



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO DA REDE NORDESTE EM
BIOTECNOLOGIA RENORBIO**

FRANCISCO CHAVIER VIEIRA BANDEIRA

**ESTUDO COMPARATIVO DA *MORINGA OLEIFERA* COM CILOSTAZOL NO
TRATAMENTO DA HIPERPLASIA MIOINTIMAL EM ARTÉRIA ILÍACA DE
COELHOS COM ATEROSCLEROSE**

**Maceió
2015**

FRANCISCO CHAVIER VIEIRA BANDEIRA

ESTUDO COMPARATIVO DA *MORINGA OLEIFERA* COM CILOSTAZOL NO
TRATAMENTO DA HIPERPLASIA MIOINTIMAL EM ARTÉRIA ILÍACA DE
COELHOS COM ATEROSCLEROSE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) com ponto focal na Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Benjamin Brandão Pitta

Coorientador: Aldemar Araújo Castro

Maceió

2015

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Maria Helena Mendes Lessa

B214e Bandeira, Francisco Chavier Vieira.

Estudo comparativo da *moringa oleifera* com cilostazol no tratamento da hiperplasia miointimal em artéria ilíaca de coelhos com aterosclerose / Francisco Chavier Vieira Bandeira. – Maceió, 2015.
125 f.: il. Tabs.

Orientador: Guilherme Benjamin Brandão Pitta.

Coorientador: Aldemar Araújo Castro.

Tese (Doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2015.

Bibliografia. f. 90-96.

Anexos: f. 97-126.

1. Hiperplasia. 2. Coelhos. 3. *Moringa oleifera*. 4. Aterosclerose.
5. Cilostazol. I. Título.

CDU: 54

FRANCISCO CHAVIER VIEIRA BANDEIRA

“Estudo Comparativo da Moringa Oleifera com Cilostazol no Tratamento da Hiperplasia Miointimal em Artéria Íliaca de Coelhos com Aterosclerose”.

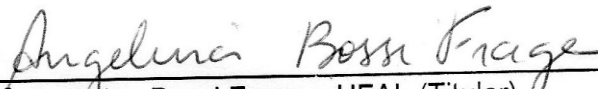
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 29/05/2015.

BANCA EXAMINADORA



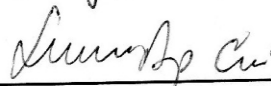
Prof. Dr. Guilherme Benjamim Brandão Pitta – UNCISAL (Orientador/Presidente)



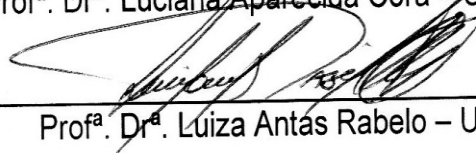
Prof^a. Dr^a. Angelina Bossi Fraga – UFAL (Titular)



Prof. Dr. Josealdo Tonholo – UFAL (Titular)



Prof^a. Dr^a. Luciana Aparecida Cora – UNCISAL (Titular)



Prof^a. Dr^a. Luíza Antas Rabelo – UFAL (Titular)

ATA – DEFESA DE TESE

Ata de Defesa de Tese de Doutorado do aluno FRANCISCO CHAVIER VIEIRA BANDEIRA. Aos vinte e nove (29) dias do mês de maio do ano de 2015, às 9h00, reuniu-se no auditório do Hospital Arthur Ramos, a banca de Defesa de Tese composta por Prof. Dr. Guilherme Benjamim Brandão Pitta, Universidade Estadual de Ciências e Saúde de Alagoas - UNCISAL, Orientador/Presidente, Prof^a. Dr^a. Angelina Bossi Fraga – UFAL, Prof. Dr. Josealdo Tonholo – UFAL, Prof^a. Dr^a. Luciana Aparecida Cora – UNCISAL, e Prof^a. Dr^a. Luiza Antas Rabelo – UFAL, perante a qual **Francisco Chavier Vieira Bandeira**, aluno regularmente matriculado no Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, defendeu, para preenchimento do requisito de doutor, sua Tese intitulada “**Estudo Comparativo da Moringa Oleifera com Cilostazol no Tratamento da Hiperplasia Miointimal em Artéria Íliaca de Coelhos com Aterosclerose**”

A defesa da referida tese ocorreu, das 09 às 13:30L, tendo o doutorando sido submetido à sabatina, dispondo cada membro da banca do tempo para tal. Finalmente, a banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar o doutorando APROVADO por sua tese e sua defesa terem, por unanimidade, recebido o conceito A.

Eu, Guilherme Benjamim Brandão Pitta, que presidi a Banca de Tese, assino a presente ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Em Maceió - AL, 29 de maio de 2015.

Prof. Dr. Guilherme Benjamim Brandão Pitta

Prof^a. Dr^a. Angelina Bossi Fraga

Prof. Dr. Josealdo Tonholo

Prof^a. Dr^a. Luciana Aparecida Cora

Prof^a. Dr^a. Luiza Antas Rabelo

ADENDO:

Aos meus queridos pais; Pedro Noslasco Bandeira e Maria Vieira Bandeira, (In memoriam) responsáveis pela minha existência, pela construção de minha personalidade e de meu caráter.

À minha querida esposa e companheira de todas as horas, FÁTIMA, que recebeu, com lucidez, os momentos difíceis, e, sempre, encontrou palavras de apoio e de incentivo, para que eu pudesse concluir este trabalho.

Aos meus queridos filhos, RAFAEL, RODRIGO E RAMOON, que souberam entender com carinho a minha ausência, não só em decorrência deste trabalho, como também em tantas outras situações da minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar capacidade de ser forte, porque o forte nunca desiste. Por me dar saúde, porque a saúde fortalece o homem, refrigera a alma e alimenta a mente. Por me dar sabedoria para discernir o certo do errado. Por me dar força para sonhar, porque quem sonha, uma hora acorda para sentimentos adormecidos, mostrando que nunca é tarde para os sonhos serem realizados.

A Professora, Doutora, MARGARETH DE FÁTIMA FORMIGA MELO DINIZ, Magnífica Reitora da Universidade Federal da Paraíba, por ter aberto as portas desta Universidade para que eu pudesse realizar esta pesquisa.

Ao Professor, Doutor, GUILHERME BENJAMIN BRANDÃO PITTA, Professor Adjunto do Núcleo de Saúde do adulto e do idoso da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, UNCISAL, por sua atenção e amizade, pelos ensinamentos e seriedade com que conduziu a orientação deste trabalho.

Ao Professor, Mestre, ALDEMAR ARAÚJO CASTRO da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, UNICISAL, Maceió-AL, pelos ensinamentos de metodologia aplicados e co-orientação para que eu pudesse concluir este trabalho.

Ao amigo, PAULO ROBERTO DA SILVA LIMA, pelo importante auxílio nesta pesquisa; os dados da literatura para a fundamentação e valorização contextual, como, principalmente, a valiosa ajuda no entendimento da histologia, deste estudo.

Aos colegas que formaram o grupo deste estudo: JÂNIO CIPRIANO, MANOEL RICARDO, MIZAEEL PORDEUS E PAULO LIMA, pelo coleguismo e estímulo, o que me fortaleceu para a realização desta pesquisa.

Ao professor, JEOVAH COLAÇO, Professor do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, pelo constante estímulo científico, pela amizade e pelos importantes ensinamentos, transmitidos durante toda a minha vida profissional.

Aos colegas do Serviço de Cirurgia Vasculuar do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba: Dr. JOSÉ ALEXANDRE LIMA, Dra. JOSÉLIA DE ALMEIDA RODRIGUES, pelo companheirismo, dedicação a medicina e estímulo ao conhecimento científico.

A todos os colegas do curso CENDO e do RENORBIO pelo incentivo constante, troca de conhecimentos, companheirismo, amizade e estímulo.

A Doutora, ALBALÚCIA MARIA DA COSTA CARVALHO, bioquímica do Hospital Universitário Lauro Wanderlei, pela dedicação com que me ajudou a conduzir os exames de cultura e antibiograma das lesões de pele dos animais, deste estudo.

Ao Doutor, ANTÔNIO CARLOS, bioquímico do laboratório de bioquímica da Universidade Federal da Paraíba, pela ajuda e empenho na realização dos exames bioquímicos do lipidograma dos coelhos, desta investigação.

A professora, IVONETE ARRUDA, pelos ensinamentos que abriram minha visão para a importância do estudo, que só através dele se obtém o conhecimento científico para as grandes descobertas.

Ao amigo, JOSÉ VIEIRA DA SILVA, pela valiosa ajuda, dedicação e zelo com os animais desta pesquisa, para que o sucesso deste estudo pudesse ser obtido.

Ao Senhor, JOSÉ CRISPIM DUARTE, técnico chefe do Biotério do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, pela dedicação e condução das atividades, neste centro de pesquisa e pela orientação que me ajudou na condução dos animais, desta investigação.

Ao Senhor, RAIMUNDO NONATO DA SILVA FILHO, técnico administrador do laboratório de química da Universidade Federal da Paraíba, pela dedicação e comando no procedimento de extração das folhas da *Moringa oleifera*, para que eu pudesse realizar o extrato bruto das folhas desta planta.

Ao meu filho, RAFAEL NÓBREGA BANDEIRA, pela ajuda e cuidado com a pesagem semanalmente dos animais deste estudo e ajuda no processo de extração das folhas da *Moringa oleifera* no laboratório de bioquímica da Universidade Federal da Paraíba.

Ao meu filho, RODRIGO NÓBREGA BANDEIRA, pela ajuda nos procedimentos de angioplastia das artérias dos animais, desta pesquisa.

Ao enfermeiro, SORISMAR CAVALCANTE MENEZES, pela ajuda valiosa na realização das angioplastias nas artérias dos coelhos, desta investigação.

Ao Prof. Dr. JOZEMAR PEREIRA DOS SANTOS, professor do Departamento de Estatística da Universidade Federal da Paraíba, pela amizade e orientação para que eu pudesse realizar os métodos estatísticos empregados.

RESUMO

A hiperplasia da íntima permanece um desafio às intervenções vasculares por provocar redução da luz dos vasos com diminuição do fluxo sanguíneo aos tecidos, levando a complicações cardiovasculares como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e amputação de membros. A *Moringa oleifera* tem mostrado reduzir o colesterol sérico em 52% e a placa aterosclerótica em 86% nas carótidas de coelhos em dieta hipercolesterolêmica, mostrando assim, potencial considerável para prevenir doenças cardiovasculares e a hiperplasia miointimal. A *Moringa oleifera* apresenta potente ação antioxidante, efeitos: anti-inflamatório, hipolipemiante, hipocolesterolemiante, anti-hipertensivo, antitumoral e antidiabético, resultantes de seus componentes polifenólicos. Esses efeitos podem convergir para a inibição da hiperplasia miointimal. A amostra foi constituída de coelhos com aterosclerose induzida pela gema de ovo e desnudação endotelial da artéria ilíaca externa direita por balão. O Grupo (Cz) foi tratado com Cilostazol 50 mg/dia, o Grupo (Mo) tratado com 200 mg/kg de peso corporal de moringa ao dia e o Grupo (SF) tratado com 10 mL/dia, todos tratados por via oral durante cinco semanas. A variável primária foi a diferença de média de hiperplasia miointimal. As variáveis secundárias foram a média de espessura da parede em cada grupo, as médias de Colesterol total, Triglicérides, HDL, LDL, VLDL e na imuno-histoquímica: a média de área de C4d e de HHF35 monoclonal. A amostra foi estimada em 30 coelhos, divididos em três grupos de dez animais. Nos resultados, a diferença de média de hiperplasia miointimal avaliada por análise de variância ANOVA (*one way*) resultou em diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,0001$), com maior redução de média de espessura de parede miointimal no grupo (Cz), mostrando melhor resposta ao tratamento com o cilostazol. A avaliação da média inicial e final do colesterol total pela análise de variância; ANOVA (*two way*) entre os grupos, apresentou resultados estatisticamente significativos ($p = 0,0043$), mostrando também, maior redução pelo tratamento com o cilostazol. A média inicial e final do HDL em cada grupo, avaliados pela análise de variância; ANOVA (*two-way*), entre os grupos, apresentou diferença estatisticamente significantes ($p = 0,0044$), evidenciando maior média ou aumento de HDL pelo tratamento com a *Moringa oleifera*. Em conclusão, a diferença de média de hiperplasia miointimal na artéria ilíaca de coelhos com aterosclerose, tratados com *Moringa oleifera*, comparado com cilostazol, apresentou maior redução no grupo tratado com cilostazol.

Palavras-Chave: Hiperplasia. Coelhos. *Moringa oleifera*. Aterosclerose. Cilostazol.

