moléculas de LDL-C oxidadas, cuja toxicidade, sobre as células endoteliais, foi avaliada a partir da dosagem da liberação de lactato desidrogenase (LDH), metiltiazol tetrazólio (MTT) e morte de células apoptóticas. Avaliou-se também a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) com o uso de sonda fluorescente e diclorofluoreceína. Além disso, observou-se o aumento de vários sinalizadores celulares de apoptose como cálcio citossólico, alteração do potencial de membrana mitocondrial, liberação de citocromo-c e liberação de caspase-3. De acordo com esse estudo, o RV demonstrou atenuar a citotoxicidade induzida pela molécula de oxLDL com a diminuição das vias sinalizadoras de apoptose, do cálcio intracelular e do acúmulo de ROS. Nas células pré-tratadas com RV houve menos alteração do potencial de membranas mitocondriais, expressão de citocromo-c e ativação de caspase-3, vias importantes do processo de apoptose celular³⁰.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é avaliar os potenciais efeitos hipolipídicos, antiinflamatórios e anti-aterogênicos do resveratrol em um modelo experimental com coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica a 1%.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- * Verificar o perfil bioquímico dos dois grupos de coelhos que receberam a dieta hipercolesterolêmica suplementada ou não com resveratrol;
- * Comparar histologicamente as lesões ateroscleróticas dos dois grupos estudados;
- * Avaliar a presença de moléculas de adesão e citocinas inflamatórias nos segmentos aórticos dos animais estudados.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 MATERIAIS

Os materiais permanentes e parte do material de consumo foram disponibilizados pelo Laboratório de Cirurgia Experimental do Hospital Angelina Caron, pelo Laboratório de Patologia Experimental e pelo Biotério Central, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). O material de consumo restante foi adquirido pelos pesquisadores.

O Resveratrol® Extract do Laboratório Galena® (ANEXO A) foi cedido pela farmácia de manipulação Farmadoctor - Comércio de Medicamentos, que disponibilizou o medicamento em suspensão (xarope) com concentração de 10%, para facilitar a administração. Foram utilizados 200 gramas da suspensão, contendo 20 gramas de resveratrol e outros componentes utilizados para a formulação do xarope (ANEXO B).

6.2 METODOLOGIA

6.2.1 Delineamento Experimental

Estudo experimental realizado no biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, após aprovação do protocolo pela Comissão Ética em Pesquisa nº 138 da referida Instituição.

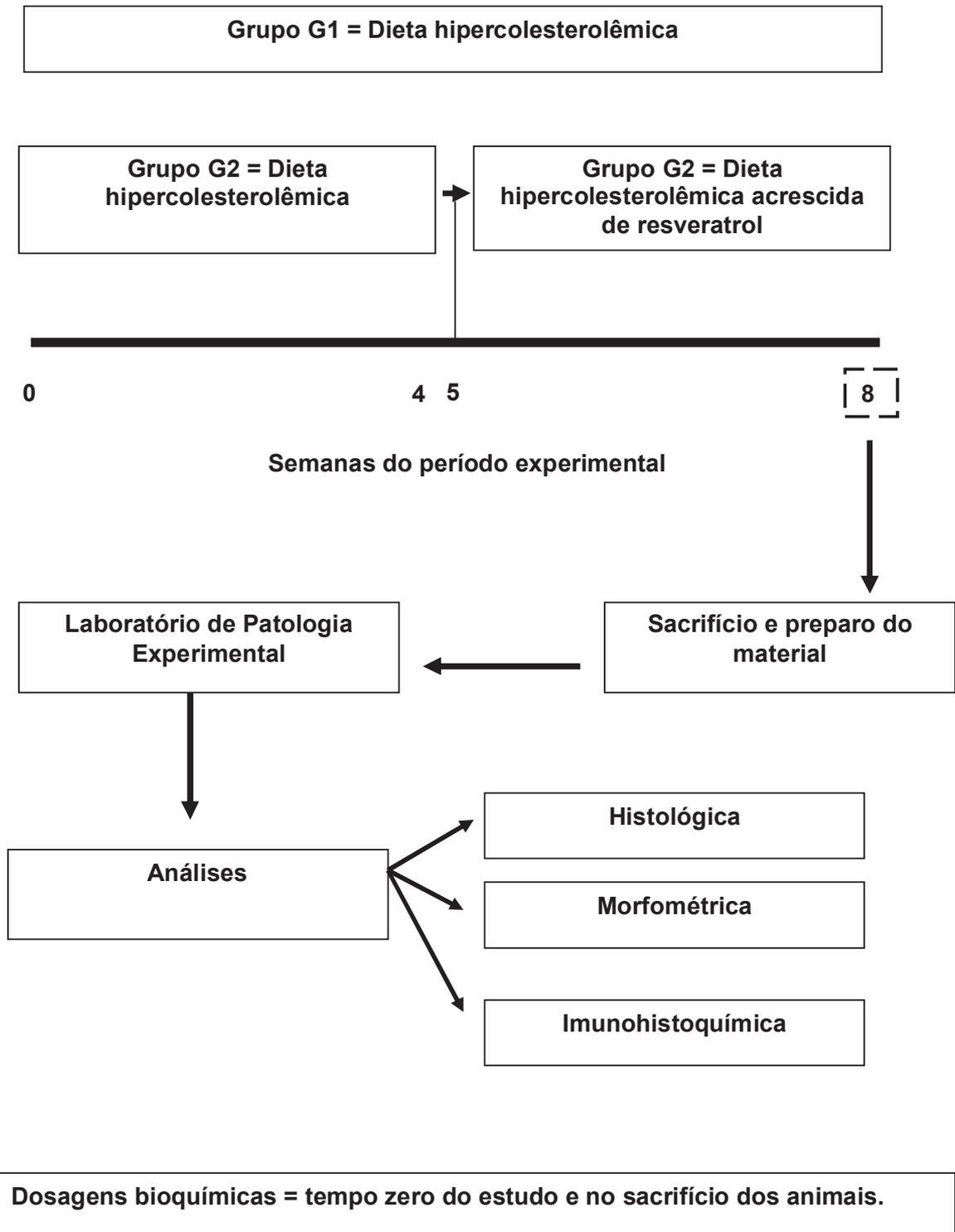
Para a realização do experimento, foram selecionados 20 coelhos machos albinos (*Oryctolagus cuniculus*) da linhagem *New Zealand*, com aproximadamente 30 dias, pesando entre 1000 e 1500 gramas. O cálculo do tamanho da amostra foi feito com base no estudo de Zou et al (2005)³¹. Com o propósito de detectar uma diferença mínima de 10% na redução do colesterol entre os 2 grupos de coelhos, considerando-se um nível de significância de 5% e um poder de teste de 90%, foi necessária a quantidade de animais utilizados.

O período experimental correspondeu 8 semanas. Os animais foram randomizados em 2 grupos, com 10 animais em cada grupo, conforme o tratamento dietético recebido. Ambos os grupos receberam nas primeiras 4 semanas de experimentação a dieta padrão Nuvilab® acrescida à 1% de colesterol, proveniente do ovo liofilizado. A adição de 1% de colesterol, proveniente do ovo liofilizado, na alimentação dos coelhos tem sido utilizada nos protocolos experimentais para a indução e formação das lesões ateroscleróticas ³². Outros autores complementam que a extensão e o tipo de lesão aterosclerótica são diretamente proporcionais à concentração de colesterol plasmático, o qual aumenta de acordo com a porcentagem de colesterol na dieta ^{33, 34}. A partir da quinta semana, enquanto o grupo controle permaneceu no mesmo tratamento dietético, o grupo resveratrol recebeu até a 8ª semana, a dieta padrão Nuvital® (65g/dia/coelho) acrescida a 1% de colesterol, proveniente do ovo liofilizado (36g/dia/coelho) associado com 2mg/kg/dia/coelho de resveratrol em pó (tabela 01). O medicamento em suspensão foi administrado via oral por meio de uma seringa de insulina. A dose administrada foi calculada de acordo com o peso de cada animal.

Tabela 01 - Demonstrativo do Delineamento Experimental

Grupos	Procedimentos
Grupo G1(Controle) Dieta hipercolesterolêmica	Ração padrão Nuvilab® acrescida a 1% de colesterol proveniente do ovo liofilizado. Tempo de administração: 8 semanas.
Grupo G2 (Resveratrol) Dieta hipercolesterolêmica com adição de resveratrol	Ração acrescida de ovo em pó a 1% de colesterol por 4 semanas para indução de lesão aterosclerótica em aortas dos coelhos. A partir da quinta semana foi adicionada à dieta hipercolesterolêmica 2 mg/kg/dia de resveratrol para cada coelho.

6.2.2 Desenho do estudo



6.2.3 Ambiente de Experimentação

Os procedimentos deste estudo foram realizados nas dependências do laboratório de cirurgia experimental do Hospital Angelina Caron, no laboratório de patologia experimental e no biotério central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Os animais foram mantidos no biotério em macro-ambiente com ciclos de iluminação alternados, 12/12 horas, com trocas de ar e temperatura controlada de 19 a 23°C. Para o micro-ambiente utilizaram-se gaiolas higienizadas diariamente. Os coelhos foram armazenados individualmente e identificados com uma numeração seqüencial na orelha direita, a qual se repetiu na face frontal da gaiola correspondente. Os animais receberam durante o experimento água e ração específica para a espécie (Nuvilab®) de forma *ad libitum*.

6.2.4 Preparo da ração suplementar

Para a alimentação dos coelhos foi preparada uma dieta hipercolesterolêmica, a qual foi ofertada durante todo o experimento. Para tal, foram utilizados 800 gramas de ovo liofilizado adicionado à ração padrão com o objetivo de induzir lesões ateroscleróticas nas aortas dos animais.

A diluição do ovo em pó foi realizada na seguinte proporção: 800 gramas de ovo em pó em 800 ml de água. A ração foi colocada num recipiente plano e largo e distribuída numa camada fina. Posteriormente, o ovo diluído foi acrescido à ração. O preparo final armazenou-se refrigeração. O grupo G2 (resveratrol) recebeu, por via oral, diariamente a dose de resveratrol específica para cada animal.

6.2.5 Aferições

Para as avaliações deste modelo experimental adotaram-se aferições histológicas de forma qualitativa e quantitativas (morfométricas). O peso dos

animais também foram aferidos e registrados em duas vezes por semana do período experimental, correspondendo ao todo 16 pesagens. Para a coleta de peso utilizou-se uma balança digital disponível no biotério da instituição.

6.2.6 Normas adotadas

Foram adotados os princípios éticos de experimentação animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1997), Nômina Anatômica Veterinária e as normas de redação de trabalhos científicos de Vancouver ³⁵.

6.3 COLETAS DE AMOSTRAS

6.3.1 Sangue

Foram coletadas amostras biológicas de sangue de cada coelho para análise bioquímica do colesterol total (CT), LDL – C, HDL – C (lipoproteína de alta densidade) e triglicerídeos (TG). Esta coleta, cuja via de escolha é a punção cardíaca, foi realizada com a ajuda do responsável pelo Biotério no tempo zero do estudo e no período pré-operatório (eutanásia), respeitando um jejum de 12 horas antecedentes ao exame. As dosagens bioquímicas foram feitas por laboratório terceirizado, de acordo com o método enzimático específico para cada exame. É importante ressaltar que para a coleta de sangue foi realizado o procedimento anestésico do animal.

O animal foi acondicionado em caixas específicas desenvolvidas (figura 02) para auxiliar o procedimento anestésico de coelhos. O processo de punção inicia-se com a anestesia dos animais (solução de 1,5ml de quetamina + 1 ml de xilazina: administração de 1ml/kg de peso, via intramuscular). Após 4 a 5 minutos, colocou-se o animal em decúbito lateral esquerdo para palpação do

processo xifóide; segue-se a palpação cardíaca e punção intracardíaca com seringa de 5 ml e agulha 25x7mm.