ABSTRACT

The intimal hyperplasia remains as a challenge to vascular interventions because it causes vessel lumen reduction with weakened blood flow to the tissues, leading to cardiovascular complications such as myocardial infarction, stroke and limb amputations. *Moringa oleifera* has shown efficiency to reduce serum cholesterol by 52% and 86% of atherosclerotic plaque in the carotid arteries of rabbits with hypercholesterolemic regimen, showing thus considerable potential to prevent cardiovascular diseases and myointimal hyperplasia. The *Moringa oleifera* has a powerful antioxidant activity, effects: anti-inflammatory, hypolipidemic, hypocholesterolemic, anti-hypertensive, anti-tumor and anti-diabetes responses, resulting from its polyphenol components. These effects may converge for inhibiting myointimal hyperplasia. The sample consisted of rabbits with atherosclerosis induced by egg yolk and endothelial denudation of the right external iliac artery by balloon. The Group "Cz" was treated with cilostazol 50 mg/day. Group "Mo" treated with 200 mg/kg body weight daily of *Moringa* and Group "SF" was treated with 10 ml/day, all orally treated for five weeks. Primary variable was the mean difference of myointimal hyperplasia. The secondary variables were the average vessel wall thickness in each group, the means of total cholesterol, triglycerides, HDL, LDL, VLDL and immunohistochemistry: the average area of C4d and monoclonal HHF35. The sample was estimated in 30 rabbits divided in three groups of ten animals. As results, the average difference of myointimal hyperplasia assessed by ANOVA analysis of variance (one way) resulted in a statistically significant difference between groups ($p < 0.0001$), with higher average reduction of myointimal wall thickness in the group "Cz", what shows a better response to treatment with cilostazol. The evaluation of the initial and final average of total cholesterol by analysis of variance; ANOVA (two way) between the groups showed statistically significant results ($p = 0.0043$), also presenting greater reduction by treatment with cilostazol. HDL initial and final means in each group evaluated by analysis of variance; ANOVA (two-way) between the groups, showed a statistically significant difference ($p = 0.0044$), reflecting higher average or increased HDL by treatment with *Moringa*. As conclusion, the average difference of myointimal hyperplasia in the iliac artery of rabbits with arteriosclerosis, treated with *Moringa oleifera* compared to cilostazol, presented a greater reduction in cilostazol treatment group

Keywords: Hyperplasia. Rabbits. *Moringa oleifera*. Atherosclerosis. Cilostazol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Componentes da <i>Moringa oleífera</i>	24
Figura 2 – Representação do delineamento experimental.....	39
Figura 3 – Delineamento dos animais da pesquisa.....	40
Figura 4 – Representação do cálculo do índice miointimal: At = área total; L = luz do vaso; Pm = parede miointimal.....	50
Figura 5 – Técnica para determinação da esteroscopia pela coloração imuno-histoquímica, C4d, Obj 40x.....	52
Figura 6 – Representação gráfica da comparação de média de hiperplasia miointimal entre os grupos (%).....	60
Figura 7 – Comparações múltiplas de médias de hiperplasia miointimal entre os grupos (%).....	61
Figura 8 – Fotomicrografia em HE, Obj. 10x da artéria íliaca direita do grupo Mo: <i>Moringa oleífera</i> (A).....	61
Figura 9 – Fotomicrografia em HE, Obj. 10x da artéria íliaca direita do grupo Mo: <i>Moringa oleífera</i> (B).....	62
Figura 10 – Fotomicrografia em HE, Obj. 10x da artéria íliaca direita do grupo SF: Soro Fisiológico.....	62
Figura 11 – Fotomicrografia em HE, Obj. 10x da artéria íliaca direita do grupo Cz: Cilostazol.....	63
Figura 12 – Fotomicrografia em Masson, Obj. 10x da artéria íliaca direita do grupo Mo: <i>Moringa oleífera</i>	63

Figura 13 – Fotomicrografia em Masson, Obj. 40x da artéria íliaca direita do grupo Mo: <i>Moringa oleífera</i>	64
Figura 14 – Fotomicrografia imuno-histoquímica C4d da artéria íliaca direita do grupo Mo: <i>Moringa oleífera</i> , Obj. 40x.....	64
Figura 15 – Fotomicrografia imuno-histoquímica HHF35 monoclonal, da artéria íliaca direita do grupo Mo; <i>Moringa oleífera</i> , Obj. 40x.....	65
Figura 16 – Fotomicrografia imuno-histoquímica HHF35 monoclonal, da artéria íliaca direita, do grupo SF; Soro Fisiológico, Obj. 10x.....	65
Figura 17 – Representação gráfica da comparação de médias de triglicerídeo entre os grupos.....	67
Figura 18 – Comparação múltiplas de médias de triglicerídeo entre os grupos.....	67
Figura 19 – Representação gráfica da comparação de médias de colesterol total entre os grupos.....	68
Figura 20 – Comparação múltiplas de médias de colesterol total entre os grupos...	69
Figura 21 – Representação gráfica da comparação de médias de HDL entre os Grupos.....	70
Figura 22 – Comparação múltiplas de médias de HDL entre os grupos.....	70
Figura 23 – Representação gráfica da comparação de médias de LDL entre os grupos.....	71
Figura 24 – Comparação múltiplas de médias de LDL entre os grupos.....	72
Figura 25 – Representação gráfica da comparação de médias de VLDL entre os grupos.....	73
Figura 26 – Comparação múltiplas de médias de VLDL entre os grupos.....	73

Figura 27 – Representação gráfica da comparação de médias de áreas de C4d Entre os grupos.....	75
Figura 28 – Comparação múltiplas de médias de áreas de C4d entre os grupos.....	76
Figura 29 – Representação gráfica da comparação de médias de áreas de HHF35 ventre os grupos.....	77
Figura 30 – Comparação múltiplas de médias de áreas de HHF35 entre grupos.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média, Desvio Padrão e IC95% dos pesos inicial e final segundo os Grupos (SF, MO e Cz).....	59
Tabela 2 – Média, Desvio Padrão e IC95% do percentual da área de parede nos grupos.....	66
Tabela 3 – Comparação dos valores médios inicial x final dos LIPIDOGRAMAS com respectivos percentuais de acréscimos ou decréscimos representados pelo valor da significância (p) em cada grupo.....	74
Tabela 4 – Distribuições conjunta da frequência de eventos, segundo o tipo de Drogas.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFD	Artéria Femoral Direita
CML	Célula Muscular Lisa
CT	Colesterol Total
Cz	Cilostazol
Desc	Descritores em Ciências da Saúde
ECMAL	Escola de Ciências Médicas de Alagoas
H ₁	Hipótese alternativa
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i>
Ho	Hipótese de nulidade
IMC	Índice de Massa Corpórea
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
Kg	Quilograma
m ²	Metro quadrado
Mg	Miligrama
MMP-2	Metaloproteinase – 2
MMP-9	Metaloproteinase – 9

Mo	<i>Moringa oleífera</i>
PDE3	Fosfodiesterase III
RENORBIO	Rede Nordeste de Biotecnologia
TG	Triglicerídeo
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Contexto.....	19
1.2	Objetivo geral.....	22
1.3	Objetivos específicos.....	22
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	Moringa oleifera; considerações iniciais.....	23
2.2	Hiperplasia miointimal.....	29
3	MÉTODOS	39
3.1	Tipo de estudo.....	39
3.2	Local.....	40
3.3	Amostra.....	41
3.3.1	Critérios de inclusão.....	41
3.3.2	Critérios de exclusão.....	43
3.3.3	Amostragem.....	43
3.4	Procedimentos.....	43
3.4.1	Grupos estudados.....	43
3.5	Variáveis.....	46
3.5.1	Variável primária.....	46

3.5.2	Variáveis secundárias.....	47
3.5.2.1	Colorações imuno-histoquímica.....	50
3.5.2.2	Áreas positivas para o marcador C4d.....	50
3.5.2.3	Áreas positivas para o marcador HHF35 monoclonal.....	53
3.5.3	Dados complementares.....	56
3.6	Método estatístico.....	57
3.6.1	Cálculo do tamanho da amostra.....	57
3.6.2	Análise estatística.....	57
3.6.2.1	Hipóteses estatísticas.....	58
3.6.2.2	Testes estatísticos.....	58
4	RESULTADOS.....	59
4.1	Desvios da pesquisa.....	59
4.2	Características da amostra.....	59
4.3	Variáveis.....	59
4.3.1	Variável primária.....	59
4.3.2	Variáveis secundárias.....	66
4.3.2.1	Médias de espessura de parede miointimal avaliada nos grupos.....	66
4.3.2.2	Avaliação do triglicerídeo.....	66
4.3.2.3	Avaliação do colesterol total.....	68
4.3.2.4	Avaliação do HDL.....	69

4.3.2.5	Avaliação do LDL.....	71
4.3.2.6	Avaliação do VLDL.....	72
4.3.2.7	Imuno-histoquímica.....	75
4.3.2.7.1	Esteroscopia C4D.....	75
4.3.2.7.2	Esteroscopia HHF35 monoclonal.....	76
5	DISCUSSÃO.....	79
5.1	Discussão dos métodos.....	79
5.2	Discussão dos resultados.....	82
5.3	Implicações para a prática clínica.....	87
5.4	Implicações para a pesquisa.....	87
6	CONCLUSÕES.....	89
	REFERÊNCIAS.....	90
	ANEXOS.....	97
	ANEXO A – Patente modelo de utilidade (Mu)	98
	ANEXO B – Protocolo n° 0512/09 do Comitê de Ética em Pesquisa do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba.....	99
	ANEXO C - Protocolo n. 64-A do Comitê em Pesquisa da Universidade de Ciências da Saúde.....	98
	ANEXO D – Termo de responsabilidade e compromisso do Pesquisador responsável.....	101
	ANEXO E – Termo de responsabilidade do orientador.....	102

ANEXO F – Termo de responsabilidade do biotério.....	103
ANEXO G – Termo de responsabilidade da instituição.....	104
ANEXO H – Formulário de Coleta de dados.....	105
ANEXO I – Execução laboratorial do Lipidograma	
A execução dos Triglicerídeo, Colesterol Total,	
HDL, LDL e VLDL foram realizados pelo método	
de calorimetria do Kit LABTEST exposto a seguir.....	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contexto

A hiperplasia da íntima permanece um desafio às intervenções vasculares por provocar espessamento e redução da luz dos vasos, impedindo o fluxo sanguíneo, adequado para os tecidos, levando a complicações cardiovasculares como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, amputação de membros (STERPETTI et al., 1996; MIN et al., 2007; TAKIGAWA et al., 2012; XU; SHI; CHEN, 2012; BAHNSON et al., 2015), e, como consequência, importante mortalidade mundial de aproximadamente 20 milhões de pessoas ao ano (XU; SHI; CHEN, 2012).

A *Moringa oleifera* tem mostrado efeito promissor sobre as doenças cardiovasculares, quando em estudo experimental, reduziu o colesterol total sérico em 52% e a placa aterosclerótica em 86% nas carótidas de coelhos em dieta hipercolesterolêmica, comparadas com as carótidas de coelhos do grupo controle com mesma dieta (CHUMARK et al., 2008), mostrando assim, potencial considerável para prevenir doenças cardiovasculares e a hiperplasia miointimal (MEHTA et al., 2003; CHUMARK et al., 2008). Também foi demonstrado, a inibição do espessamento da membrana basal de ratos diabéticos, quando comparados com os diabéticos não tratados (KUMAR GUPTA et al., 2013).

Esta ação da *Moringa oleifera* resulta de seus componentes em conjunto; principalmente, os flavonoides que se destacam entre os mais potentes antioxidantes vegetais (SIDDHURAJU; BECKER, 2003). Além de suas formas estruturais: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavononas, flavanol que são moléculas capazes de estabilizar ou desativar radicais livres antes do ataque celular (KALIORA; DEDOUSSIS; SCHMIDT, 2006).

O potencial da *Moringa oleifera* em prevenir as doenças cardiovasculares (CHUMARK et al., 2008), resultante de seus efeitos; anti-inflamatório e antioxidante vegetal, superior aos antioxidantes naturais (SIDDHURAJU; BECKER, 2003). Os antioxidantes naturais já haviam mostrado redução, significativa, da hiperplasia miointimal e da aterosclerose em coelhos, ratos, hamsters e em primatas não humanos (CHISOLM; STEINBERG, 2000).

Por estas razões, a *Moringa oleifera* tem importância medicinal, econômica-industrial e na produção de medicamentos e alimentos. Esses benefícios medicinais

para a humanidade são advindos dos efeitos; nutricionais, anti-inflamatório, hipolipemiante, hipocolesterolemizante, anti-hipertensivo, antitumoral, antioxidante e antidiabético (FAIZI et al., 1998; GHASI, NWOBODO; OFILI, 1999; MEHTA et al., 2003; ANWAR et al., 2007; MOYO et al., 2012; HUSSAIN; MALIK; MAHMOOD, 2014).

Assim, a *Moringa oleifera* é uma planta tropical, utilizada como um importante complemento alimentar, em países da África, da Ásia, e, tem sido muito utilizada no nordeste brasileiro, na purificação da água para consumo humano, através do extrato das sementes (SANTOS, 2007). Desta forma, é uma planta muito valorizada nos países tropicais e subtropicais, pelo seu teor nutritivo e grande fonte de vitaminas. Assim, em sua composição, contém vitaminas; A, C, E, ácido nicotínico, ácido fólico, piridoxina, riboflavina, β -caroteno, sais minerais, aminoácidos, proteínas, fósforo, cálcio, ferro, que apresentam propriedades profiláticas e curativas para muitas enfermidades (MAKKAR; BECKER, 1997; ANWAR et al., 2007).

As doenças cardiovasculares, que se iniciam após uma lesão vascular; seja por angioplastia, por balão, *stents* ou pontes arteriais, induzem a proliferação e migração celular da camada média para formação da hiperplasia na íntima, inflamação com remodelamento da parede, formação de estenose e obstrução vascular, levando a complicações vasculares (NEWBY, 2006; GUZELOGLU et al., 2012; XU; SHI; CHEN, 2012).

Desta forma, durante o remodelamento da parede, altas taxas de reestenose por hiperplasia miointimal são relatadas após intervenções endoluminais, o que estimulou pesquisadores a estudar a biologia e a fisiopatologia da resposta vascular à lesão. Assim, surgiram os modelos experimentais com técnicas de desnudação endotelial por meio de balão expandido intraluminal, facilitando o entendimento da instalação da hiperplasia miointimal, após uma angioplastia (DAVIES, 2007).

Diante desses conhecimentos, surgiram pesquisas para a descoberta de mecanismos para inibir a hiperplasia da íntima, quando foram realizados experimentos com drogas, objetivando impedir essa complicação, após intervenções vasculares. Assim, inicialmente, o clopidogrel foi comparado com dobesilato de cálcio em coelhos com desnudação endotelial por balão e foi mostrado diminuição da hiperplasia miointimal, quando comparado com o grupo controle, não tratado (CORTELEKOGLU et al., 2006).

Da mesma forma, o cilostazol demonstrou reduzir a hiperplasia da íntima em artérias de coelhos submetidos à lesão endotelial por balão. Esse fármaco impede a

proliferação celular e inibe a infiltração de macrófago na parede arterial, reduz a atividade da proteína quimiotática do monócito-1 e diminui a expressão da enzima metaloproteinase 9. Seu efeito anti-inflamatório inibe a agregação plaquetária e a fosfodiesterase III (PDE3), o que leva a ação vasodilatadora e, por conseguinte, é útil no tratamento da claudicação intermitente. Isto pode fornecer uma forma promissora de prevenção de aterogênese e reestenose (TSAI et al., 2008).

De outra forma, porém, com o mesmo objetivo (USUI et al., 1999) demonstraram que a terapia fotodinâmica por irradiação intraluminal inibe a hiperplasia da íntima, após lesão endotelial por balão.

Também, (PARK et al., 2003) empregaram o paclitaxel, associado à antiagregante convencional e conseguiu redução da hiperplasia miointimal, como da reestenose após angioplastia intraluminal. Foi empregado o *stent*, eluído com paclitaxel após angioplastia em humanos e foi confirmada a redução da hiperplasia pela angiografia. Mostrou também que o paclitaxel é um agente antiproliferativo, usado para prevenir a reestenose, após implante de *stent* em coronárias.

Apesar dos avanços importantes na compreensão da fisiopatologia da hiperplasia miointimal e a experiência com os modelos experimentais com drogas, mostrando o retardo da hiperplasia miointimal, ainda não se conseguiu transformar esses conhecimentos em esquemas terapêuticos efetivos. Assim, a hiperplasia permanece uma complicação significativa como principal obstáculo a curto prazo, a perviedade vascular (DAVIES, 2007).

Diante das complicações, advindas da hiperplasia miointimal para a humanidade, a *Moringa oleifera* pode se tornar a solução para a redução desta enfermidade, devido seu promissor efeito sobre a dislipidemia e a aterogênese, o que sugere ser capaz de reduzir a hiperplasia miointimal e a reestenose. Desse modo, como não se conseguiu estudos, envolvendo a *moringa* no tratamento da hiperplasia, torna-se relevante responder à pergunta da pesquisa: qual a diferença de média de hiperplasia miointimal na artéria íliaca de coelhos com aterosclerose, tratados com *Moringa oleifera* comparado com o cilostazol?

1.2 Objetivo geral

Determinar a diferença de média de hiperplasia miointimal na artéria íliaca de coelhos com aterosclerose, tratados com *Moringa oleifera*, comparado com cilostazol.

1.3 Objetivos específicos

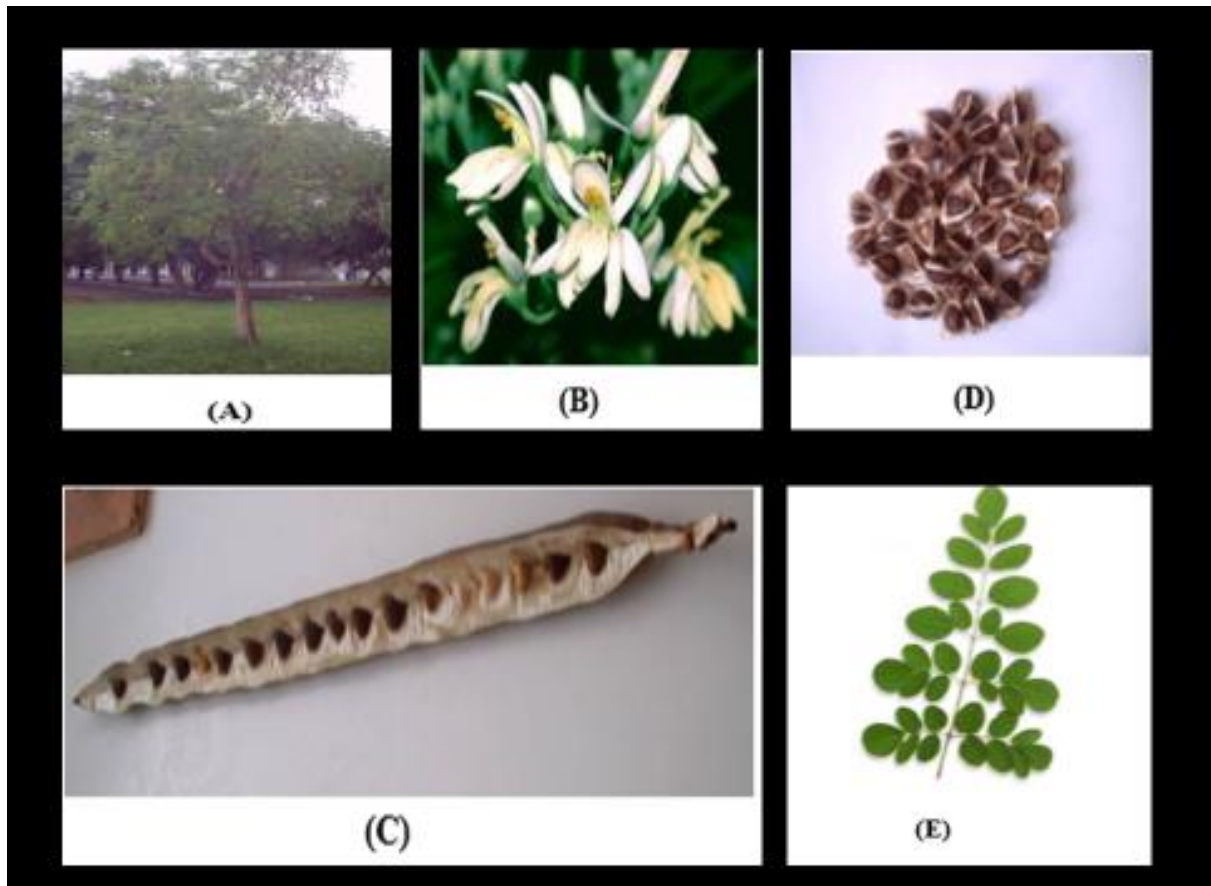
- ✓ Avaliar o efeito do extrato etanólico das folhas da *Moringa oleifera* comparado com cilostazol na redução da hiperplasia miointimal
- ✓ Verificar o efeito do extrato das folhas da *Moringa oleifera* comparado com cilostazol na redução de colesterol total, triglicérido, HDL, LDL e VLDE

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Moringa oleifera*; considerações iniciais

A *Moringa oleifera* Lam (*Moringa oleifera*) é um membro da família de plantas Moringaceae angiospermas. É originária do noroeste da Índia, porém difundida em muitos países e cresce em áreas semiáridas tropicais e subtropicais, sendo o seu habitat preferencial é em solo seco e arenoso. Na Tailândia, esta planta é cultivada em grande, onde as folhas e as vagens são utilizadas na medicina tradicional e, por isto, considerada uma planta medicinal pelas múltiplas utilidades de seus componentes (Figura 1), além de ser empregada no tratamento da água para o consumo humano (ANWAR et al., 2007; SAHAKITPICHAN et al., 2011; ASIYEDU-GYEKYE et al., 2014). Esta planta tem alto valor nutritivo alimentar em suas folhas, frutos, flores, sementes. Tem valor medicinal em todas as partes da planta e condimentar principalmente nas raízes. Tem ainda importância para a culinária e para a indústria de cosméticos, através do óleo extraído das sementes e do caule para produção de combustíveis (ANWAR; BHANGER, 2003; ANWAR et al., 2007; HUSSAIN; MALIK; MAHMOOD, 2014). Outros componentes encontrados na *Moringa oleifera* são: proteínas, gorduras, carboidratos, sais minerais, vitamina A, ácido nicotínico, ácido ascórbico, tocoferol, substâncias estrogênicas, o sitosterol. Além do mais, a *Moringa oleifera* apresenta também atividade bactericida e fungicida (ANWAR et al., 2007; HUSSAIN; MALIK; MAHMOOD, 2014).

Figura 1 – Componentes da *Moringa oleifera*



Fonte: Modificada de SANTOS, A. F. S. Moléculas bioativas de *Moringa oleifera*: detecção, isolamento e caracterização. 2007. 112 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

Notas: A: árvore; B: flores; C: vagem; D: sementes; E: folhas.

A importância da ação da *Moringa oleifera* nas dislipidemias foi avaliada por (GHASI; NWOBODO; OFILI, 1999), os quais mostraram efeito hipocolesterolêmico do extrato bruto das folhas da *Moringa Oleifera* em ratos da raça wistar. Quando avaliado o grupo de ratos com dieta rica em gordura tratado com *Moringa oleifera*, apresentou redução de 14,4% de colesterol no soro, estatisticamente, significante ($p < 0,001$). A redução de colesterol, pelo extrato bruto das folhas da moringa, indica que esta planta possui potencial valor medicinal e pode validar e explicar a sua utilização nos pacientes obesos e cardíacos, uma vez que já é usada pelos índios em sua medicina herbal como um agente hipocolesterolêmico em pacientes obesos.

Da mesma forma, em um estudo experimental (MEHTA et al., 2003) avaliou a ação hipolipemiante do fruto da *Moringa oleifera* em coelhos, alimentados com dieta hipercolesterolêmica a 5%. Nesse estudo, ainda avaliaram os níveis de colesterol total (CT), HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos e mostraram que a *Moringa oleifera* e a lovastatina, diminuíram os níveis séricos de colesterol total, de triglicerídeos, LDL,

VLDL. A lovastatina reduziu os níveis de HDL em coelhos hipercolesterolêmicos, enquanto a *Moringa oleifera* aumentou o nível de HDL, significativamente. Os achados encontrados no perfil lipídico após o uso da *Moringa oleifera*, mostram que esta planta pode diminuir a incidência de aterosclerose e de doença coronária, semelhante ao resultado encontrado, quando empregada a lovastatina. A redução do colesterol pode ser devido a mecanismos compensatórios como diminuição da reabsorção do colesterol endógeno ou aumento na taxa de secreção para o trato intestinal. Assim, a *Moringa oleifera* foi encontrada para reduzir a incidência de aterosclerose. Esse estudo sugere que a *Moringa oleifera* tenha ação hipolipidêmica, antiaterosclerótica, causando assim, a redução de peso corporal nos coelhos.