Figura 02 – Caixa que auxilia no procedimento anestésico dos animais

6.3.2 Remoção de artérias

No final do período experimental, 8ª semana, realizou-se o processo cirúrgico para retirada das peças e eutanásia dos coelhos no laboratório de cirurgia experimental do Hospital Angelina Caron.

Antecedente à realização do procedimento cirúrgico foi ministrada anestesia, de 2,5 ml (para animais de 2,5 kg) da solução composta por 1,5 ml de quetamina (50mg) e 1 ml de xilazina (20mg), aplicada por via intramuscular na região da coxa, conforme protocolo de anestesia do Biotério Central da universidade.

Em um segundo momento, foi realizada a tricotomia ampla do abdome, o animal foi acondicionado na canaleta cirúrgica, sendo seus membros fixados pelas extremidades. Em seguida, fez-se a anti-sepsia local com PPVI degermante e coloca-se o campo fenestrado estéril. Posteriormente, realizou-se incisão mediana de 4 cm de extensão a partir do processo xifóide. Uma vez com o campo aberto, realizou-se a dissecação da aorta descendente e a

eutanásia de acordo com RDC nº 714 (2002) com dose letal de barbitúrico (thionembutal).

As artérias removidas (figura 03 e 04) foram lavadas e fixadas com formaldeído a 10% tamponado com fosfato (pH=7,6), durante 10 minutos. Posteriormente, foram armazenadas em frascos devidamente identificados e encaminhados para o laboratório de patologia experimental da PUCPR, onde se realizou o processamento histológico convencional com parafina.

Aorta Descendente



Figura 03 – Localização da aorta descendente para remoção.



Figura 04 – Aorta descendente removida do animal

6.4 AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS

6.4.1 Preparo das amostras

Para posterior análise histológica e morfométrica, a identificação dos animais por grupos foi substituída por números aleatórios sequenciais com o propósito de obter uma análise cega. Para isso, foi misturado o grupo controle e o grupo resveratrol. Após esta nova identificação, as espécimes foram fixadas em formalina por 24 horas, constituídos pelo segmento da aorta descendente. Posteriormente essas peças cirúrgicas foram retiradas dos frascos e processadas para a confecção dos cortes histológicos. Para tal procedimento, foram retiradas de 3 a 5 amostras, a 2 cm da raiz da aorta, em cortes transversais, com 2 a 3 mm de espessura cada, da aorta descendente de todos os animais do estudo, representando assim, as áreas das porções proximais, médias e distais destas artérias. As amostras coletadas foram colocadas em cápsulas histológicas identificadas.

As amostras previamente identificadas foram colocadas no autotécnico (Leica[®] modelo RM2145), para processamento *overnight*, sendo desidratadas em concentrações diferentes e crescentes de álcool etílico a 70%, 80% e 90%, posteriormente foram diafanizadas em xilol contendo misturas seqüencialmente concentradas de parafina durante 12 horas. Como procedimento padrão para a obtenção dos blocos foi realizado a inclusão em parafina quente (Leica[®] modelo EG1160).

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (Leica[®] modelo RM 2145), em cortes de 5 μ m (micrômetro) cada um, dispostos em lâmina de vidro com 75X25mm. É importante ressaltar que no momento da leitura das lâminas histológicas obtidas nesse experimento, seguiu-se sempre a identificação prévia descrita de cada um dos cortes transversais da aorta descendente.

As lâminas foram coradas em hematoxilina-eosina (HE) e elástica (orceína), conforme técnicas convencionais e montadas com bálsamo e

lamínula de vidro de 24X50 mm. Para a identificação das lâminas histológicas, utilizou-se o mesmo processo empregado nos blocos histológicos.

6.4.2 Análise histológica qualitativa

As lâminas na coloração de HE foram analisadas de maneira cega, em microscópio medusa de cinco cabeças Olympus® BX 40. As lesões ateroscleróticas encontradas no estudo macroscópico foram graduadas visivelmente usando uma escala de 0 a VI, segundo os critérios qualitativos propostos por Stary et al (1992) ³⁶, descritos na tabela 02. Por meio dessa análise foi diagnosticado de maneira cega o grau de lesão aterosclerótica presente nos coelhos de ambos os grupos.

Os resultados foram registrados na forma de fotomicrografias retidas em leitura pelo programa Image Pro-plus® 4.5, acopladas a um microscópio Olympus® BX50 e câmara de vídeo Sony®. Todos os fragmentos, bem como todos os níveis de corte foram examinados, aproveitando-se para observar os aspectos pertinentes à lesão aterosclerótica, livre de artefatos técnicos e preparando o material para a análise morfométrica. É importante salientar que com o auxílio da leitura histológica na coloração de HE foi evidenciado o melhor corte transversal da aorta descendente, representativo da lesão, para a leitura morfométrica.

Tabela 02 – Grau de lesão aterosclerótica de acordo com os critérios classificatórios

<i>Critério</i>	<i>Grau da lesão</i>
Espessamento intimal	I
Xantomagrófagos isolados	I
Xantomagrófagos agregados ou em camadas	II
Gotículas lipídicas de matriz proteoglicana	II
Lagos de lipídios de matriz proteoglicana	III
Presença de capa fibrosa delicada	IV
Presença de capa fibrosa bem formada	V
Calcificação e Placa Fibrosa	VI

Adaptado: Stary et al (1992) ³⁶

6.4.3 Análise morfométrica quantitativa

A leitura morfométrica foi realizada com as lâminas coradas em orceína (elástica), a fim de determinar a área íntima e da média da aorta descendente dos coelhos do grupo controle e do grupo resveratrol. Para essa leitura, o corte transversal que representa a melhor lesão para leitura, foi selecionado previamente na leitura do HE. Esse segmento foi dividido em quatro campos nos quais se realizou em cada quadrante dez aferições da espessura da média e da íntima.

A leitura das lâminas realizou-se por meio do programa Pro Image-plus[®] v.4,5 para Windows[®], acoplados a microscópio Olympus[®] BX50 e câmara de vídeo Sony[®], utilizando-se o aplicativo chamado morfometria de "linha", calibrado previamente em μm com a objetiva de 20 vezes. As medidas aferidas foram transferidas para o programa Excel for Windows[®].

6.4.4 Análise imunohistoquímica

a) Construção do bloco de *Tissue Microarray* (TMA)

Em um primeiro momento, as artérias descendentes foram cortadas em série, na espessura de, aproximadamente 3 a 5 mm, para a confecção dos blocos parafinados comuns. Esses receberam a denominação de blocos doadores. Posteriormente, foram retirados cortes dos blocos doadores, e corados em colorações de rotina (HE e elástica), vide análise morfométrica.

Nas lâminas coradas em HE foram localizadas as amostras arteriais contendo a região de interesse (amostra em corte transversal contendo a área mais lesada) para a construção do TMA. Através do sistema de espelho, a área mais lesada marcada na lâmina foi localizada no bloco-doador, que por sua vez, também recebeu uma marcação.

A pinça do tipo “*Punch de Pele*”, com diâmetro de 5 mm (Figura 05) foi escolhida para a retirada do segmento aórtico mais lesado do bloco doador com intuito de montar o bloco receptor. Para que as artérias descendentes fossem devidamente localizados, conforme sua identificação individual confeccionou-se um mapa que servirá de apoio. O mapa segue o estilo de um plano cartesiano, onde as colunas são identificadas com letras e as linhas com números. Cada fragmento aórtico escolhido recebeu a identificação de uma letra mais um número (Ex A1) (Figura 06).



Figura 05 – Pinças do tipo Punch para biópsias de pele com diâmetros de 5, 4 e 3 mm, respectivamente.

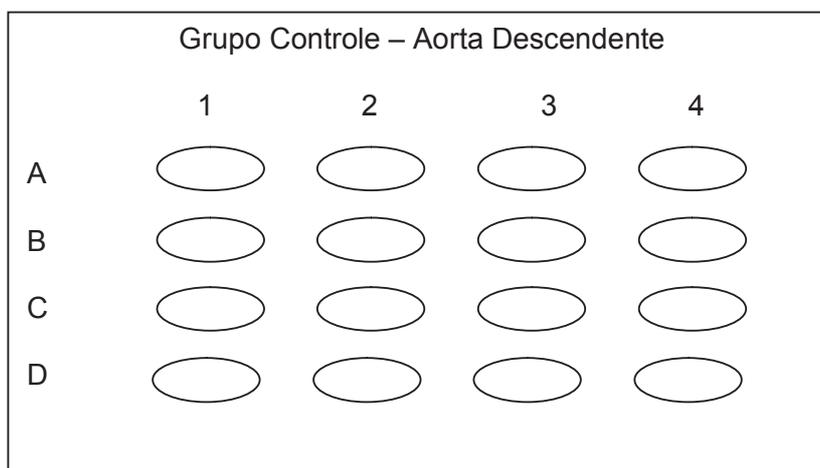
Grupo Controle
A1 = Coelho 01
A2 = Coelho 02
A3 = Coelho 03
B1 = Coelho 04
B2 = Coelho 05
B3 = Coelho 06
C1 = Coelho 07
C2 = Coelho 08
C3 = Coelho 09
C4 = Coelho 10
D4 = Marcador

Figura 06 – Mapa que orienta a confecção do bloco receptor. A1 representa o bloco que contém a identificação do coelho 01 e assim por diante.

O bloco-receptor será confeccionado, por meio dos seguintes passos: 1) Aquecimento da pinça do tipo Punch para penetração no bloco de parafina; 2) Introdução da pinça quente na área demarcada (segmento aórtico mais lesado) do bloco-doador; 3) Pressão e torção aplicadas na pinça para penetração e

corte do fragmento; 4) Retirada da pinça contendo o fragmento mais lesado da artéria descendente; 5) Retirada do fragmento contido na pinça.

Depois de retirados os fragmentos de todos os blocos doadores e estes organizados conforme o mapa (figura 07) foram montados novos blocos. Ao todo se montaram dois novos blocos (grupo controle aorta descendente, grupo resveratrol aorta descendente), contendo ambos os múltiplos fragmentos de espécimes mais lesados de cada um dos grupos. Assim que pronto o bloco-receptor, foram confeccionadas lâminas histológicas convencionais coradas em HE e lâminas para a análise imunohistoquímica.



A01 representa o segmento da aorta descendente identificado do coelho 01 e assim por diante.

b) Técnica de imunohistoquímica

Estes cortes histológicos foram fixados em lâminas de vidro silanizadas e inicialmente submetidos à desparafinização com xilol quente (37°C), desidratação com banhos sucessivos de álcool e reidratação com água.

Utilizou-se o álcool metílico e H_2O_2 para o primeiro bloqueio da peroxidase endógena e a água destilada e H_2O_2 para o segundo bloqueio. Posteriormente foi procedida a incubação com os anticorpos primários monoclonais VCAM na diluição de 1:200 microlitros durante 1 hora. Utilizou-se também a incubação de sinalizadores inflamatórios como IL – 6 (*Imuny biotechnology*) e MCP – 1 (*Imuny biotechnology*), nas diluições de: 1:400 microlitros e 1:100 microlitros, respectivamente. Para a revelação, foi adicionado complexo DAB (Dakocytomation), substrato sobre as lâminas e a contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Mayer's, seguida de desidratação com banhos de álcool etílico 100% e da clarificação com xilol. Para a montagem das lâminas utilizou-se o Bálsamo do Canadá. O protocolo desenvolvido e descrito acima já foi padronizado no serviço. É importante destacar que foram utilizados, controles positivos e negativos para cada reação.

A leitura foi feita em microscópio óptico Olympus BX50®, com objetiva de 20 x, avaliando-se a concentração de células de adesão celular e intercelular e de sinalizadores inflamatórios na camada íntima nos segmentos arteriais estudados. Para essa análise quantitativa, foram digitalizadas imagens da aorta descendente de cada animal, as quais foram divididas em oito campos. As áreas positivas para os anticorpos primários foram marcadas pela coloração castanha enquanto que as negativas pela coloração azul, caracterizando, assim, a utilização do método da morfometria de cores.

6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação dos grupos em relação a variáveis quantitativas foi usado o teste t de Student para amostras independentes ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, quando apropriado. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilks. Algumas variáveis foram submetidas à transformação logarítmica para atingir a condição de simetria. Em

relação a variáveis nominais dicotômicas, a comparação dos grupos foi feita considerando-se o teste exato de Fisher. Valores de $p \leq 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram organizados em planilha Excel e analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

7 RESULTADOS

7.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para o início do experimento foram randomizados 20 coelhos machos *New Zealand*, os quais foram divididos em dois grupos, conforme o tratamento dietético recebido. Ao final do experimento, o grupo resveratrol finalizou com oito animais, devido ao óbito de dois durante o período de experimentação.

No que se refere à administração do resveratrol, observa-se que essa foi bem tolerada durante todo período experimental, não sendo observado nenhum resultado adverso.

7.2 VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS

Os níveis séricos de colesterol total foram mensurados antes de iniciar a dieta hipercolesterolêmica (momento basal) e ao final do experimento (momento eutanásia). Os valores encontrados nas dosagens dos grupos podem ser observados na tabela 03.

Tabela 03 – Valores médios para colesterol total dos grupos estudados

Variável	Grupo	n	Média (mg/dl)	Desvio padrão	Valor de p
CT inicial	Controle	10	70,30	21,79	
	Resveratrol	08	44,50	10,98	
CT final	Controle	10	1676,70	768,67	
	Resveratrol	08	2173,75	353,84	0,112**

** Ancova, $p < 0,05$ (CT inicial como co-variável) - Valor de $p = 0,112$.

Ao analisar os valores encontrados, observa-se que não há diferenças estatísticas significativas entre as concentrações séricas de colesterol total no

momento basal e no momento da eutanásia nos grupos estudados, conforme ilustra a figura 08.

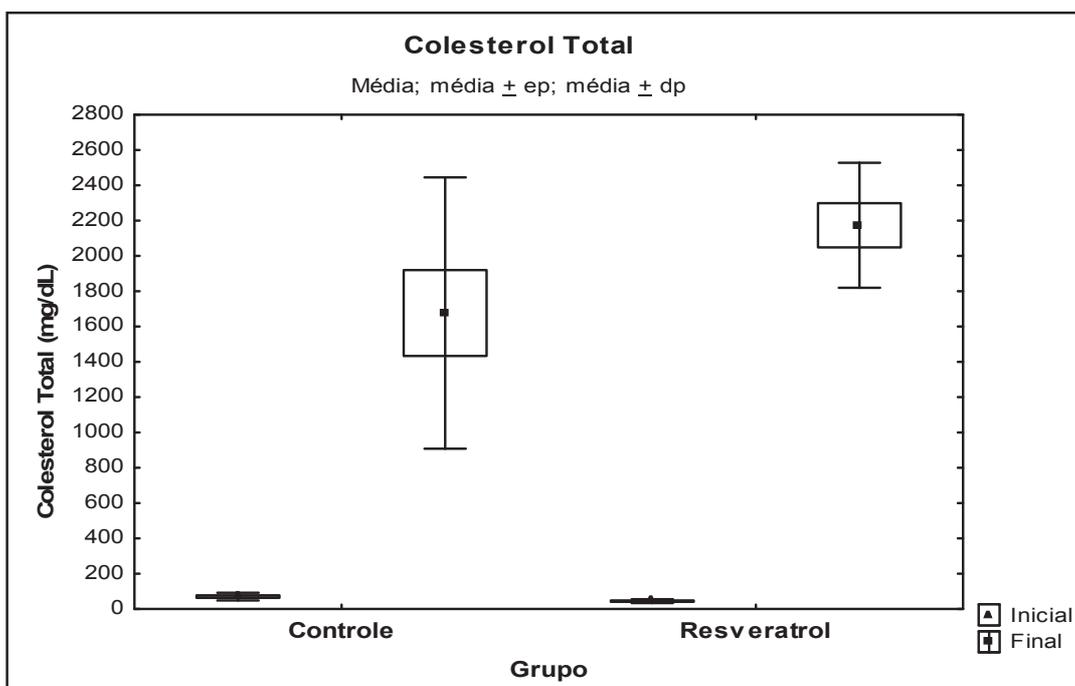


Figura 08 – Concentração plasmática de colesterol total observada no grupo controle e no grupo resveratrol. Valor de $p = 0,112$ no momento da eutanásia.

Achados semelhantes foram encontrados para a fração do LDL – C. Afinal, os animais suplementados com resveratrol apresentaram valores médios de LDL – C semelhantes aos valores de LDL – C do grupo controle, 2084,63 mg/dl e 1596,12 mg/dl, respectivamente, conforme se observa na figura 09. Os valores médios e desvio padrão estão sumarizados na tabela 04.

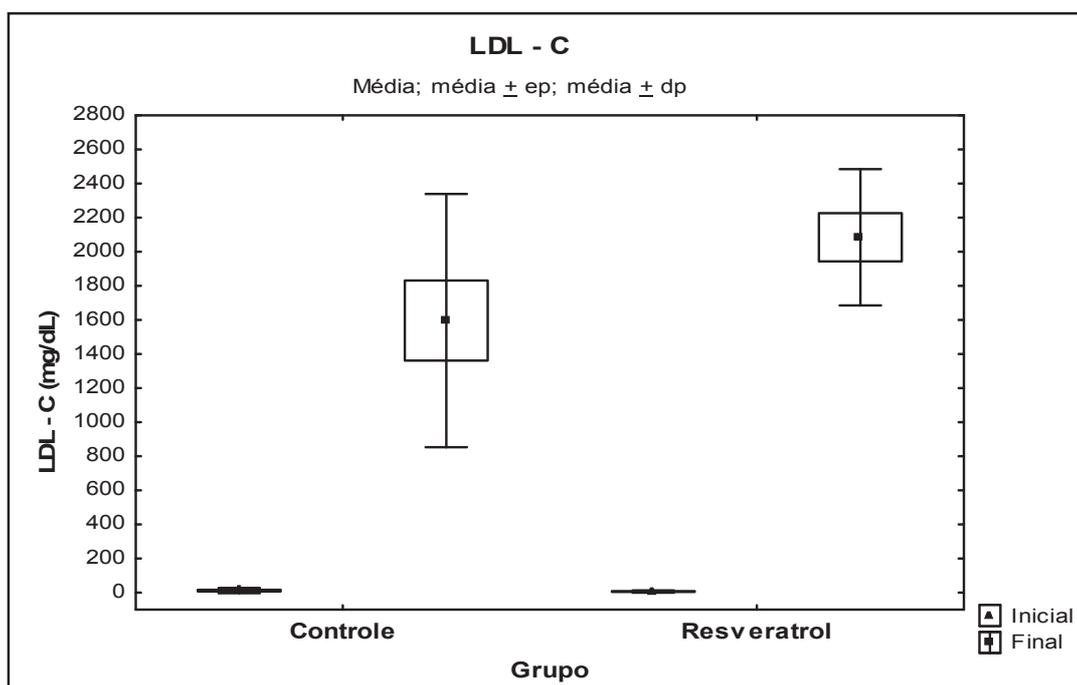


Figura 09 – Concentração plasmática de LDL - C observada no grupo controle e no grupo resveratrol. Valor de $p = 0,114$ no momento da eutanásia.

Tabela 04 – Valores médios e desvio padrão para LDL - colesterol dos grupos estudados

Variável	Grupo	n	Média (mg/dl)	Desvio padrão	Valor de p
LDL – C inicial	Controle	10	11,80	15,17	
	Resveratrol	08	2,08	0,40	
LDL - C final	Controle	10	1596,12	743,03	
	Resveratrol	08	2084,63	399,96	0,114*

* Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$. – Valor de $p = 0,114$

No que se refere à análise de HDL – C e níveis séricos de triglicédeos observa-se que não houve diferença significativa nas concentrações séricas desses parâmetros bioquímicos entre os grupos ao término da experimentação vide figura 10 e 11, respectivamente. Embora existam diferenças entre os níveis plasmáticos de triglicédeos dosados no período final do estudo (204,32

mg/dl no grupo controle e 75,24 mg/dl no grupo resveratrol), essas não foram significativas. Os valores médios e desvio padrão estão sumarizados na tabela 05.

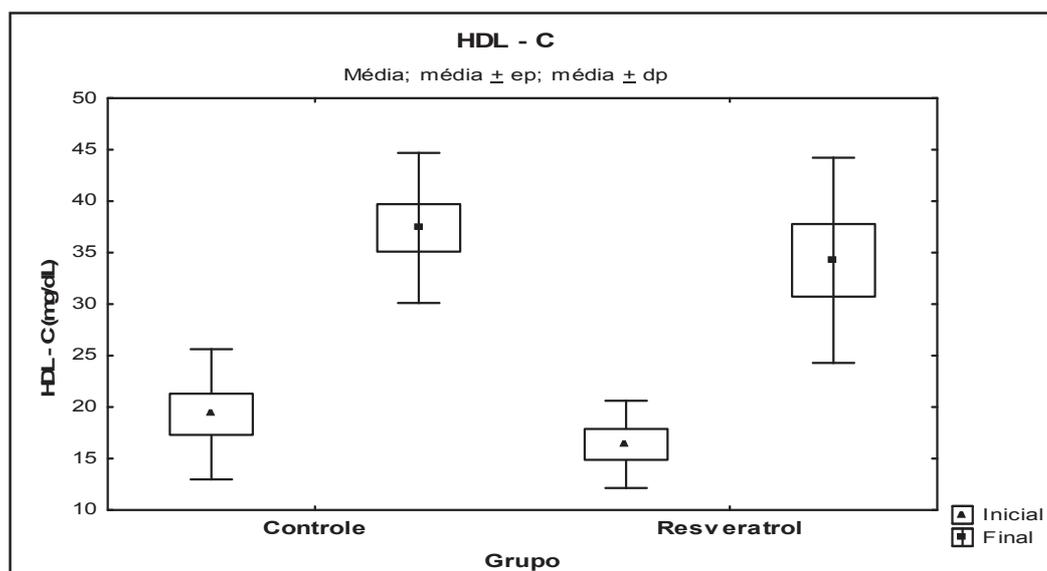


Figura 10 – Concentração plasmática de HDL - C observada no grupo controle e no grupo resveratrol.

Valor de $p = 0,449$ para concentração de HDL - C final nos grupos estudados.

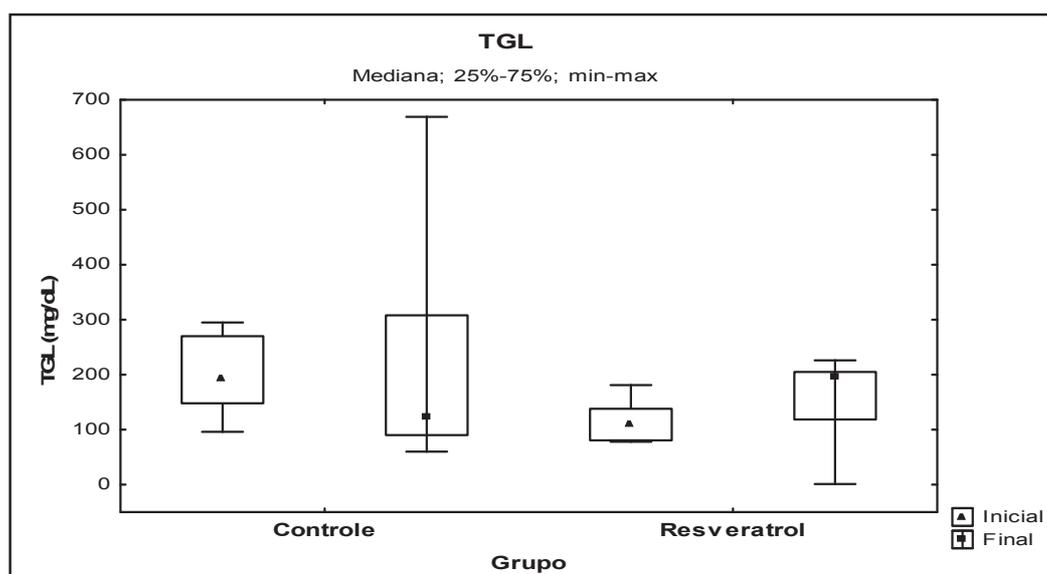


Figura 11 – Concentração plasmática de triglicerídeos observada no grupo controle e no grupo resveratrol.