Por outro lado, Siddhuraju e Becker (2003), investigaram a atividade antioxidante da *Moringa oleifera* nos diferentes extratos de folhas. Foram empregados os solventes; água para o extrato aquoso, o metanol a 80% para o extrato metanólico e o etanol a 70% para o extrato etanólico. Desta forma, foi extraído o ácido ascórbico; um antioxidante natural, porém com atividade antioxidante baixa, quando comparada com a atividade antioxidante dos compostos fenólicos totais, flavonoides totais, quercetina e ácido linoleico. A concentração dos princípios ativos fenólicos antioxidante das folhas da moringa variou dependendo dos solventes empregados. foram comparados os diversos tipos de solventes para a extração destes componentes de uma amostra de 100 gramas de folhas da *Moringa oleifera* da Nicarágua. Assim, o extrato aquoso das folhas da moringa extraiu (7,43% e 10,83%), o extrato metanólico a 80% extraiu (12,33% e 14,07%) e o etanólico a 70% extraiu (11,04% e 10,14%) de produtos fenólicos totais e de flavonoides totais, respectivamente. A atividade antioxidante foi mostrada em 20% no extrato aquoso, em 65,1% no extrato metanólico a 80% e em 66,8% no extrato etanólico a 70%. Assim, o etanol e o metanol são solventes mais eficazes para a extração de antioxidantes polifenólicos e, portanto, mais eficazes catadores de radicais livres (peróxido e hidroxila). A concentração relativamente baixa de compostos fenólicos no extrato aquoso mostrou menor efeito sobre a inibição da peroxidação lipídica e também na eliminação de radicais livres, embora todos os extratos tiveram atividade alta na eliminação desses radicais. Os compostos fenólicos são bons doadores de elétrons e podem converter os radicais livres altamente oxidantes, como superóxido (O_2^-) e hidroxila ($\cdot OH$) em produtos mais estáveis, por doação de átomos de hidrogênio. Esta é uma ação benéfica dos compostos fenólicos, pois os radicais superóxidos têm

mostrado potencial para inativar as enzimas e degradar: DNA, membrana celular, polissacarídeos e matar as células.

Dentro desse contexto, Chumark et al. (2008) investigaram a ação antiaterosclerótica, hipolipemiante e antioxidante da *Moringa oleifera* em coelhos hipercolesterolêmicos da raça Nova Zelândia, com dieta suplementada com colesterol a 0,5%. Os autores compararam o emprego da sinvastatina na dose de 5 mg/kg/dia com o uso de 100 mg/kg/dia de extrato aquoso das folhas da *Moringa oleifera* durante 12 semanas. Avaliaram os níveis plasmáticos de colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeo antes do experimento e nas três avaliações seguintes, a cada quatro semanas. A sinvastatina e a *Moringa oleifera* reduziram, significativamente, os níveis de Colesterol, LDL e HDL e triglicerídeo ($P < 0.05$), porém, quando comparados entre si, não houve diferença significativa ($P > 0.05$). O extrato das folhas da *Moringa oleifera*, reduziu a formação da placa aterosclerótica na carótida interna de coelhos hipercolesterolêmicos em 86% e o colesterol sérico em 52%, quando comparado com o grupo hipercolesterolêmico sem nenhum tratamento. Os autores sugeriam que a *Moringa oleifera* tem alto potencial terapêutico para a prevenir a hiperplasia miointimal e, por conseguinte, as doenças cardiovasculares.

Em estudo com ratos da linhagem Wistar (LAMBOLE; KUMAR, 2011) avaliaram a toxicidade aguda da *Moringa oleifera* em ratos Wistar. Assim, foi administrado o extrato aquoso, e etanólico da casca da *Moringa oleifera* e água destilada ao grupo controle. Para estabelecer a dose letal (DL_{50}), foram seguidas as diretrizes da *Organization of Economic Co-operation and Development* (OECD 423), dose limite em três etapas. O extrato foi administrado na dose de 300, 2.000 e 5.000 mg/kg de peso corporal. Após a administração de uma dose única de extrato etanólico e aquoso, os animais foram observados por um período de 14 dias. Nenhum sinal ou sintoma anormal foram observados ou modificações laboratoriais, como também alteração no peso corporal e dos órgãos ou ainda alterações estruturais no fígado ou outros órgãos à autópsia. Não houve morte de nenhum dos animais; indicando a segurança do uso da do extrato. Os autores mostraram que o extrato da *Moringa oleifera* não é tóxico para a dose limite de 5.000 mg/kg de peso corporal. Deste modo, pertence às substâncias da classe 5; não incluída no sistema de Classificação Globalmente Harmonizado (GHC) para substâncias químicas com indicativos de elevado valor de DL_{50} .

De modo semelhante, (AWODELE et al., 2012) avaliaram a toxicidade aguda da *Moringa oleifera* por via oral, em seis grupos de cinco ratos albinos, em doses graduadas (400, 800, 1.600, 3.200 e 6.400 mg/kg) e o grupo controle; com 0,1 mL de água destilada. Os autores avaliaram também a toxicidade aguda intraperitoneal em cinco grupos de cinco ratos, em doses graduadas do extrato da moringa (250, 500, 1000 e 2.000 mg/kg) e o grupo controle; com 0.1 mL de água destilada. De outra forma, avaliaram ainda a toxicidade subcrônica do extrato da *Moringa oleifera* em doses (250, 500 e 1.500 mg/kg) e 0,2 mL de água destilada ao grupo controle, todos durante 60 dias. O extrato aquoso das folhas de *Moringa oleifera* não produziu mortalidade, quando administrado por via oral nas doses de 400 a 6.400 mg/kg. Porém, reduziu a locomoção e causou embotamento em alguns animais, tratados com doses mais altas que 3.200 e 6.400 mg/kg. Após a administração intraperitoneal, mostrou 20% e 80% de mortalidade para as doses mais altas de 1000 mg/kg e 2000 mg/kg, respectivamente. O rim, fígado, coração, cérebro e testículos foram colhidos para a histologia e sangue para avaliação bioquímica. A administração da moringa durante 60 dias, em todos os grupos, não causou diferença significativa ($p > 0,05$) nos parâmetros hematológicos, quando comparado com os grupos controles. Os resultados de histologia dos rins e do fígado em todos os grupos não revelaram diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao grupo controle. Não houve alteração na arquitetura dos hepatócitos, exceto, ligeira congestão dos hepatócitos nos grupos tratados. No entanto, houve redução significativa ($p < 0,05$) da contagem de espermatozoides no grupo tratado com 250 mg ($31,75 \pm 10,100$), comparado ao grupo controle ($42,00 \pm 5,274$). O exame microscópico do coração, cérebro e testículos não apresentou alterações físicas e arquitetônicas. Deste modo, a DL_{50} , nesse estudo, foi estimada em 1.585 mg/kg pelo método análise de probabilidade.

Em experimentos com coelhos da raça Nova Zelândia, (ROLIM, 2012) empregou a *Moringa oleifera* com a finalidade de inibir a hiperplasia miointimal. Os autores induziram a aterosclerose pela gema de ovo e a hiperplasia pela desnudação endotelial pelo balão de angioplastia. Foram realizadas análises bioquímica do colesterol total, triglicérido, HDL, LDL e VLDL inicial e final e os resultados mostraram não haver diferença, estatisticamente significativa, entre as médias dos componentes do lipidograma. Quando foram comparadas a diferença de média de hiperplasia miointimal entre o grupo tratado com *Moringa oleifera* na dose de 200 mg/kg/dia e o

grupo tratado com soro fisiológico durante 35 dias, os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa.

Ainda, Ajibade, Arowolo e Olayemi (2013) estudaram a toxicidade do extrato metanólico das sementes de *Moringa oleifera* em ratos da raça Wistar. A dose aguda foi administrada a três grupos de três ratos; sendo 1.000 mg/kg, 2.000 mg/kg e 3.000 mg/kg de peso, por via oral a cada grupo. Em uma segunda fase, os grupos receberam dose de 3.000 mg/kg, 4.000 mg/kg e 5.000 mg/kg de peso corporal por via oral, respectivamente. Após a administração do extrato metanólico nas doses; de 400, 800, e 1.600 mg/kg de peso corporal, a cada grupo respectivamente, durante 21 dias, os mesmos apresentaram redução de peso corporal, porém só foi significativa ($p < 0,05$) no grupo 1.600 mg/kg. Na dose aguda, nenhum sinal de toxicidade foi observado nas doses; 1.000 mg/kg, 2.000 mg/kg e 3.000 mg/kg. Por outro lado, os sinais de toxicidade foram observados na dose de 4.000 mg/kg, caracterizados por desconforto respiratório, imobilidade, resposta lenta aos estímulos externos, falta de coordenação, embotamento e desorientação. Os efeitos das doses crescentes do extrato metanólico das sementes da moringa sobre os parâmetros bioquímicos mostraram aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis de aspartato transferase (AST) (29.0 ± 7.3) e alanina transferase (ALT) (63.2 ± 12.7), quando comparados com o grupo controle AST (22.7 ± 1.2) e ALT (51.4 ± 13.7), respectivamente, na dose de 1.600 mg/kg de peso corporal, o que pode ser uma indicação de dano ao fígado. Desta forma, a dose máxima de segurança do extrato metanólico de semente de moringa foi calculada em 3.000 mg/kg e a dose letal mínima em 5.000 mg/kg. A dose letal (DL_{50}), mediana em ratos, foi calculada em 3.870 mg/kg.

O efeito protetor da *Moringa oleifera* sobre a membrana basal de vasos da retina de ratos com diabetes foi avaliada por (KUMAR GUPTA et al., 2013). A doença diabetes melitus foi induzida por estreptozotocina na dose de 45 mg/kg de peso corporal. Os ratos de ambos os sexos foram considerados diabéticos, quando o nível de glicose sanguínea atingiu 300 mg/dL. Vinte ratos diabéticos foram divididos em dois grupos, sendo o grupo I com dieta normal e o grupo II com mesma dieta, acrescida de *Moringa oleifera* na dose de 100 mg/kg de peso corporal pelo período de 24 semanas. Terminado o tratamento, foi realizada coleta de sangue para a bioquímica e os ratos foram sacrificados, com coleta dos olhos e isolamento das retinas. Foi observado uma taxa de glicemia no grupo diabético ($491,17 \pm 14,75$ mg/dL) significativamente maior do que no grupo normal ($95,67 \pm 7,31$ mg/dL) ($P < 0,001$). Em

ratos tratados com moringa, os níveis de glicose no sangue ($329,88 \pm 42,34$ mg/dL) foram significativamente menores do que no grupo diabético ($P < 0,001$), embora se mantiveram acima do normal ($P < 0,001$). Da mesma forma, a hemoglobina glicosilada no grupo dos diabéticos foi ($9,94 \pm 0,64$), significativamente, mais elevada do que no grupo normal ($3,66 \pm 0,40$) ($P < 0,001$). No grupo tratado com moringa, a hemoglobina glicosilada foi ($6,01 \pm 1,45$), significativamente, menor do que o grupo diabético ($P < 0,05$). A angiografia retineana demonstrou dilatação dos vasos da retina nos ratos diabéticos e ausência de dilatação no grupo normal ($p < 0,001$). Nos ratos diabéticos, tratados com moringa, foi demonstrado menor dilatação vascular, quando comparado com os ratos diabéticos ($p < 0,05$). Foi encontrado espessamento da membrana basal do capilar em ratos diabéticos. A angiografia da retina foi avaliada pela microscopia eletrônica e observada inibição do espessamento da membrana basal em ratos diabéticos, tratados com moringa. Os ratos não diabéticos tinham membrana basal normal e os diabéticos apresentavam espessamento importante dessa membrana. Esse estudo mostrou potencial efeito retino-protetor da moringa em retinopatia diabética experimental em ratos. A *Moringa oleifera* mostrou melhorar as disfunções vasculares, induzidas por hiperglicemia em ratos diabéticos.

2.2 Hiperplasia miointimal

Na tentativa de elucidar os mecanismos regulatórios da hiperplasia da íntima subjacentes a uma lesão endotelial por balão, Wei et al. (1997) observaram resposta proliferativa de células musculares lisas vasculares (CML) em artéria carótida de ratos. Assim, a lesão arterial induz à produção de ciclinas; E, A e Kinase Dependente de Ciclina (CDK2); proteínas reguladoras do ciclo celular para regular a proliferação de CML, cujas expressões são espacialmente e temporalmente correlacionadas com a proliferação de CML. Desta forma, a primeira resposta à lesão ocorreu até o terceiro dia (0 a 3 dias) com proliferação de CML na média e a migração para a camada íntima, entre (3 a 14 dias). Os níveis elevados de expressão dessas proteínas foram mantidos por até 10 dias após a lesão; coincidindo com o período em que o crescimento da neointima é mais rápido. A seguir, a proliferação celular, segundo os autores, parece contribuir para o crescimento da lesão da íntima entre uma e três semanas após a lesão. Desta forma, a CDK2 e as suas ciclinas reguladoras podem ser alvos adequados para a terapia de restenose.

Por outro lado, com o objetivo de entender os mecanismos de formação de neointima, através de modelos experimentais em animais de laboratório, De Meyer e Bult (1997) realizaram revisão bibliográfica sobre a formação da neointima, após um dano vascular induzido e para compreender o desenvolvimento das reestenoses após uma intervenção vascular. Desta forma, concluíram que a reestenose depende não somente da formação da hiperplasia neointimal, mas também, do recuo elástico agudo e da constrição crônica da parede arterial, durante o remodelamento, após uma angioplastia. Os autores observaram também falha da inibição da neointima, causada pela desnudação por balão, em artéria carótida de ratos, além da falência dos vários tratamentos com fármacos, sem reduzir a reestenose, após uma angioplastia.

Com a intenção de inibir a hiperplasia da íntima, Usui et al. (1999) empregaram um foto-sensibilizador, derivado da hematoporfirina (FDH) em artérias ilíacas de coelhos com aterosclerose após angioplastia, para determinar se a hiperplasia da íntima pode ser inibida pela terapia fotodinâmica (TFD). O controle foi na artéria ilíaca comum contralateral com lesão semelhante não irradiada. Histologicamente, a neointima foi mais evidente no sétimo e décimo quarto dia, após a lesão. Nos vasos não tratados pela TFD, a hiperplasia neointimal foi intensa em toda a circunferência. Não houve redução da hiperplasia neointimal nos grupos irradiados de imediato, no tempo zero e em três dias. Houve marcada redução da hiperplasia no sétimo e décimo quarto dia, com maior intensidade no sétimo dia, após a TFD. Foi mostrado que a TFD, por radiação intraluminal, inibe a hiperplasia da íntima e que é mais eficiente no sétimo dia após a lesão por balão, como também pode oferecer uma nova abordagem para a prevenção da reestenose após uma lesão por balão em humanos.

Em uma revisão, sobre a hiperplasia miointimal, Costa e Fagundes (2002) concluíram que esta enfermidade surge após um dano vascular, seja por uma revascularização com pontes autólogas, homólogas e sintéticas ou após uma angioplastia intraluminal com ou sem colocação de stent e também em vasos de órgãos transplantados. Esses procedimentos podem complicar pelo espessamento da camada íntima (hiperplasia intimal, neointima ou miointimal), com diferentes graus de estenoses luminal, oclusão e isquemia dos tecidos.

A avaliação da hiperplasia intimal e estenose foi realizada por Park et al. (2003) em lesões coronarianas humanas. O estudo foi prospectivo randomizado, multicêntrico, controlado, triplo-cego para avaliar a habilidade de stent; eluído com paclitaxel, implantado nessas lesões para inibir a hiperplasia da íntima e a reestenose

após angioplastia. Os autores mostraram que o paclitaxel é um agente antiproliferativo, usado para prevenir a reestenose, após implante de stent em coronárias. Foram comparados stent eluído com 1,3 µg e 3,1 µg de paclitaxel por milímetro quadrado em dois grupos e o grupo controle com o mesmo stent, sem eluição. A terapia antiplaquetária com aspirina e clopidogrel foi adicionada. O seguimento clínico foi realizado em um mês, em quatro e em seis meses e o seguimento angiográfico entre quatro e seis meses. O grupo com dose alta de paclitaxel teve redução significativamente melhor que o grupo controle, na prevenção da estenose ($P < 0,001$). A avaliação pelo ultrassom intravascular mostrou redução do volume da hiperplasia intimal, dependente da dose. Desta forma, o stent eluído com paclitaxel e terapia antiplaquetária convencional, efetivamente, inibiu a reestenose e a hiperplasia neointimal.

Também, Nunes, Alfonso e Oliveira (2004), em um estudo de revisão em seres humanos, avaliaram a fisiopatologia da reestenose após angioplastias coronárias percutâneas e concluíram que a restenose é decorrente do processo de reparação da parede vascular e envolve diferentes mediadores celulares. Observaram também que a hiperplasia da camada íntima e o remodelamento vascular são os dois principais processos fisiopatológicos, envolvidos na perda luminal tardia. Mostraram ainda que evidências sugerem existir pacientes com maior ou menor propensão ao desenvolvimento de restenose, embora os determinantes biológicos desta predisposição ainda permaneçam não totalmente esclarecidos.

De modo diferente, Brasselet et al. (2008) avaliaram a hiperplasia neointimal e reestenose em coelhos da raça Nova Zelândia, com dieta hipercolesterolêmica durante 4 semanas, associada à abrasão endotelial por balão Fogarty número 3. A angioplastia foi realizada quatro semanas mais tarde por balão convencional. Foi realizado aquecimento local, na artéria ilíaca por balão térmico aplicado aleatoriamente (50, 60, 80, e 100^o C) durante 60 segundos. A radiofrequência térmica, durante a angioplastia com balão térmico com água aquecida, foi aplicada unilateral, e a ilíaca contralateral foi dilatada sem aquecimento, servindo como controle. Os stentes metálicos foram implantados em ambas as artérias ilíacas, no mesmo local onde foi realizada a angioplastia com balão aquecido e sem aquecimento endotelial, na artéria contralateral. A seguir, foi suspenso o colesterol e, seis semanas após a angioplastia, os coelhos foram sacrificados e as artérias lesadas coletadas. A avaliação histológica mostrou proliferação celular inversamente proporcional ao

aquecimento local. Na temperatura endotelial a 50°C, houve redução da hiperplasia neointimal e menor porcentagem de reestenose, comparado com o grupo controle e não houve trombose. A trombose intra-stent, nas temperaturas entre 50 e 60°C, foi idêntica ao grupo controle, porém aumentou drasticamente com o aumento do aquecimento entre 80 e 100 °C.

Por outro lado, Tsai et al. (2008) avaliaram o efeito do cilostazol sobre a hiperplasia intimal, em coelhos da raça Nova Zelândia com desnudação endotelial arterial por balão. Foi coletado sangue e, a seguir, os animais sacrificados ao fim de 5 semanas, com coleta das artérias para coloração imuno-histoquímica. A morfometria foi usada para medição de hiperplasia da íntima e a área da superfície íntima/medial para cada espécime de secção transversal também foi determinada. Desse modo, foi observado que o cilostazol atenua efetivamente a hiperplasia neointimal, inibe a infiltração de macrófagos na parede arterial, diminui a ação da proteína quimiotática do monócito-1 (MCP-1), diminui a expressão de metaloproteinase-9 (MMP-9) em aortas de coelhos com endotélio desnudo e induzida a inflamação sistêmica pelo lipopolissacarídeos (LPS). Os autores apontaram também uma nova visão sobre os múltiplos efeitos do cilostazol e que esses efeitos anti-inflamatórios podem fornecer uma forma promissora de prevenção de aterogênese e reestenose.

Em estudo para suprimir a hiperplasia miointimal, Rosenbaum et al. (2010) avaliaram a ação dos antioxidantes nas anastomoses de enxertos protéticos em coelhos hipercolesterêmicos. O N-acetilcisteína foi comparado com probucol em um grupo de coelhos, alimentados com ração e, em outro grupo alimentados com ração e colesterol a 1%. Esse último grupo teve significativo aumento de espessamento intimal na anastomose e menor cobertura de células endoteliais na prótese. Assim, o estresse oxidativo global e a hiperplasia da íntima na anastomose estavam aumentados e a endotelização do enxerto protético foi significativamente reduzida em animais com dieta rica em colesterol. O tratamento com antioxidantes inibiu a hiperplasia da íntima e aumentou a cobertura do enxerto protético com células endoteliais.

Com o mesmo objetivo, Güzeloğlu et al. (2011) investigaram o efeito do ácido zoledrônico como inibidor da hiperplasia miointimal em coelhos da raça Nova Zelândia. Assim, comparam o efeito do uso do ácido zoledrônico (AZ) nas anastomoses das artérias carótidas internas em dois grupos de coelhos, sendo um grupo tratado e outro grupo controle. O grupo placebo recebeu solução salina,

tamponada com fosfato (SSTF), enquanto o grupo (AZ) recebeu ácido zoledrônico; 100 µg/kg/dia subcutânea, durante 28 dias. O grupo SSTF apresentou espessamento intimal significativo na anastomose ($p < 0,01$). O grupo AZ reduziu significativamente a área da íntima ($p < 0,01$). A actina pela imuno-histoquímica foi significativamente diminuída na área da anastomose no grupo AZ e as imunorreatividades das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) foram claramente vistas nas anastomoses arteriais do grupo controle (SSTF) pela imuno-histoquímica. Isto mostrou que o AZ diminuiu a imunopositividade das metaloproteinases nas anastomoses arteriais. Foi concluído que o ácido zoledrônico pode ser um agente promissor para a prevenção da hiperplasia neointimal; a qual é a causa mais importante de fracasso tardio de enxertos no pós-operatório.

De outra forma, Ito et al. (2012) avaliaram o cilostazol no controle da aterosclerose e agregação de plaquetas em coelhos, alimentados com uma dieta normal e com suplementação de colesterol a 0,5%, com e sem o cilostazol pelo período de dez semanas. O cilostazol inibiu a agregação plaquetária em coelhos hipercolesterolêmicos e mostrou poder prevenir a progressão da aterosclerose, através do seu efeito antiagregante e da melhora dos níveis lipídicos no indivíduo hipercolesterolêmico. Reduziu ainda significativamente, o colesterol total, triglicerídeos no soro e o teor de triglicerídeos na parede da aorta aterosclerótica. O cilostazol também reduziu significativamente a área da íntima aterosclerótica e a agregação de plaquetas em coelhos alimentados com uma dieta normal e rica em colesterol. Os efeitos antiateroscleróticos e antiplaquetários do cilostazol em coelhos, alimentados com colesterol, possivelmente é devido à melhoria do metabolismo dos lipídeos e da redução da ativação de plaquetas. Esses resultados sugerem que o cilostazol é útil para a prevenção e tratamento das doenças aterotrombóticas e anormalidades lipídicas.

Em um estudo empregando fármaco, Takigawa et al. (2012) avaliaram a ação do cilostazol na hiperplasia da íntima em ratos com angioplastia da carótida. Compararam a hiperplasia em ratos em dieta normal com o grupo em uso de 0,1% de cilostazol, além da dieta igual por 14 dias. Foi mostrado, nesse estudo, que o efeito protetor do cilostazol sobre a hiperplasia neointimal pode ser mediada por suas ações anti-inflamatórias sobre as células mononucleares teleguiadas às células endoteliais e tem potencial para prevenir a reestenose, após angioplastia, como também reduzir a incidência de aterosclerose.

De outra forma, a hiperplasia miointimal foi avaliada por Guzeloglu et al. (2012), quando empregaram coelhos da raça Nova Zelândia com secção e anastomose de carótidas. Os autores compararam o efeito da rosiglitazona em um grupo com outro grupo recebendo solução salina tamponada com fosfato (SSTF), no grupo controle por quatro semanas. Os coelhos foram sacrificados 28 dias após o tratamento e a área da anastomose foi removida para a coloração e avaliação histológica. A avaliação imuno-histoquímica para os anticorpos contra metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) revelou imunopositividade para a MMP-2 e MMP-9, que aumentou, significativamente, nas anastomoses do grupo placebo. A rosiglitazona, diminuiu significativamente, a imunopositividade para as duas proteínas MMP nas carótidas anastomosadas. Assim, a rosiglitazona inibiu a hiperplasia da íntima e a expressão pró-inflamatória das enzimas MMPs e pode desempenhar papel protetor contra a aterosclerose, devido à sua ação inibitória sobre a expressão das enzimas MMP-2 e MMP-9.