Valor de $p = 0,762$ para concentração de triglicerídeos final nos grupos estudados.

Tabela 05 – Valores médios e desvio padrão para triglicerídeos dos grupos estudados

Variável	Grupo	n	Média (mg/dl)	Mediana (mg/dl)	Desvio padrão	Valor de p
TGL inicial	Controle	10	196,40	193,50	71,94	
	Resv.	10	114,00	108,00	37,11	
TGL final	Controle	10	220,20	123,00	204,32	
	Resv.	10	158,14	195,50	75,24	0,762**

Resv = resveratrol

** Mann – Whitney – Valor de p=0,762

7.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Por meio da análise histológica, pode-se avaliar o grau de lesões ateroscleróticas presentes na aorta descendente de ambos os grupos. Ao final do período experimental, observou-se que há diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação à probabilidade de ter lesão dos tipos I, II, III, IV e V ou de não ter nenhuma lesão. Quase que totalidade dos animais do grupo controle (70%) apresentou graus de lesões III. Já, em 100% dos animais pertencentes ao grupo do resveratrol, o nível do grau da lesão foi I, conforme ilustra a figura 12.

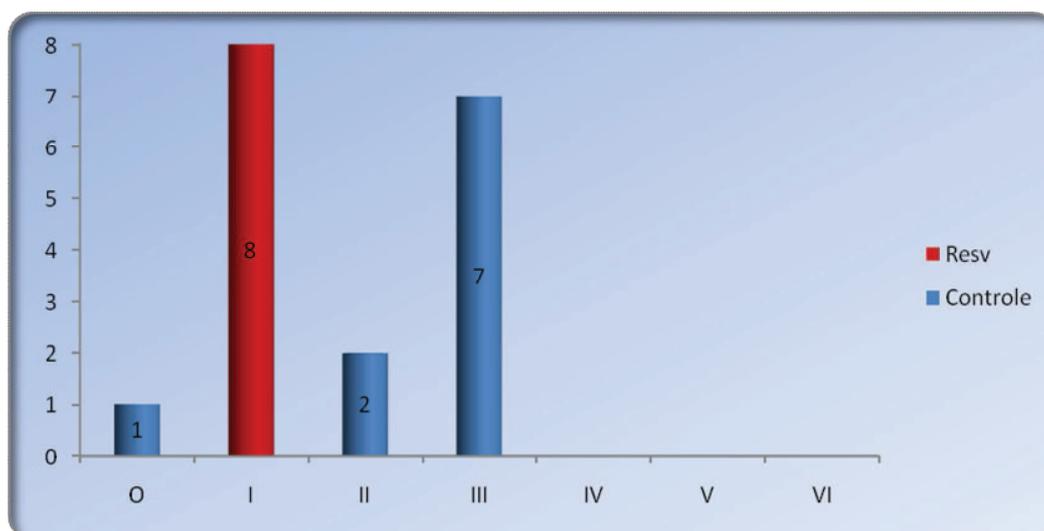


Figura 12 – Grau de lesão aterosclerótica na aorta descendente dos coelhos estudados. Valor de p = 0,004 – Teste exato de Fischer

Em adição, a figura 13 demonstra corte seccional da aorta descendente com a caracterização da lesão aterosclerótica e lesões grau I e III encontradas em maior escala nessa pesquisa (figura 13).

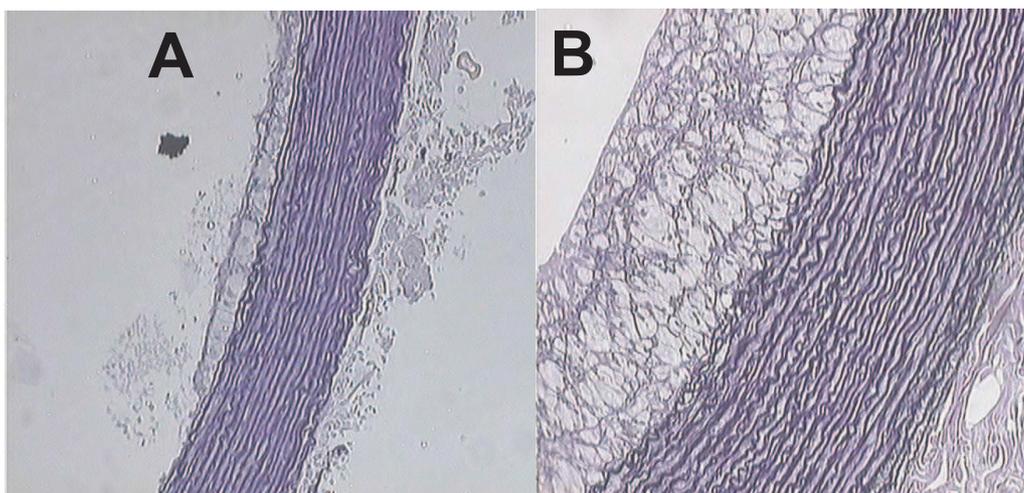


Figura 13 – Cortes histológicos da aorta descendente de animais: A – Secção transversal da aorta descendente do coelho (grupo resveratrol) com lesão aterosclerótica grau I; B – Secção transversal da aorta descendente do coelho (grupo controle) com lesão grau III.

7.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

No que se refere à análise histológica quantitativa, observa-se na figura 14, que diferenças estatísticas foram encontradas para a espessura da camada íntima do segmento aórtico dos grupos estudados ($p < 0,001$). O mesmo não se aplica para a espessura da camada média. Afinal, conforme ilustra a figura 15, a espessura da camada média não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos ($p = 0,16$). Os valores médios e desvio padrão estão sumarizados na tabela 06.

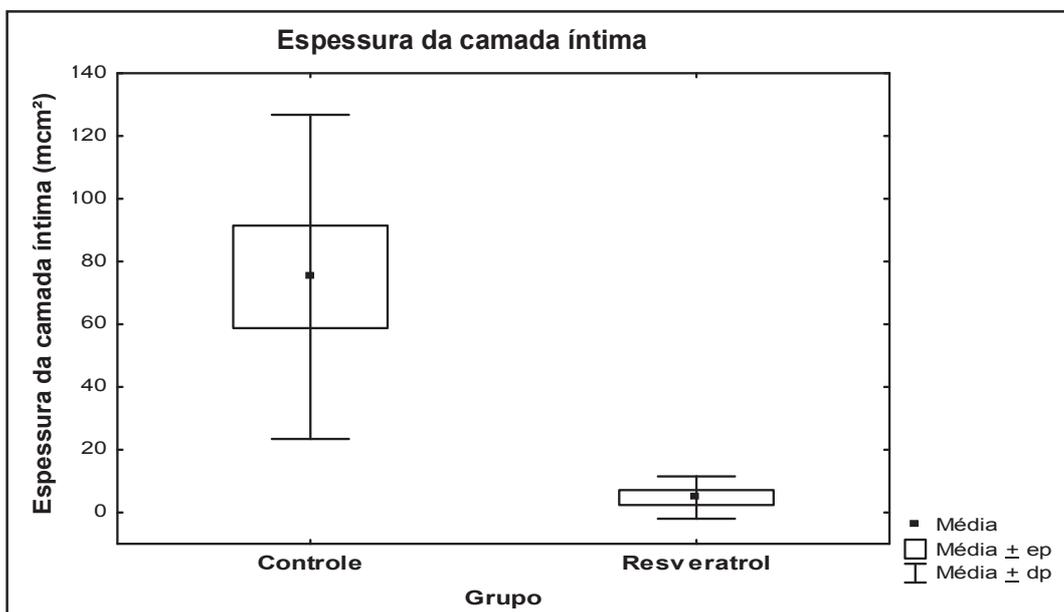


Figura 14 – Espessura da camada íntima da aorta descendente dos grupos estudados. Valor de $p < 0,001$ para a espessura da camada íntima da aorta dos grupos estudados.

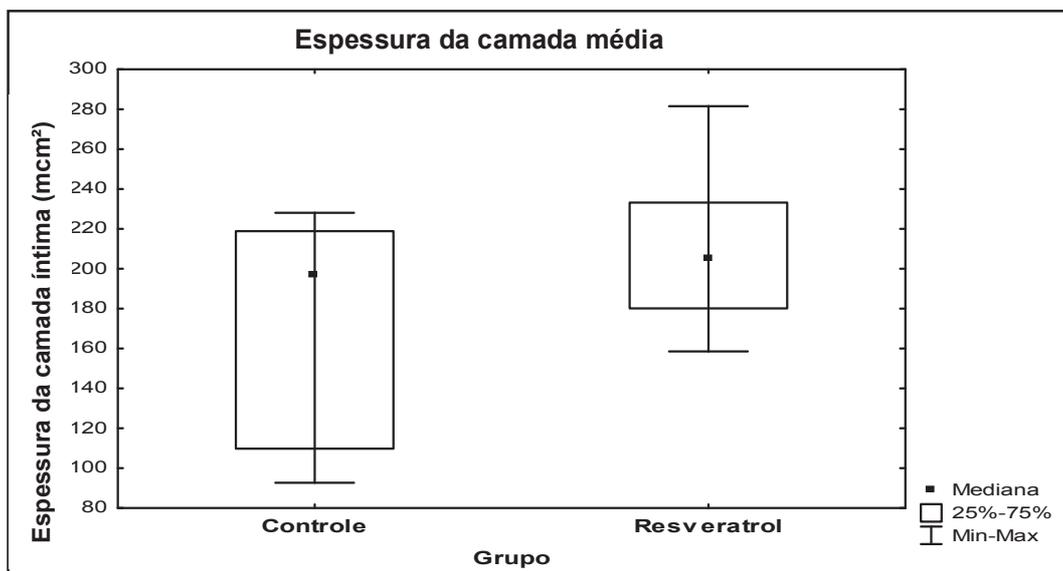


Figura 15 – Espessura da camada média da aorta descendente dos grupos estudados. Valor de $p = 0,315$ para a área da camada média da aorta dos grupos estudados.

Tabela 06 – Valores médios desvio padrão das espessuras da camada media e da camada íntima dos grupos estudados.

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Desvio padrão	Valor de p
Íntima (mcm ²)	controle	10	75,10	68,25	51,66	< 0,001*
	resveratrol	8	4,76	1,38	6,75	
Média (mcm ²)	controle	10	176,59	196,99	52,69	0,315**
	resveratrol	8	209,70	205,49	39,77	

(*) Teste t de Student para amostras independentes;

(**) Teste t de Mann-Whitney.

7.5 ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS

A análise de áreas positivas para as moléculas de adesão vascular (VCAM -1) demonstrou diferenças estatísticas significantes entre os grupos estudados, conforme se observa a figura 17 (p=0,007). Os valores médios e desvio padrão estão sumarizados na tabela 07.