Em um outro estudo, Guzeloglu et al. (2013) empregaram a tadalafila para reduzir a hiperplasia neointimal em coelhos da raça Nova Zelândia, comparado com o grupo controle com solução salina tamponada com fosfato (SSTF), durante 28 dias. O tratamento foi iniciado após as carótidas serem seccionadas e anastomosadas término-terminal. A histologia revelou diferença significativa entre a íntima e íntima/média em conjunto nas carótidas dos grupos: tadalafil e SSTF ($p < 0,001$). A área da íntima e a relação íntima/média foram aumentadas de espessura nas artérias anastomosadas em comparação com as esquerdas intactas ($p < 0,001$). Quando as carótidas direitas foram avaliadas pela análise de covariância, foi observado que a área da íntima e a relação íntima/média, no local da anastomose, foram significativamente reduzidas no grupo tratado com tadalafila ($p < 0,001$). Esse estudo mostrou que a tadalafila é um novo agente indicado para aumentar a permeabilidade vascular e prevenir a hiperplasia intimal, após intervenções vasculares.

Também, Bahnson et al. (2015) avaliaram a hiperplasia miointimal pela ação do óxido nítrico na parede vascular mostraram que espécies reativas de oxigênio (ROS) aumentam, após uma lesão arterial, estimulando a proliferação e migração de células musculares lisas da camada média e migração de fibroblastos da adventícia para a camada íntima, gerando a hiperplasia intimal. Houve evidência de que o óxido nítrico inibe este processo e promove a proliferação de células endoteliais. Foram empregados ratos com lesão por balão na artéria carótida e a seguir, aplicado óxido

nítrico em pó na superfície externa da carótida lesada. Três dias após, foi realizada a eutanásia e coleta das artérias. Também, um grupo de camundongo foi lesada a artéria femoral e, 14 dias após, sofreram eutanásia com coleta das artérias. Foi realizada coloração com hematoxilina eosina e medição da hiperplasia intimal em um software ImageJ. As células musculares lisas de aorta de camundongo e fibroblastos de adventícia foram isoladas e cultivadas em cultura in vivo e in vitro. Foi mostrado que o óxido nítrico regula a proliferação de células musculares lisas vasculares, diferentemente, da regulação em meio de oxirredução. Esses achados destacam o papel do superóxido (O_2^-) como uma molécula, que sinaliza o comando do crescimento neointimal e a importante habilidade do NO, para alterar o equilíbrio redox através de aumento da proteína superóxido dismutase-1 (SOD-1) em um modelo de célula específica para inibir o desenvolvimento neointimal. No entanto, o aumento dos níveis de proteína SOD-1 não foi observado em células endoteliais ou fibroblastos adventiciais. O óxido nítrico inibiu a hiperplasia neointimal através de diversos mecanismos, entre estes, a regulação da SOD-1. Existem ainda pesquisas na tentativa de desenvolver antioxidantes, direcionados a organelas celulares como mitocôndrias. A hipótese é que células específicas se diferenciam e o NO regula os níveis de SOD-1 na parede vascular, que medeia a capacidade do NO para evitar a hiperplasia neointimal.

De outra forma, O'Brien et al. (1991) compararam coelhos Watanabe hiperlipidêmicos hereditários, machos e fêmeas tratados com probucol por 15 a 17 meses com um grupo controle, com dieta padrão por 12 a 16 meses. Os animais, tratados com probucol, tiveram menor reação imunológica, mostrando menor celularidade (macrófagos), quando comparado com o grupo controle. Foi mostrado que lesões maiores tinham maior celularidade pela imuno-histoquímica e as lesões menores tinham maior quantidade de células musculares lisas. O probucol foi eficiente na redução da aterosclerose em coelhos hiperlipidêmicos hereditários no início da vida. Não se sabe ao certo, o efeito do probucol. Contudo, é um poderoso antioxidante e é provável que exerça efeito antiaterogênico, diminuindo ou impedindo a modificação oxidativa de lipoproteínas, contribuindo para a diminuição da aterosclerose. Não foi mostrado diferença no tratamento com probucol entre coelhos machos e fêmeas.

Por outro lado, Lafont et al. (1995) realizaram um modelo de hiperplasia neointimal para avaliar a constrição crônica, o crescimento neointimal e as mudanças

adventíciais com reestenose em coelhos ateroscleróticos. As lesões nas artérias femorais foram provocadas por infusão de ar local, com as extremidades clampeadas. A seguir, foi introduzida uma dieta hipercolesterolêmica por quatro semanas e realizada a angioplastia ao final deste período. Um grupo de seis coelhos, com a mesma lesão, sem angioplastia foi acompanhado pela angiografia entre quatro e oito semanas e avaliados pela histologia para observar a constrição em resposta à cura da lesão de secagem. A área da íntima e média juntas, delimitada externamente pela lâmina elástica externa, foi utilizada para avaliar o crescimento da neointima-medial, ao invés de íntima e média em separado, porque frequentemente a lâmina elástica interna está incompleta pela reparação da ruptura dessa lâmina, após a angioplastia. Uma constrição crônica foi percebida ao nível da lâmina elástica externa, mais correlacionada com o estreitamento luminal do que pelo crescimento neointima-medial, 3 a 4 semanas após a angioplastia. Além disso, as mudanças relativas ao nível da íntima, média e adventícia no local da lesão, sugeriram um possível mecanismo para a constrição.

Em um modelo para a indução de hiperplasia da íntima, Asada et al. (1996) avaliaram o efeito da pressão de insuflação do cateter balão para a produção de lesões vasculares na aorta de coelhos. Observaram as diferentes pressões pelo balão de angioplastia: 1,5, 1,75 e 2,0 atm para desnudação do endotélio da aorta descendente com um balão 4F. Foi observada uma perda de DNA significativa nas áreas da parede da aorta, na qual foi aplicada maior pressão, 1,75 e 2,0 atm. A hiperplasia da íntima foi detectada em todas as áreas lesadas, porém com maior intensidade nos grupos com maior tempo após a lesão. Foi encontrado, ocasionalmente, fibrose e calcificação na camada média, sem relação com o tempo da lesão, mas com maior frequência no grupo de maior pressão. Houve ruptura de lâminas com maior intensidade no grupo de maior pressão na parede da aorta. Pela imuno-histologia foram encontradas células musculares lisas na íntima e, apenas alguns monócitos sem relação com o grau de agressão a parede arterial. Parece provável que a lesão por balão não poderia provocar uma hiperplasia da íntima proporcional ao aumento da pressão. Pois, a lesão grave medial é acompanhada por uma grave extensão da necrose de células musculares lisas mediais, que é a fonte de fornecimento dessas células para a hiperplasia da íntima.

De outra forma, Jaldin et al. (2006) planejaram um método de aterosclerose experimental de baixo custo, quando foi empregada a gema de ovo como fonte

aterogênica. Foram dois grupos de sete coelhos, sendo um grupo controle com dieta padrão para coelhos e o grupo com uma gema de ovo e 13,5 mL do óleo de milho, junto a 150 g de ração diária, por 90 dias. Foram dosados os níveis plasmáticos de colesterol total, HDL, triglicérides, LDL no tempo zero e, ao final de cada mês, durante o tratamento e, os valores obtidos por meio da fórmula de Friedewald. A seguir, os coelhos sofreram eutanásia com dose letal de anestésico e removidas as artérias: aorta torácica, abdominal, renais, bifurcação ilíacas da aorta, femorais, carótidas e preparadas para análise histológica. Foi encontrado aumento das concentrações de colesterol total e frações no grupo, que recebeu dieta suplementada com gema de ovo, porém não se observou diferença nos níveis de triglicérides entre os grupos. Na análise histopatológica, não foram encontradas alterações arquiteturais nas artérias de animais do grupo controle. Nos animais, que receberam gema de ovo, foram observadas alterações na camada íntima, correspondente a acúmulos de lipídeos em células espumosas ou formando vacúolos subendoteliais renais, carótidas, transição toracoabdominal, femorais e estrias gordurosas, predominantemente, na parede anterior da aorta abdominal e torácica. Em apenas um animal, foi observado o espessamento de íntima em grau moderado, na transição toracoabdominal da aorta.

De modo semelhante, Santos (2008) empregou coelhos da raça Nova Zelândia em um experimento com gema de ovo para induzir aterosclerose. O autor mostrou que 20 mL de gema de ovo contém, aproximadamente, 200 mg de colesterol. Assim, comparou os grupos com suplementação alimentar com gema de ovo, banha de porco, colesterol com o grupo controle. Foram realizadas análises bioquímicas do colesterol total, triglicérideo, HDL, LDL e VLDL. No final do tratamento dietético, foi retirado fragmento da artéria carótida comum direita, do arco aórtico e da artéria femoral direita de cada animal. A análise bioquímica do colesterol total, HDL e LDL apresentaram maior valor médio no grupo 20 mL de gema de ovo. O triglicérideo apresentou maior valor médio no grupo banha de porco. Na análise histopatológica, a maior média de espessamento endotelial e de células espumosas foram nos grupos 20 mL de gema de ovo e no grupo colesterol. Foi concluído, nesse estudo, que a administração de 20 mL de gema de ovo é ideal para modelos experimentais, que envolvam o perfil lipídico, formação de células espumosas e espessamento de endotélio.

Por outro lado, Ferrer et al. (2010) avaliaram a importância do diâmetro do balão em artérias de coelhos machos e fêmeas da raça Nova Zelândia. Esses autores

abordaram a artéria ilíaca esquerda para técnica de desnudação, através da carótida externa. A angioplastia foi realizada com balão 2,5 x 20 mm em um grupo e com balão 3,0 x 20 mm em outro grupo, ambos em coelhos hipercolesterolêmicos. No grupo, o qual foi usado o balão 2,5 x 20 mm, houve perda de três coelhos, sendo dois por sangramento na carótida e um por ruptura da artéria ilíaca esquerda angioplastada. Já o grupo do balão 3,0 x 20 mm, houve quatro perdas, sendo três por ruptura da artéria ilíaca e, uma por ruptura da carótida abordada. Os testes bioquímicos basais e após oito semanas de dieta aterogênica, mostraram aumento dos valores significativos de colesterol no sangue, enquanto os triglicérides não apresentaram diferenças significativas. Também não houve diferença entre os valores de colesterol e triglicérido entre machos e fêmeas. Os resultados mostraram que o balão menor causou menos complicação, e que os dois balões produziram lesões ateroscleróticas e hiperplasia da íntima de mesma magnitude. Portanto, os autores indicaram ser melhor o uso de balão de menor diâmetro; 2,5 mm em ilíacas de coelhos da raça Nova Zelândia.

Esta revisão mostrou um reduzido número de estudos experimentais, que estudaram o potencial da *Moringa oleifera* para a prevenção de doenças cardiovasculares. Como essas evidências parecem viáveis e não tendo sido encontrado estudos com tais abordagens sobre a inibição da hiperplasia miointimal, justifica-se a realização desta pesquisa.

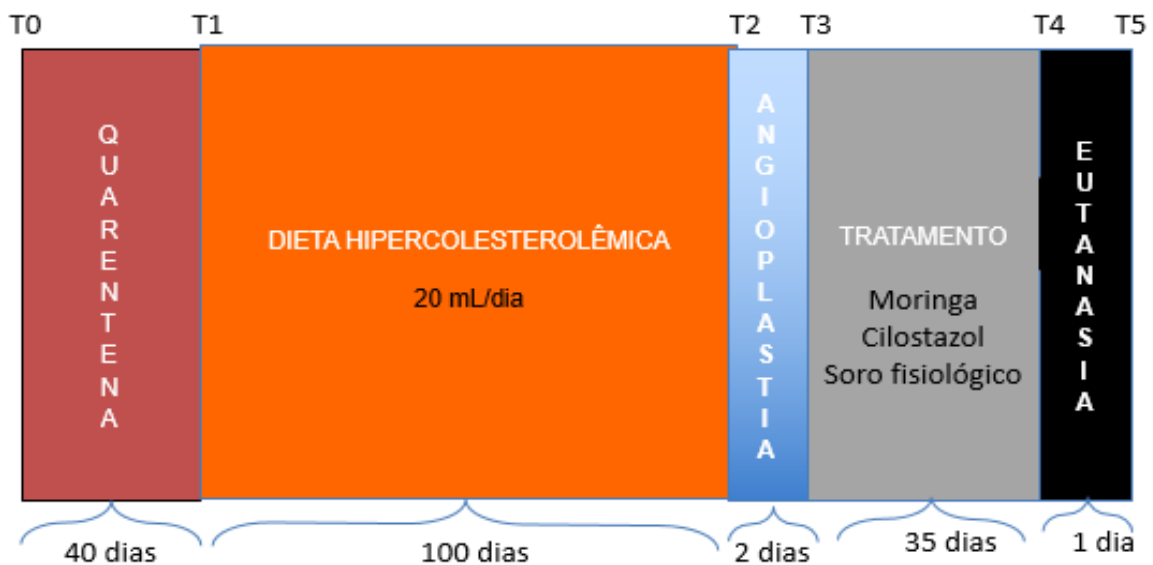
3 MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (CEPA/LTF) da Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, PB, em 19-01-2010, protocolo N° 0512/09 (Anexo B) e também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL), Maceió, AL em 31-03-2010, protocolo N° 64-A (Anexo C). Os animais receberam os cuidados de acordo com o protocolo experimental de estudo e foram seguidos os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

3.1 Tipo de estudo

Foi realizado um ensaio pré-clínico aleatório em animais de laboratório durante 35 dias. Os animais permaneceram em quarentena, para fins de adaptação, ganho de peso e alcance da idade ideal para o início do tratamento. Foram alimentados com ração comercial (Purina Inc., São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*. Após este período, os coelhos foram submetidos à instalação da aterosclerose por meio de dieta suplementada com 20 mL de gema de ovo de galinha granjeirenses, em dose única ao dia, durante 100 dias (Figura 2).

Figura 2 – Representação do delineamento experimental

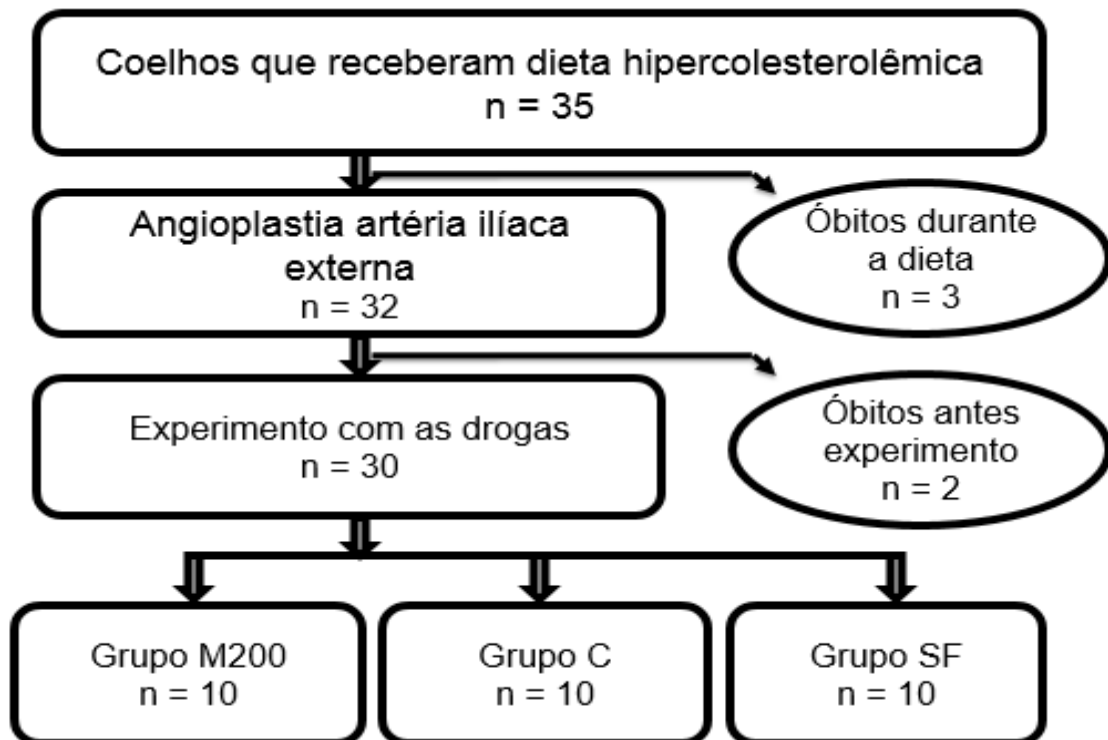


Fonte: Autor.

Notas: Onde o T0 = tempo de quarentena, T1 = período da dieta hipercolesterolêmica, T2 = corresponde ao tempo da angioplastia, T3 = duração do tratamento, T4 = dia da eutanásia dos animais, T5 = continuação da coleta dos dados.

Trinta e cinco coelhos foram selecionados pelo protocolo da pesquisa, receberam dieta hipercolesterolêmica a base de gema de ovo. Destes, foram excluídos cinco animais; sendo três, devido a óbito no período de indução da aterosclerose, por provável ingestão de gema de ovo diretamente nos pulmões e os dois últimos, após angioplastia na artéria ilíaca externa direita, um por hemorragia incontrolável e outro por ruptura da artéria ilíaca angioplastada (Figura 3). O período da pesquisa foi de janeiro a junho de 2011 e a tese foi defendida em 2015, devido ao decurso das disciplinas exigidas para o número total de créditos, conforme as normas da RENORBIO. O período de coleta e interpretação dos dados da pesquisa, o levantamento da literatura para fundamentação do estudo, também contribuíram para o tempo de conclusão desta investigação.

Figura 3 – Delineamento dos animais da pesquisa



Fonte: Autor.

3.2 Local

A pesquisa foi realizada no Biotério do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) do *Campus I* da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB.

3.3 Amostra

3.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos 30 coelhos adultos, da raça Nova Zelândia, fêmeas, idade entre quatro e seis meses, peso corporal entre dois e cinco quilos, da espécie *Oryctolagus cuniculus* com aterosclerose induzida, modificado de Santos (2008) e submetidos à angioplastia da artéria íliaca externa direita por balão de angioplastia não complacente (NOGUEIRA, 2012; ROLIM, 2012). Os coelhos foram divididos em três grupos de dez coelhos e cada grupo foi destinado ao tratamento: grupo *Moringa oleifera* (Mo), grupo Cilostazol (Cz) e o grupo Soro fisiológico (SF, controle negativos).

Preparo e administração da dieta aterogênica. Após a quarentena, os animais foram submetidos à aterosclerose, induzida pelo modelo descrito anteriormente (SANTOS, 2008; NOGUEIRA, 2012; ROLIM, 2012). Assim, foi utilizada dieta comercial 200 g ao dia, acrescentada de 20 mL de gema de ovo de galinha granjeirenses; pela manhã, por via oral, durante 100 (cem) dias, com o auxílio de uma seringa de PVC 20 mL. Os ovos foram adquiridos, semanalmente, direto do distribuidor da granja e mantidos em ambiente climatizado entre 0º e 4º para evitar deterioração em sua composição (CARVALHO, 2003). A constituição de cada 100 g de ovo cru contém 356 mg de colesterol, 8,9 g de lipídeos, 2,6 g de ácidos graxos saturado, 3,6 g de ácidos graxos monossaturados, 1,2 g de ácidos graxos poli-insaturados, conforme a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (2011). Em média, 20 mL de gema de ovo contém 200 mg de colesterol (SANTOS, 2008).

Para a indução da hiperplasia miointimal foi suspensa a dieta hipercolesterolêmica, conforme estudos prévios Lafont et al. (1995); Brasselet et al. (2008), na noite anterior e os animais foram anestesiados com Xilazina na dose de 10 mg/kg e Ketamina na dose de 40 mg/kg, por via intramuscular na coxa direita, conforme técnica descrita por Harkness e Wagner, (1993); Brasselet et al. (2008). O plano anestésico foi verificado pela ausência do reflexo doloroso durante a apreensão interdigital da orelha direita e, a seguir, foi coletado sangue para dosagem bioquímica de colesterol total, triglicérido, HDL-c, LDL-c e VLDL-c. O sangue foi coletado na veia auricular central com seringa de 5 mL e condicionado em tubetes de 6 mL. Ao final da coleta, as amostras foram encaminhadas ao laboratório bioquímico, onde foram

centrifugadas a 5.000 rpm e seguido o procedimento operacional padrão para análise do colesterol total, HDL-c e triglicerídeos pelo método de calorimetria em conformidade com os kits do Labtest e as frações do LDL-c foi calculado pela fórmula de Friedewald $\rightarrow C_{LDL} = C_{\text{plasma}} - C_{HDL} - TG/5$ (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972) e o VLDL obtido pela divisão do triglicerídeo por 5 (Anexo I).

Após a coleta de sangue, foi realizada tricotomia na região inferior do abdome e inguinal direita, seguida de limpeza adequada do local, assepsia e antissepsia com solução de PVPI a 10% de iodo ativo. Após a anestesia local com lidocaína a 2%, 5 mL na região inguinal direita, foi incisada a pele com 1 a 2 cm de extensão no sentido longitudinal e a cerca de 1 cm abaixo do ligamento inguinal, conforme (Gellman *et al.*, 1991) com bisturi lâmina 11 para exposição da artéria femoral direita. A artéria femoral exposta foi reparada com fios de algodão 3“0”, tipo polycote, e realizada arteriotomia transversal com bisturi lâmina número 11 (onze). Através da incisão, foi introduzido em conjunto: o fio guia metálico (HI/Torque, COMMANDA, 0,014” (polegadas), série 2078/72) com o cateter-balão (Armada 0,014”, PTA, Ref. A 1025/020) de 2,5 mm de diâmetro por 20 mm de comprimento; (raio balão/artéria de 1,0: 1,2) (GELLMAN *et al.*, 1991; LAFONT *et al.*, 1995; FERRER *et al.*, 2010).

Assim, o conjunto foi inserido no lúmen da artéria femoral direita (AFD), em sentido cranial e sua posição na artéria ilíaca externa direita definida pela visualização da extremidade proximal do balão justa ligamento inguinal dissecado. O balão foi insuflado intra-arterial na ilíaca ipsilateral a pressão 6 atm (atmosfera) pelo tempo de 60 segundos, com insuflador (CID/20/30, Coke Medical), levando à distensão da parede arterial (BRASSELET *et al.*, 2008). Após desinsuflação do balão e retirada do mesmo, foi feita hemostasia por ligadura da artéria femoral superficial com fio de algodão 3“0”, conforme estudos prévios (BAUMGARTNER, 1973; PLATE *et al.*, 1989; HEHRLEIN *et al.*, 1996; CORTELEKOGLU *et al.*, 2006; BRASSELET *et al.*, 2008). Por fim, a incisão da parede foi suturada por técnica convencional com fio de nylon 4-0 (Ethicon Inc., Somerville, N).

Administrou-se analgésicos (ibuprofeno 10 mg/Kg por via oral, por dois dias, diluído na água de consumo) e profilaxia antibiótica, modificado de (GELLMAN *et al.*, 1991) com (Ceftriaxona 20 mg/kg/dia em dose única, IM) para todos os grupos de coelhos, no pós-operatório para evitar infecção e sofrimento dos animais.

Vinte quatro horas após a realização da lesão endotelial (desnudação pelo balão) foi iniciada a administração das drogas e mantida a alimentação com ração

comercial, purina para coelhos. Assim, o grupo Mo (moringa, denominado Mo) recebeu 200 mg/kg de solução de extrato etanólico das folhas de *Moringa oleifera* ao dia, o grupo soro fisiológico (SF; controle negativo) recebeu soro fisiológico 0,9%, 10 mL ao dia, e o grupo Cilostazol (Cz) ; lote: 20100201, data de fabricação: 02/2010 e data de validade 02/2013, origem China, fabricante ZHENJIANG HAISEN, Lote interno 1086) recebeu 50 mg/dia, conforme Tsai et al. (2008). Todos os grupos receberam as substâncias por via oral, durante 35 dias.

3.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos os coelhos machos; os com idade inferior a quatro meses e superior a seis meses, peso corporal menor que 2 kg e superior 5 kg, os óbitos antes do tratamento com as drogas e ainda os que apresentaram anomalia da anatomia das estruturas a serem abordadas e aqueles com doenças prévias.

3.3.3 Amostragem

Foram estudados os coelhos selecionados, que formaram uma amostra não probabilística por conveniência.

3.4 Procedimentos

3.4.1 Grupos estudados

✓ Grupo SF (Soro Fisiológico)

Neste estudo, os coelhos do grupo SF foram tratados com solução fisiológica, 10 mL ao dia, por via oral durante 35 dias. É o grupo controle negativo.

✓ Protocolo experimental

Os animais permaneceram em ambiente fechado e a experimentação foi realizada no biotério do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em ambiente adequado para os coelhos. O ambiente continha sistema de ventilação e exaustão forçada, períodos de luminescência natural em ciclos de claro/escuro de 12h, temperatura média de 20°C, ruído mínimo e umidade em torno de 50%. Os animais foram mantidos em gaiolas

apropriadas com área de 0,64 metros quadrados (m²) e não tiveram contato com suas secreções naturais, devido à adaptação das gaiolas para a manutenção da higiene. As gaiolas foram numeradas e a orelha do coelho tatuada com a respectiva numeração da gaiola, minimizando assim, a possibilidade de extravio. A dieta foi constituída de água e ração comercial (Purina® para coelhos) *ad libitum*, 200 g ao dia, conforme Santos (2008), antes e durante o experimento. A composição da Purina® para coelhos era constituída de proteína bruta 15%, extrato etéreo 2,5%, matéria fibrosa 16%, mineral 10%, cálcio 2,5%, fósforo 0,42%, umidade 13% e carboidrato 31,58% (descrito na embalagem do produto). Os coelhos foram pesados, semanalmente, com uma balança digital de precisão Marte®, modelo AS 5000 C, com carga mínima 5 g e máxima de 5 kg.