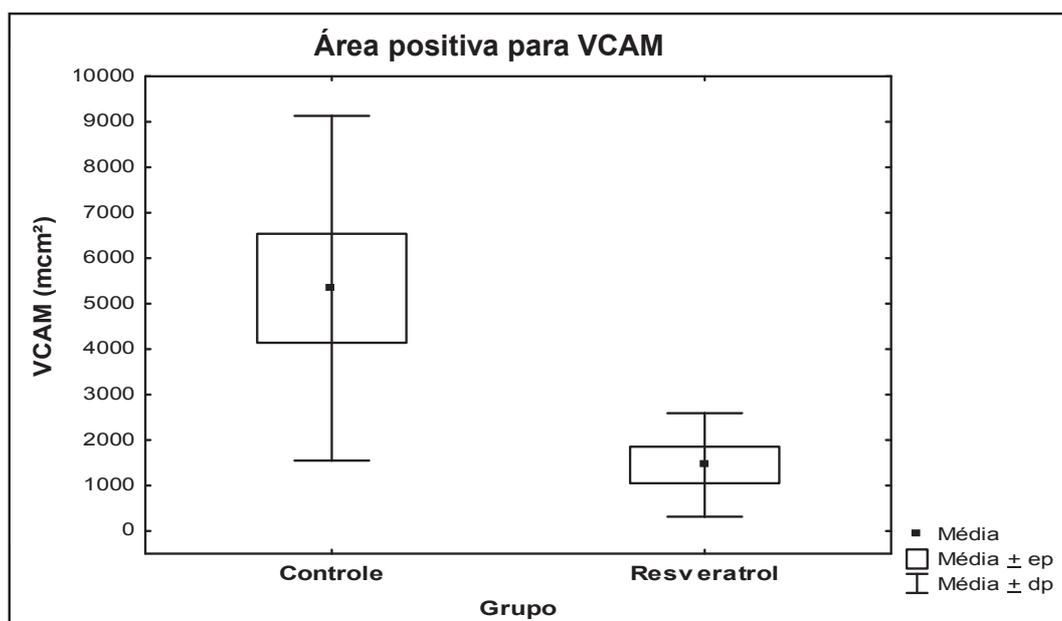


Figura 16 – Áreas positivas para VCAM dos grupos estudados - Valor de p = 0,007

Tabela 07 – Valores médios e desvio padrão das áreas positivas para VCAM nos grupos estudados

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Desvio padrão	Valor de p*
VCAM aorta (mcm ²)	controle	10	5339,07	5209,03	3791	0,007*
	resveratrol	8	1452,96	1035,59	1137	

(*) Teste t de Student para amostras independentes. (**) Teste t de Mann-Whitney.

A figura 17 representa os cortes seccionais do segmento aórtico para a análise de VCAM dos grupos estudados.

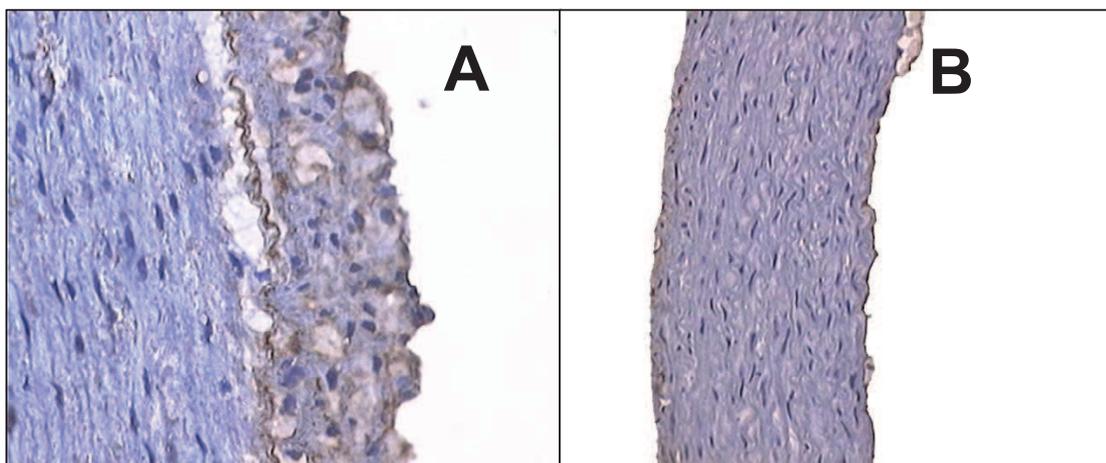


Figura 17 – Fotomicrografia do segmento da aorta descendente de coelhos. A – Área positiva no segmento aórtico do grupo controle para VCAM. B - Área positiva no segmento aórtico do grupo resveratrol para VCAM.

No que se refere à concentração de MCP – 1, observa-se que a mesma apresentou diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p=0,039$), conforme ilustra a figura 18. Os valores médios, medianos e desvio padrão estão sumarizados na tabela 08.

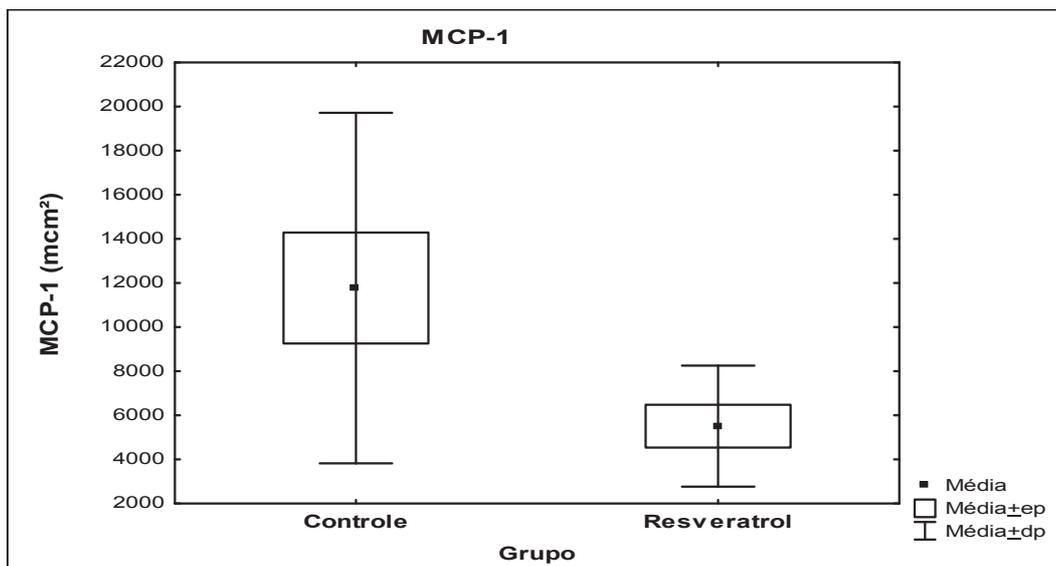


Figura 18 – Áreas positivas para MCP-1 dos grupos estudados - Valor de $p = 0,039$.

Tabela 08 – Valores médios, medianas, mínimos, máximos e desvios padrões das áreas positivas para MCP-1 nos grupos estudados

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Desvio padrão	Valor de p^*
MCP - 1 (mcm ²)	controle	10	11772	11003	7947	0,039*
	resveratrol	8	5509	4781	2745	

(*) Teste t de Student para amostras independentes.

A figura 19 representa os cortes seccionais do segmento aórtico para a análise de MCP -1 dos grupos estudados.

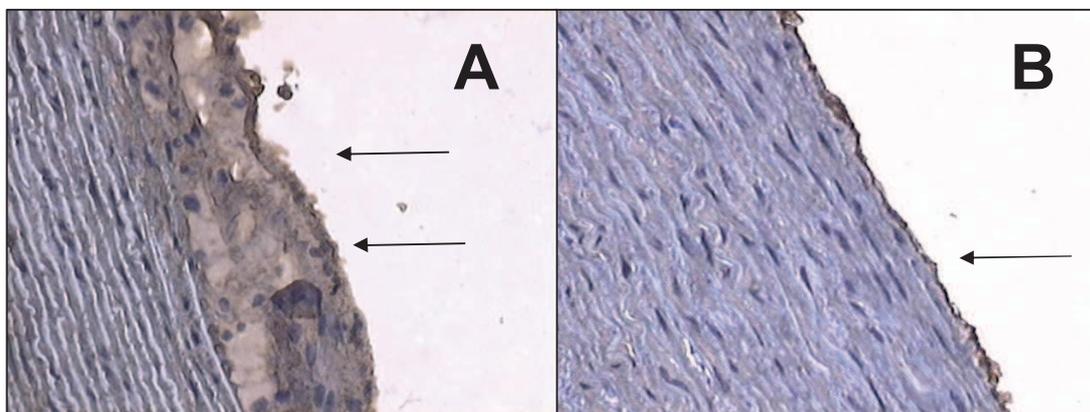


Figura 19 – Fotomicrografia do segmento da aorta descendente de coelhos. A – Áreas positivas no segmento aórtico do grupo controle para MCP – 1; B - Áreas positivas no segmento aórtico do grupo resveratrol para MCP – 1.

Achados concordantes são observados para a interleucina 6 (IL-6). Ao analisar os dados, evidencia-se que a IL-6 apresentou diferença estatística significativa entre os grupos experimentais estudados ($p=0,015$) (figura 20). Os valores médios, medianos e desvio padrão estão sumarizados na tabela 09.

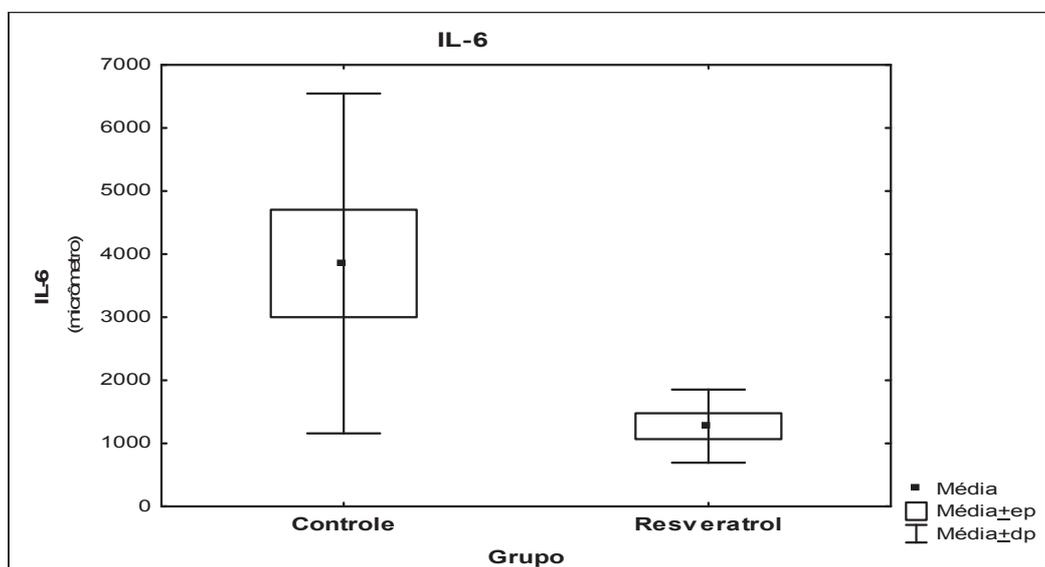


Figura 20 – Áreas positivas para IL-6 dos grupos estudados - Valor de $p = 0,015$.

Tabela 09 – Valores médios, medianas e desvios padrões das áreas positivas para IL - 6 nos grupos estudados

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Desvio padrão	Valor de p*
IL 6 (mcm ²)	Controle	10	3852	3623	2694	0,015*
	resveratrol	8	1273	1128	580	

(*) Teste t de Student para amostras independentes.

A figura 21 representa os cortes seccionais do segmento aórtico para a análise de IL - 6 dos grupos estudados.

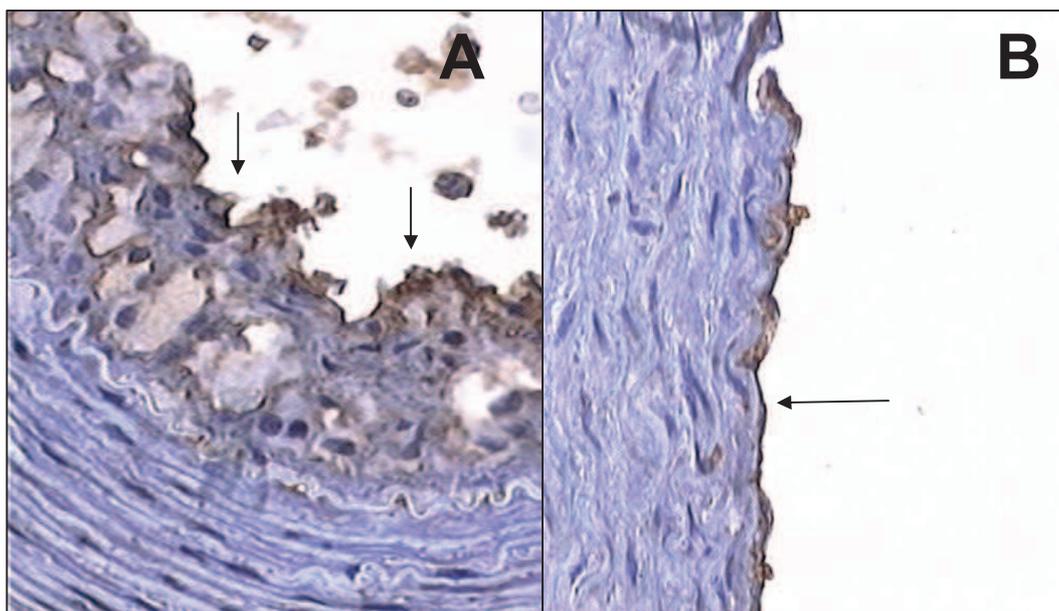


Figura 21 – Fotomicrografia do segmento da aorta descendente de coelhos. A – Áreas positivas no segmento aórtico do grupo controle para IL-6; B - Áreas positivas no segmento aórtico do grupo resveratrol para IL-6.

8 DISCUSSÃO

8.1 EFEITO DO RESVERATROL NAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS ANÁLISADAS

Há muito a comunidade científica alerta a população mundial quanto aos malefícios ao sistema cardiovascular em relação ao consumo de uma dieta hiperlipídica e rica em colesterol ^{37, 38, 39}.

Diversas pesquisas clínicas e experimentais reportam que a oferta diária do resveratrol é considerada uma estratégia terapêutica profilática para o processo etiológico das doenças cardiovasculares, principalmente a aterosclerose. Muito se discute e se estuda na literatura a respeito dos potenciais efeitos benéficos do resveratrol. Entre esses se encontram a redução nos níveis séricos de colesterol total e na sua fração de LDL – C ^{40, 41}.

O mecanismo plausível e reportado para o efeito hipolipemiante do resveratrol é atribuído, entre outros fatores, à sua propriedade antioxidante. Hattori et al (2002) ⁴² reporta que a propriedade antioxidante in vivo do resveratrol, provavelmente, deriva da sua capacidade de aumentar a síntese de óxido nítrico (NO), o qual funciona, algumas vezes, como um antioxidante in vivo, capturando os radicais superóxidos. Em adição, vários estudos demonstram que o efeito antioxidante do resveratrol se deve, também, a capacidade do mesmo em capturar as espécies reativas de oxigênio (ROS) (figura 23), as quais são produzidas demasiadamente na ingestão de dietas hiperlipídicas ⁴³.

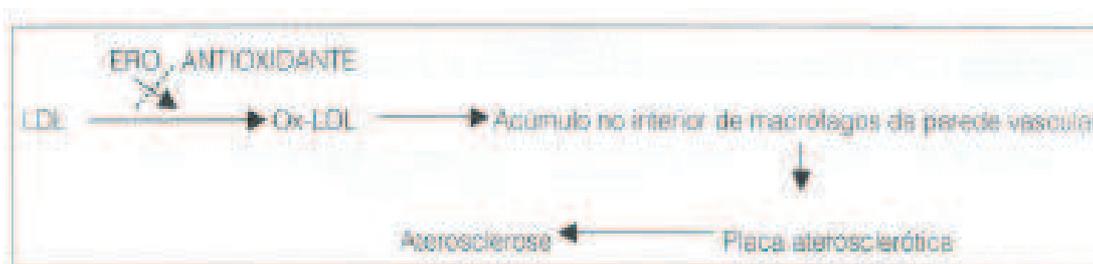


Figura 22 - Mecanismo antioxidante na prevenção da aterosclerose.

Fonte: Kusano, et al (2002) ⁴⁴.

Nigdikar et al (1998) ⁴⁵ salienta que a presença de substâncias antioxidantes para a prevenção do processo aterosclerótico é fundamental. Afinal, na presença de antioxidantes, a oxidação do LDL – C é impedida. E, dessa forma interrompe-se a sucessão de eventos que culminam na formação das células espumosas na camada íntima das artérias, levando ao início do processo aterosclerótico. Shanmuganayagam et al (2006) ⁴⁶ observaram uma diminuição nos níveis séricos de colesterol total ao utilizar 225 ml/dia de suco de uva Concord em animais hipercolesterolêmicos durante 48 dias.

Porém, essa afirmativa não condiz com os resultados encontrados nessa pesquisa. Afinal, pode-se observar no nosso trabalho, por meio de análise comparativa dos níveis séricos de colesterol total entre os grupos de animais estudados, que não houve uma redução nos níveis de colesterol total, LDL – C e triglicerídeos no grupo resveratrol. Resultados semelhantes são reportados na literatura. Castro et al (2009) ⁴⁷ também evidenciam resultados insatisfatórios pela utilização do resveratrol no perfil lipídico em modelo experimental semelhante à essa pesquisa. Ao observarem 20 coelhos machos, em estudo de 8 semanas, com dieta enriquecida em colesterol à 1,5%, os autores observaram que a oferta diária de 3mg/kg/dia de resveratrol, não foi suficiente. Afinal, não houve diferenças estatísticas significativas nos níveis séricos de colesterol total, LDL-C, HDL-C e triglicerídeos entre os animais que receberam o resveratrol dos que não receberam.

Wilson et al (1996) ⁴⁸ perceberam em estudo que a administração diária de resveratrol favoreceu à gênese da aterosclerose. Os pesquisadores randomizaram 18 coelhos machos, em dois grupos, conforme o tratamento

dietético recebido por dois meses. Ao final, observou-se, em resposta ao tratamento dietético recebido, que as concentrações séricas de LDL – colesterol e VLDL – colesterol aumentaram em ambos os grupos, não havendo, dessa forma, diferenças estatísticas significativas para as variáveis analisadas.

Ao contrário dos resultados encontrados nessa pesquisa e em algumas publicações, muitos estudos, clínicos e experimentais, observaram a atividade hipolipídica em virtude da propriedade antioxidante do resveratrol.

Nigdikar et al (1998) ⁴⁵, em estudo experimental, observou que o consumo de vinho tinto aumenta os níveis de antioxidantes plasmáticos. E, dessa forma, proporciona atividade antioxidante sobre o LDL - C. Esses resultados foram demonstrados pela diminuição de peróxidos plasmáticos totais e diminuição dos peróxidos lipídicos do LDL-C. Na mesma linha de pesquisa, Wakabayashi (1999) ⁴⁹ comprovaram que os polifenólicos do vinho tinto foram capazes de reduzir a oxidação plasmática de LDL.

Zou et al (2000) ⁵⁰, em estudos realizado para determinar o efeito antioxidante do resveratrol em humanos, utilizou dois sistemas de oxidação *in vitro* (um contendo cobre e o outro um composto azo). Os pesquisadores concluíram o resveratrol protegeu a oxidação de LDL – Colesterol em ambos os sistemas, demonstrando, dessa forma, a sua capacidade em captar radicais livres, assim como deter a progressão da oxidação.

Ao estudar *hamsters* hipercolesterolêmicos, Auger et al (2002) ⁵¹, verificaram que o grupo de animais suplementados com composto fenólico do vinho tinto, por oito semanas, apresentaram reduções significativas nos níveis plasmáticos de colesterol total e LDL – colesterol.

Fermón et al (1999) ⁵², em ensaio realizado *in vitro* utilizando alguns compostos antioxidantes, observaram que os antioxidantes presentes ao vinho tinto, mostraram notável inibição da peroxidação da LDL – colesterol (80 a 90%) quando comparado com os outros compostos.

Hansen et al (2005) ⁵³, randomizaram 69 indivíduos saudáveis em dois grupos: grupo A que recebeu vinho tinto (300 ml para homens e 200 ml para mulheres) e grupo B, o qual foi o grupo placebo, pois foi ofertado água, por 4 semanas. Ao final do período de estudo, observou-se que não havia diferenças para os níveis plasmáticos de colesterol total e LDL – colesterol entre os

grupos. Porém, destacou-se um aumento significativo de 11 a 16% nos níveis de HDL – colesterol associada a uma redução de 8 a 15% no fibrinogênio, no grupo suplementado em vinho tinto. Os autores atribuem esse incremento no HDL – C ao resveratrol presente no vinho administrado. Dessa forma, este estudo clínico, evidenciou relações inversas entre a oferta de vinho tinto e as doenças cardiovasculares. Afinal, conforme evidencia Rimm et al (1999) ⁵⁴, em sua meta análise em 25 estudos, alterações em 10% na concentração de HDL – C e no fibrinogênio, é responsável pela redução no risco de doenças cardiovasculares em torno de 10 a 25%.

Uma justificativa plausível para essas divergências encontradas, em relação ao perfil lipídico, se deve ao curto período experimental, o qual, também, foi reportado em estudos prévios ^{47, 31, 48}. Em complemento, Friedman et al (1963) ⁵⁵ e Daugherty et al (1986) ⁵⁶, após conduzirem estudos com coelhos hipercolesterolêmicos, evidenciam que a redução da lesão aterosclerótica, em virtude da diminuição nos níveis de LDL – colesterol é um processo que pode demorar meses a anos.

8.2 EFEITO DO RESVERATROL NA PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE

A perda da ação protetora do endotélio é derivada da presença de fatores inflamatórios e de risco cardiovascular, como as dietas hipercolesterolêmicas. Esses fatores agregados ou não contribuem para a gênese da placa aterosclerótica. Na presença desses, há um aumento da propensão à vasoconstrição, trombose, inflamação e proliferação celular na parede vascular ⁵⁷.

Algumas pesquisas apontam que as dietas ricas em gordura constituem um dos principais fatores de risco para a etiologia da aterosclerose. Afinal, dentre outros motivos, a dieta rica em gordura favorece a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs). E, conforme discutido anteriormente sabe-se que esses apresentam uma reatividade química muito alta com outras biomoléculas podendo desencadear a peroxidação lipídica, levando a alterações na membrana celular, fato esse que facilita a oxidação do LDL – C (HALIWELL e GUTTERIDGE, 1999) ⁵⁸.

Zhao et al (2001) ³⁸ demonstraram que uma refeição hiperlipídica é capaz de prejudicar a função endotelial por um período maior que 4 horas. Esta disfunção foi atribuída, principalmente, por um aumento no estresse oxidativo endotelial.

Nesse estudo experimental, utilizou-se como dieta aterogênica a ração padrão enriquecida a 1% de colesterol, proveniente do ovo integral liofilizado. Evidências apontam que dietas ricas em gorduras e colesterol produzem espessamento intimal associado à presença de células espumosas ⁵⁹. Essa afirmativa condiz com os resultados desse estudo. Afinal, por meio da análise morfométrica, percebe-se que todos os coelhos que receberam somente a dieta aterogênica desenvolveram lesões ateroscleróticas avançadas, grau III, no segmento aórtico estudado.

Diversos achados clínicos apontam a eficácia da utilização do resveratrol na redução da aterogenicidade. Um estudo realizado em porcos da Índia, demonstrou uma redução de 39 e 50% dos níveis plasmáticos de triglicérides e VLDL – C, respectivamente. E, associado a esses achados, observou-se,

também, uma redução de 33% no acúmulo de colesterol na aorta dos animais alimentados com polifenóis da uva em comparação ao grupo controle ⁶⁰.

Auger et al (2005) ⁶¹ avaliou a influência de diferentes polifenóis no acúmulo lipídico das placas ateroscleróticas de *hamsters*. Ao final do estudo foi evidenciado que a dieta suplementada com resveratrol reduziu em 10% a concentração plasmáticas de colesterol total e em 76% a área das placas gordurosas em relação ao grupo controle. No mesmo sentido, Fukao et al (2004) ⁶², em estudo com ratos hipercolesterolêmicos, percebeu que o grupo tratado com resveratrol apresentou uma diminuição significativa de 30% na formação ateromatosa observada em aortas.

Os resultados encontrados nessa pesquisa são concernentes aos achados reportados na literatura científica. A dose utilizada de 2mg/kg/dia foi eficiente na diminuição da placa aterosclerótica. Ao final do período experimental, pode-se observar que os coelhos alimentados com dieta hipercolesterolêmica suplementada em resveratrol, apresentaram lesões ateroscleróticas em grau I enquanto que animais pertencentes ao grupo controle caracterizaram-se com lesões em estágios mais avançados (grau II e III).

Castro et al (2009) ⁶³, em estudo experimental, semelhante ao protocolo utilizado nessa pesquisa, corroboram com os resultados encontrados nessa pesquisa. Os coelhos que receberam dieta padrão adicionada a 1,5% de colesterol apresentaram lesões ateroscleróticas grau III, de acordo com os critérios de Stary ⁶⁴ na porção arterial analisada. E, nos animais que receberam a adição de 3mg/kg/dia, foi evidenciada a presença de lesões ateroscleróticas em estágios iniciais. Esses achados são semelhantes aos reportados por Wang e colaboradores (2002) ⁶⁵. Os pesquisadores evidenciaram que a oferta diária de 4mg/kg/dia de resveratrol, aos coelhos machos, foi responsável pela inibição da agregação plaquetária da porção aórtica estudada desses animais.

As propriedades anti aterogênicas do resveratrol, além das elencadas, podem ser atribuídas ao seu efeito na migração e proliferação de células musculares lisas. Estudos *in vitro* realizados com células musculares retirados da aorta bovina demonstraram que a utilização do resveratrol, independente da

dosagem utilizada, favoreceu a redução na hiperplasia intimal nas lesões induzidas^{66, 67}.

Outros autores também apontam o efeito benéfico do resveratrol na prevenção da integridade do endotélio em virtude da sua capacidade de inibir a expressão de moléculas de adesão (VCAM, ICAM e MCP – 1) e citocinas inflamatórias (IL – 6). Dessa forma, esse polifenol é considerado um modulador das moléculas inflamatórias da parede vascular endotélio^{68, 69, 70}.

8.3 EFEITO DO RESVERATROL NO PROCESSO ANTIINFLAMATÓRIO

O processo aterogênico deriva de uma resposta inflamatória. Respostas inflamatórias crônicas estão associadas à aterogênese, pois o aumento da produção de citocinas resulta na ativação endotelial. Inúmeros pesquisadores patologistas demonstram que o primeiro passo para o desenvolvimento da placa aterosclerótica seria a adesão dos monócitos no endotélio vascular com sua subsequente migração na parede do vaso arterial².

Vários mediadores, ou citocinas inflamatórias, têm sido utilizados na prática clínica e em estudos associados à patogênese da aterosclerose com o intuito caracterizar o processo inflamatório. Dessa forma, essas podem ser consideradas marcadores de risco cardiovascular (LIBBY, 2006).

Entre esses marcadores, destacam-se os utilizados no nosso protocolo experimental, como as moléculas solúveis de adesão celular: molécula de adesão vascular – 1 (VCAM - 1), assim como também, a proteína química atrativa de monócitos (MCP – 1) e a interleucina 6 (IL – 6). Em adição, Charo et al (2004) ⁷¹ salienta que a interação desta rede de marcadores inflamatórios (quimiocinas) desempenha um papel essencial na patogênese da doença vascular e é considerado como um importante alvo terapêutico para limitar a progressão da aterosclerose.

Diversos fatores dietéticos contribuem tanto para a etiologia quanto para a prevenção do processo aterosclerótico. No que se refere à gênese das placas ateroscleróticas, evidências científicas sugerem que os macronutrientes da dieta promovam o estresse oxidativo, contribuindo, dessa forma, para a gênese do processo inflamatório crônico. Entre os macronutrientes, os lipídeos são os mais estudados quanto ao efeito dos componentes da dieta na inflamação. Sugere-se que a ingestão de uma refeição com alto conteúdo lipídico leve à ativação endotelial, fato esse evidenciado pelas elevadas concentrações de moléculas de adesão celular circulantes ⁷¹.

Em estudo experimental, Shi et al (2005) ⁷² analisaram artérias femorais de babuínos adultos, os quais foram alimentados por 7 semanas com dieta hipercolesterolêmica. Após 3 semanas de experimentação verificou-se um

aumento de 85,6% nas concentrações séricas de colesterol total, atingindo ao final de sete semanas de experimentação um acréscimo de 105%, quando comparadas com os níveis basais. Alterações nos níveis de citocinas inflamatórias como MCP – 1 e IL – 6, também foram observadas. Ao final do estudo, percebeu-se um acréscimo significativo para esses marcadores nos animais que receberam dieta enriquecida em colesterol. Dessa forma, os autores concluíram que uma alimentação rica em colesterol pode ser considerada pró – aterogênica. Stary (1994)⁶⁴ reporta que a hipercolesterolemia é responsável por um aumento na aderência de monócitos no endotélio de diferentes modelos animais (suínos, coelhos, macacos e pombos)

Essas afirmativas são concernentes com nossos achados experimentais. A administração diária de uma dieta hipercolesterolêmica desencadeou a formação de lesões ateroscleróticas associadas à presença de processo inflamatório, principalmente, no grupo controle. Ambos os grupos apresentaram aumento nas moléculas de adesão VCAM – 1. Porém, evidenciou-se diferenças estatísticas significativas nas áreas positivas para VCAM – 1 entre os grupos. Os coelhos que receberam administração diária de resveratrol apresentaram concentrações de VCAM – 1 inferiores.

Vários autores têm defendido propriedades antiinflamatórias do resveratrol por mecanismos de inibição da expressão endotelial de moléculas de adesão, desacelerando o processo aterogênico pelo menor recrutamento de leucócitos para o espaço subendotelial ⁶⁸. Wung et al (2005) ⁷⁰ complementa que uma das propriedades vasoprotetoras do resveratrol é a regulação da expressão de moléculas envolvidas na atividade inflamatória.

Diante deste mecanismo fisiopatológico, a eficácia terapêutica do resveratrol também foi atribuída a ações antiinflamatórias de atenuação da expressão gênica de ICAM-1 induzida pela IL-6 nas células endoteliais por meio da inibição da sinalização da STAT3 ⁷⁰.

A atividade do resveratrol na adesão endotelial de monócitos e granulócitos foram avaliadas *in vitro* em culturas de células endoteliais de veia umbilical humana e de veia safena humana. Foi demonstrado que o resveratrol, em concentrações de 1µmol/L e 100nmol/L, inibiu significativamente a

expressão de moléculas de adesão intracelular 1 (ICAM-1) pelas células endoteliais de veia umbilical em comparação com as células estimuladas por TNF- α sem adição de resveratrol. Também foi observada inibição da expressão de moléculas de adesão de células vasculares 1 (VCAM-1) e pelas células endoteliais de safena em comparação com as células não expostas ao resveratrol. Este trabalho sugere que o resveratrol pode exercer seu efeito pela modulação da ativação endotelial ao invés da ativação dos neutrófilos, demonstrando um efeito independente da sua função antioxidante ⁶⁸.

A proteína química atrativa de monócitos (MCP – 1), sintetizada pelas células endoteliais, exerce, também, um papel fundamental na formação das lesões ateroscleróticas. Charo & Taubman (2004) ⁷¹ salientam que a MCP-1 é secretada mediante a presença de alguns estímulos aterogênicos dos quais fazem parte: oxidação do LDL – colesterol, indução de células endoteliais e células musculares, além de permitir a infiltração dos monócitos na parede vascular da camada íntima.

Norata et al (2007) ⁷³ observaram em aortas de ratos, suplementados com a oferta diária de catequinas e resveratrol uma redução na presença de MCP – 1 na parede vascular. Os autores observaram a eficácia terapêutica do resveratrol na prevenção da aterosclerose. Em estudo experimental com camundongos, observou-se que a administração de um “mix” de polifenóis (catequinas, ácido caféico e resveratrol), por 8 semanas, reduziu significativamente a presença da placa aterosclerótica em 40 e 36% no seio da aorta e da aorta ascendente, respectivamente. Essa redução foi associada com uma redução da expressão de marcadores de macrófagos, linfócitos (Th1 e Th2) e de MCP-1, na parede vascular. Ao avaliar a expressão de MCP – 1 em culturas celulares que receberam resveratrol, Cullen et al (2007) ⁷⁴ notaram que a síntese dessa proteína quimiotática foi significativamente menor quando comparada com o grupo controle.

Esses dados corroboram com nossos resultados experimentais. Afinal, os animais do grupo resveratrol apresentaram uma redução, com significância estatística ($p=0,039$), na expressão gênica de MCP-1 quando comparados com o grupo controle.

Diversos achados apontam que o resveratrol inibe a produção de mediadores inflamatórios, dentre eles as interleucinas, em diferentes modelos experimentais, tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Na presente pesquisa, observa-se que a expressão de IL-6 foi significativa menor ($p=0,015$) no grupo que recebeu resveratrol. Resultados semelhantes foram observados por Wung et al (2005)⁷⁰. Os pesquisadores estudaram os efeitos antiaterogênicos do resveratrol em artérias bovinas. Ao final do estudo, constatou-se que a administração de resveratrol inibiu a expressão gênica da IL-6.

9 CONCLUSÃO

A administração diária de resveratrol não reduziu os níveis séricos de LDL – C e colesterol total. Porém, por meio das análises histológicas e morfométricas, observa-se que resveratrol foi eficaz prevenindo a formação da lesão aterosclerótica, além de ter apresentando efeito antiinflamatório, nos animais submetidos à dieta hipercolesterolêmica a 1%.

10 REFERÊNCIAS

1. Ross R. Atherosclerosis – An inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-26, 1999.
2. Delmas D, Jannin B, Latruffe, N. Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol Food Res* 49:377-95, 2005.
3. Fornés NE, Martins IS, Velásquez - Meléndez G. et al. Escores de consumo alimentar e níveis lipêmicos em população de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública* 36(1):12-8, 2002.
4. Magalhães ME, Brandão AA, Freitas EV. et al. Novas perspectivas no tratamento das dislipidemias. *Revista da SOCERJ* 17(2): 105-111, 2004.
5. Renaud S, Lorgeil M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992;339:1523–1526.
6. Zamora-Ros, R, et al. Resveratrol metabolites in urine as a biomarker of wine intake in free-living subjects: The PREDIMED Study, *Free Radic. Biol. Med.* 2009.
7. Stervbo U, Vang O, Bonnesen C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry.* 2007;101:449–457.
8. Zhang WJ, Björn LO. The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants, *Fitoterapia* ;2009.
9. Queiroz A N, et al. A theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol. *European Journal of Medicinal Chemistry* .2009; 44:1644–1649.
10. Brito PM, et al. Resveratrol inhibits the mTOR mitogenic signaling evoked by oxidized LDL in smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2008;
11. Gouedard C, Barouki R, Morel Y. Induction of the Paraoxonase-1 Gene Expression by Resveratrol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*24:2378-2383, 2004.
12. Camacho CRC, Dias-Melício A, Soares AMVC. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. *Arq Cienc Saúde*, 14:1-41-48, 2007.
13. Kang O-H, et al. Anti-inflammatory mechanisms of resveratrol in activated HMC-1 cells: Pivotal roles of NF- κ B and MAPK. *Pharmacol Res.* 2009, xxx (2009) xxx–xxx

14. Lee M et al. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma. *International Immunopharmacology*.; 9: 418–424. 2009.
15. Lin J, Lin S, Chih C, et al. Resveratrol reduces infarct size and improves ventricular function after myocardial ischemia in rats. *Life Sciences*.; 8: 3313–317. 2008.
16. Romaldini C, Issler H, Cardoso A et al. Fatores de risco para aterosclerose em crianças e adolescentes com história familiar de doença arterial coronariana prematura. *Jornal de Pediatria*, 80:135-40, 2004.
17. Giroldo M, Alves AS, Baptista. Doença aterosclerótica: uma patologia multi-fatorial. *SaBio-Rev. Saúde e Biol*, 2:1, 32-41, 2007.
18. Baldellino K, Wolf ML, Reilly MP, Rader D. Endothelial lipase concentrations are increased in metabolic syndrome and associated with coronary atherosclerosis. *Plos Medicine* 3:2, 1-8, 2006.
19. Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 48:549-54, 1987.
20. Serrano JCV, Fernandes JL, Luz PL. Moléculas de adesão, inflamação e endotélio. In: Luz PL, Laurindo, FRM, Chagas ACP. *Endotélio Doenças Cardiovasculares*. São Paulo: Ed. Atheneu, p 97-113, 2003.
21. _____. Portaria n. 398, de 30 de Abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, 03 de maio de 1999. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=107> Data de acesso: 10/05/2008.
22. Hasler CM. Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. *Food Technol* 52(11):63-70, 1998.
23. Uauy R, Valenzuela A. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nutrition*, New York 16(7/8) p.680-684, 2000.
24. Araya H, Lutz MR. Alimentos funcionales y saludables. *Rev Chil Nutr* 30(1):8-14, 2003.
25. Alarco C, Villegas L. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions* 35:5, 1156-60, 2007.

26. Cai Y, Fang J, Ma L, Yang L, Liu Z. Inhibition of free radical-induced peroxidation of rat liver microsomes by resveratrol and its analogues. *Biochimica et Biophysica Acta* 1637: 31-38, 2003.
27. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* 30: 91-112. 1997.
28. Delmas D, Jannin B, Latruffe, N. Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol Food Res* 49:377-95, 2005.
29. Hatcher H, Planalp R, Cho J, Tortia FM, Torti SV. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci.*65(11):1631-52, 2008.
30. Athar M, Back J, Kopelovich L, et al. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.*;5:1-7, 2009.
31. Zou J.; Wang Z, Cao K. et al. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipids levels. *Int J Molec Med* 16:533-540, 2005.
32. Kolodgie PD, Petrov A, Virmani R. et al. Targeting of apoptotic macrophages and experimental atheroma with radiolabeled annexin V: a technique with potential for noninvasive imaging of vulnerable plaque. *Circulation.* 108:3134-9, 2003.
33. Prasad K. Dietary flaxseed in prevention of hypercholesterolemic atherosclerosis. *Atherosclerosis* 132:69-76, 1997.
34. Prasad K. Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effect of flax lignan complex isolated from flaxseed. *Atherosclerosis* 179:269-275, 2005.
35. Brasil. Procedimento e métodos de eutanásia em animais. Resolução número 714 de 20 de Junho de 2002. Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV – 23 de Outubro de 1968. Disponível em: http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_714.htm
Data de acesso: 05/02/2008.
36. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB. et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis – prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 85(1):391-405, 1992.
37. Frank B, Manson JE, Willet WC. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: A critical review. *J Am Coll Nutr* 20(1):5-19, 2001.

38. Zhao SP., Liu L.; Gao M.; Zhou, QC. et al. Impairment of endothelial function after a high-fat meal in patients with coronary artery disease. *Coronary Artery Disease*, London, v.12, n. 7, p.561-565, 2001.
39. Moghadasian MH. Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life Sci* 70(8):855-65, 2002.
40. Naderali E C. Obesity and cardiovascular dysfunction: A role for resveratrol? *Obesity Research & Clinical Practice* 2009; 3: 45—52.
41. Ahn, J.; Kim, IC.; Know D. et al. Dietary resveratrol alters lipid metabolism – related gene expression of mice on atherogenic diet. *Journal of hepatology* 49:1019-1028, 2008.
42. Hattori R, Otani H, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Heart Circ Physiol*, 282:1988-95, 2002.
43. Dulak J. Nutraceuticals as anti-angiogenic agents: hopes and reality. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 56(1):51-69, 2005.
44. Kusano, C., Ferrari B.; Ferraz SEA. Perspectivas da pesquisa em biologia molecular aplicada à nutrição, 27(11), 592-598, 2002
45. Nigdikar SV.; Williamns NR.; Griffin BA.; Howard AN. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr*, 68:258-65, 1998.
46. Shanhanmuganayagam D. Warner, T. F.; Krueger, C. G.; Reed, J. D.; Folts, J. D. Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*, Limerick, v.190, n. 9, p. 135–142, 2006.
47. Castro M., Veiga A.; Machado M.R.F. Plasma lipid profile of experimentally induced hyperlipidemic New Zealand white rabbits is not affected by resveratrol. *Inter J Appl Res*, 9(1):1822-195, 2009.
48. Wilson T, Knight TJ, Beitz DC et al. Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sci*, 59:115-121, 1996.
49. Wakabayashi Y. Effect of Red Wine Consumption on Low-Density Lipoprotein Oxidation and Atherosclerosis in Aorta and Coronary Artery in Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, vol. 46, n. 11, p. 4724-4730, 1999.
50. Zou JG.; Wang ZR.; Huanhg YZ.; Cao KJ et al. Effect of red wine and wine polyphenol resveratrol on endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *International Journal of Molecular Medicine*, 11:317-20, 2000.

51. Auger C.; Caporiccio B.; Landrault N. et al. Red Wine Phenolic Compounds Reduce Plasma Lipids and Apolipoprotein B and Prevent Early Aortic Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Golden Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J. Nutr.* 132:1207-1213, 2002;
52. Fremón L.; Belguendouz L.; Delpal, S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sciences, Basel*, v. 64, n. 6, p. 2511-2521, 1999.
53. Hansen AS, Marckmann P, Dragsted LO. et al. Effect of red wine and red grape extract on blood lipids, haemostatic factors, and other risk factors for cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr* 59(3):449-55, 2005.
54. Rimm EB, Willians P.; Fosher K. et al. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *BMJ*, 310:1523-1528, 1999
55. Friedman, M.; Byers SO.; *Atherosclerosis* 43:349-359, 1963.
56. Daugherty A.; Sconfeld G.; Sobel, BE et al. *J Clin Invest* 77:1108-1115, 1986.
57. Gimborne MA. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 75:67B-70B, 1995.
58. Prasad K. Antihypertensive activity of secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed: role of guanylate cyclase. *Int J Angiol* 13:7-14, 2004.
59. Lee P, Prasad K. Suppression of oxidative stress as a mechanism of reduction of hypercholesterolemic atherosclerosis by cyclooxygenase inhibitors. *Int J Angiol* 12:13-23, 2003.
60. Zern TL.; West KL.; Fernandez ML. Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized guinea pigs. *J Nutr*, 2003;133:2268-2272.
61. Auger C.; Teissedre, PL.; Gérain P.; et al. Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *J Agric Food Chem*, 53:2015-2021, 2005.
62. Fukao H.; Ijiri Y.; Miura M.; Hashimoto M. et al. Effect of trans-resveratrol on the thrombogenicity and atherogenicity in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Blood Coagul Fibrinolysis*; 15:441-6, 2004.

63. Castro M., Pacheco M.R.; Machado M.R.F. Morphology of aortic arch in rabbits with atherosclerosis treated with resveratrol. *Inter J Appl Res*, 7(4):190-195, 2009.
64. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE. et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 92:1355-74, 1994.
65. Wang Z.; Zou J.; Huang Y.; et al. Effect of resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *Clin Med J*, 2002;115(3):378-80.
66. Araim O.; Ballantyne J.; Waterhouse A.L. et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation with red wine and red wine polyphenols. *J Vasc Surg* 35:1226-1232, 2002;
67. Gu, J.; Wang, CQ.; Ding, HY. et al. Effects of resveratrol on endothelial progenitor cells and their contributions to reendothelialization in intima injure rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 47:711-721, 2006;
68. Ferrero ME.; Bertelli AAE.; Fulgenzi A. et al. Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. *Am J Clin Nutr*, 68:1208-14, 1998.
69. Manna SK.; Mukhopadhyay A.; Aggarwal B. Resveratrol suppresses TNF-Induced activation of nuclear transcription factors NF-KB. Activator Protein – 1 and apoptosis. Potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *Immunol* 164:6509-6519, 2000.
70. Wung BS.; Su MC.; Wu CC.; Hsieh CW. Resveratrol suppresses IL-6-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells: Effects on the inhibition of STAT3 phosphorylation. *Life Sciences*, 78:389-97, 2005.
71. Charo IF.; Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res* 95:858-66, 2004.
72. Shi Q, Vandeberg, JF, Jett C. et al. Arterial endothelial dysfunction in baboons fed a high – cholesterol, high – fat diet. *Am J Clin Nutr* 82:751-9, 2005.
73. Norata GD, Marchesi P, Passamonti S. et al. Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of catechin, caffeic acid and trans-resveratrol in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis* 191(2):265-71, 2007.
74. Cullen JP.; Morrow, D.; Jin Y. et al. Resveratrol inhibits expression and binding activity of the monocyte chemoattractant protein – 1 receptor, CCR2, on THP-1 monocytes. *Atherosclerosis* 195:125-133, 2007;

ANEXOS

ANEXO A – LAUDO TÉCNICO DO RESVERATROL UTILIZADO NA PESQUISA

RESVERATROL® EXTRACT

Cedido por: Farmadoctor – Comércio de Medicamentos.

Produzido por: Galena® Química e Farmacêutica Ltda.

Data de fabricação: 27/08/2005.

Data de validade: 27/08/2007.

Fórmula molecular: C₁₄H₁₂O₃.

Classe terapêutica: antioxidante, vasoprotetor.

Fator de correção: 8%.....

Análises/componentes (APROVADO EM 2/12/2005):

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS:

ANÁLISES/COMPONENTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS DAS ANÁLISES
Descrição	Pó marrom a marrom avermelhado	Pó marrom
Odor	Característico	Característico
Doseamento	Mínimo: 8,0%	8,18%
Umidade	Não mais que 7%	6,6%
Densidade aparente	Informativo	0,5g/mL

MICROBIOLÓGICO:

ANÁLISES/COMPONENTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS DAS ANÁLISES
Fungos e leveduras	Não mais que 100ufc/g	5 x 10 ufc/g
Contagem de bactérias	Não mais que 10000 ufc/g	< 10 ufc/g
Salmonella sp	Ausente	Ausente
Escherichia coli	Ausente	Ausente
S. aurea	Ausente	Ausente
P. aeruginosa	Ausente	Ausente

RESVERATROL 10% SUSPENSÃO

DESCRIÇÃO	QUANTIDADE
Resveratrol	10 g
Nipagin	0,1g
Glicerina	10 g
Polietilenoglicol 400	5 g
Xarope simples	40 g
Gel de goma xantana 2%	4 g
Água destilada	100 ml