✓ **Eutanásia dos animais**

A eutanásia dos animais ocorreu um dia após o término do tratamento com as substâncias. Os animais foram anestesiados com Xilazina na dose de 10 mg/kg e Ketamina na dose de 40 mg/kg, por via intramuscular, na coxa direita, conforme Harkness e Wagner (1993) e coletada amostra de sangue para dosagem do colesterol total, triglicerídeo, HDL, LDL e VLDL após o tratamento. A seguir, os animais sofreram eutanásia sob dose letal de anestésico (overdose com pentobarbital 60 mg/kg, intravenoso), conforme Asada et al. (1996) e coleta das artérias para preparo de lâminas para as devidas colorações: Hematoxilina, Eosina, Tricromo de Masson, Verhoeff e Imuno-histoquímica: C4d e HHF35 monoclonal.

✓ **Grupo Cz (Cilostazol)**

Os coelhos, neste grupo, foram tratados com 50 mg de Cilostazol (TSAI et al., 2008) ao dia, por via oral, durante 35 dias e foram submetidos aos procedimentos do protocolo experimental semelhante ao grupo SF.

✓ **Grupo Mo (Moringa)**

Neste grupo, os coelhos foram tratados com extrato etanólico das folhas de *Moringa oleifera* (GHASi, NWOBODO; OFILI, 1999; CHUMARK et al., 2008), administrada na dose de 200 mg/kg ao dia (MEHTA et al., 2003), por via oral, durante

35 dias. Este grupo de animais foi submetido aos mesmos procedimentos experimentais do grupo SF.

✓ **O extrato etanólico das folhas da *Moringa Oleifera***

O extrato etanólico das folhas da *Moringa oleifera*, nesta pesquisa, foi preparado de acordo com o método descrito por Bakre, Aderibigbe e Ademowo (2013) com algumas modificações. Dez quilos de folhas frescas da moringa foram colhidos direto no herbário da fazenda Santa Helena em Juazeiro, BA. As folhas foram resfriadas para evitar deterioração e transportadas até o Laboratório de Bioquímica (LB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), onde foi obtido o extrato bruto das folhas da *Moringa oleifera* em etanol a 70%. Para a primeira extração, adicionou-se dez (10) kg de folhas frescas da *Moringa oleifera* com 13,6 L de etanol a 70% em aparelho percolador constituído de aço inox (Metalúrgica Tech Vision, Guarulhos, SP) por 72 h, à temperatura ambiente. A seguir, o conteúdo foi coado em filtro constituído de algodão e papel com poros 16, o que resultou em 1.221,3 g de extrato bruto. A segunda extração juntou-se a este conteúdo 7,2 L de etanol a 70% e realizado o mesmo procedimento, quando a extração resultou em 732,2 g. A terceira extração foi juntado os 732,2 g a dez litros de etanol a 70% e resultou em 702 g, seguindo o mesmo protocolo, com rendimento final de 7,02%. Sendo todas as extrações realizadas à temperatura ambiente. A seguir, o concentrado de extrato etanólico foi passado em evaporador rotatório de marca BUCHI (R II 230 V 50/60 Hz) a vácuo e à temperatura de 50°C, conforme técnica realizada no laboratório de bioquímica da Universidade Federal da Paraíba, (UFPB) para retirada de água e álcool. Para a administração aos coelhos, o extrato das folhas da *Moringa oleifera* foi diluído com Tween 80 a 6,7% em solução salina na concentração de 200 miligramas (mg) por mililitro (mL), quando para cada quilo de peso animal foi feito um mL desta solução.

✓ **Técnica de randomização**

Foi empregada a técnica de randomização simples com auxílio do programa gratuito *randomizer*. O sorteio dos animais para cada grupo foi feito por aleatorização simples, com o auxílio do programa gratuito Research randomizer no site <http://www.randomizer.org/form.htm>, em três grupos com 10 números cada. Cada grupo correspondeu à substância utilizada e os números gerados para cada animal.

Os animais receberam uma letra e um número correspondendo ao grupo de administração e para identificação dos mesmos, o SF para soro fisiológico, Mo para a *Moringa oleifera* e Cz para o cilostazol.

O sorteio dos animais para cada grupo foi feito, aleatoriamente, (VIEIRA, 1984) com fichas numeradas de Mo1 a Mo10 (para o grupo Moringa), de Cz1 a Cz10 (para o grupo da Cilostazol) e SF1 a SF10 (para o grupo soro fisiológico). Estas fichas foram misturadas e retiradas ao acaso com o auxílio do randomizer. Este estudo foi formado de 3 (três) grupos de 10 coelhos.

✓ **Técnica de mascaramento**

O mascaramento foi realizado para o indivíduo, que mensurou as variáveis bioquímicas e histológicas.

Os animais receberam uma letra e um número correspondente ao grupo de administração e para identificação do animal Mo1 – correspondeu ao animal 1(um) do grupo Moringa; Cz1 – correspondeu ao animal 1(um) do grupo cilostazol) e SF1 – correspondeu ao animal 1(um) do grupo soro fisiológico (controle negativo). Esta marcação foi feita, por meio de escrita em tinta azul indelével na face interna da base da orelha direita, com caneta tipo piloto permanente (*permanent Mark®*).

O mascaramento para a microscopia foi realizado pela troca da letra e número da marcação inicial por outra letra e números conhecidos, somente, por aquele que realizou a marcação das orelhas (pesquisador principal), sendo a nova identificação guardada em envelope opaco selado, que só foi aberto no momento da análise dos dados. O patologista não soube qual método foi utilizado no vaso alvo.

3.5 Variáveis

3.5.1 Variável primária

✓ **A diferença de média de hiperplasia miointimal**

A hiperplasia miointimal é a proliferação e migração de células musculares lisas da camada média arterial, além de células da medula óssea, que migram para a camada íntima, diminuindo, dessa forma, o lúmen vascular (LIU; ROUBIN; KING, 1989).

Para a eficácia do tratamento, a hiperplasia miointimal foi avaliada pela morfometria e os valores dados em área e, em seguida, realizada a média de cada grupo. A diferença dessas médias de áreas foi utilizada para afirmar qual tratamento foi mais eficaz. Quanto maior a diferença de média, maior a redução da hiperplasia e, portanto, mais eficaz o tratamento empregado.

3.5.2 Variáveis secundárias

✓ **A média de espessura de parede miointimal no grupo soro fisiológica (SF)**

A média de espessura miointimal está diretamente relacionada à área de hiperplasia miointimal. Quanto maior for a espessura, maior a hiperplasia miointimal.

As médias foram mensuradas por microscopia óptica e morfometria digital (Mediacybernetics, Image Pro-Plus 7.0, Bethesda, MD, USA), cinco semanas após a angioplastia.

✓ **Colorações**

Coloração é a técnica histológica que consiste na marcação de material biológico com um corante ou outro reagente, com o propósito de identificar e quantificar componentes de tecidos ou seus extratos (BIREME, 2011). Os cortes de tecidos devem ser realizados de acordo com as técnicas padrão para distinguir e facilitar as diferentes estruturas celulares, que têm o mesmo grau de refração e, assim, torná-las distinguíveis, quando observadas pela microscopia óptica (LARSON et al., 2011).

A microscopia é feita por meio da amplificação de imagens (transmitidas por luz ou feixes de elétrons) com lentes ópticas ou magnéticas, que ampliam todo o campo da imagem (BIREME, 2011). As lâminas foram preparadas nas objetivas de 2,5X, 10X e 40X. As amostras foram examinadas em microscópio de luz (Olympus BH2, Tóquio, Japão). Os blocos arteriais foram cortados com micrótomos, em fragmentos de 0,5 cm e seccionados com espessura de 3 μ m e estão descritas nas secções correspondentes a cada procedimento.

✓ **As colorações: Hematoxilina/Eosina – HE**

Estas colorações foram realizadas neste estudo, de acordo com as técnicas padrão original (WISSOWZKY, 1876), observando os cuidados técnicos (LARSON et al., 2011) e mantido o preparo rotineiro de lâminas histológicas para avaliar alterações estruturais da parede arterial pela microscopia óptica.

✓ **Coloração Tricromo de “Masson”**

Nesse método de coloração, o núcleo se torna azul escuro ou preto, o citoplasma ou a queratina e as fibras intercelulares se coram em vermelho e o colágeno e músculo em azul, com melhor visualização das estruturas celulares não identificadas pelo HE. Neste estudo, esta coloração foi realizada de acordo com os padrões originais, desenvolvidos por Masson (1929) e mantido preparo de rotina de lâminas histológicas para microscopia óptica.

✓ **Coloração de Verhoeff**

Esta coloração cora colágeno em vermelho, elastina em preto e sangue em amarelo. É útil para demonstrar a atrofia do tecido elástico em casos de adelgaçamento e perda de fibras elásticas na arteriosclerose e em outras doenças vasculares. Da mesma forma, esta coloração foi realizada de forma rotineira, conforme método original (VERHOEFF, 1908).

✓ **Análise histológica e morfométrica**

Após a eutanásia dos animais, foram coletadas as artérias ilíacas direitas, com o segmento lesado pelo balão expandido, entre as excisões. As artérias foram abertas longitudinalmente, ao longo da parede posterior, preparadas em blocos e fixadas em formalina a 10% por 24-48 horas. Em seguida, levadas para o preparo rotineiro de lâminas histológicas para microscopia óptica: desidratação gradativa e crescente pelo álcool a 70% até o álcool absoluto – diafanização em xilol e embebição em parafina líquida a 60°C com preparação dos blocos de parafina.

Esses blocos foram cortados no micrótomo, transversalmente, em fragmentos de 0,5 cm e seccionados com espessura de 3 µm. A desparafinização das lâminas foi feita com três banhos de xilol, por dez minutos cada, seguidos de três banhos de etanol absoluto, dois banhos de etanol 95% e um banho de etanol 75%. As lâminas com os cortes histológicos foram, então, lavadas em água corrente. Para a coloração

hematoxilina-eosina, as lâminas foram coradas por dois minutos em hematoxilina, lavadas e coradas com eosina por mais dois minutos.

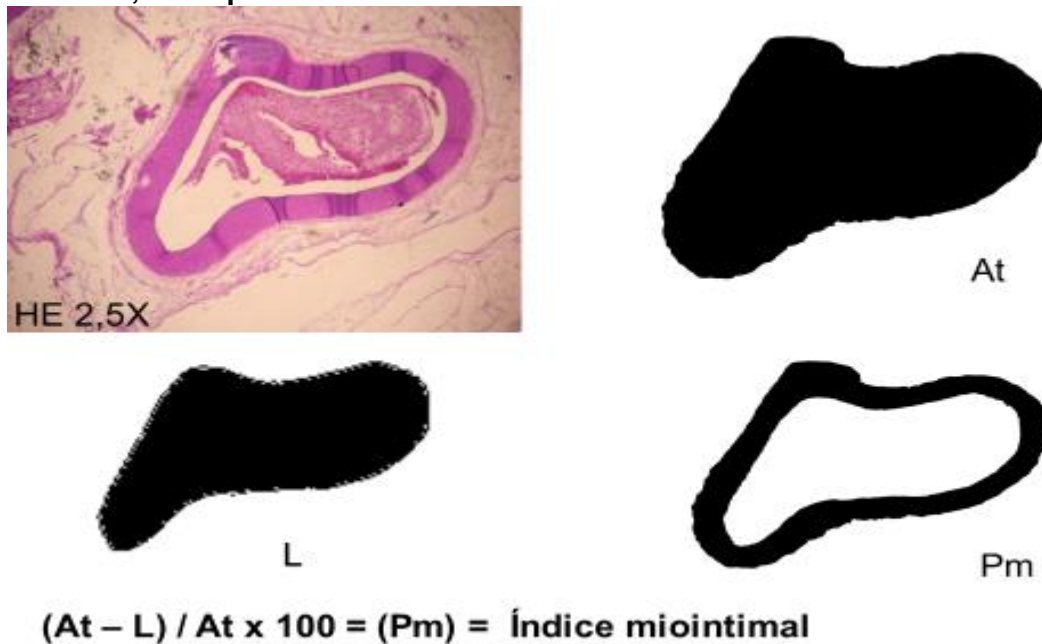
A análise morfométrica foi realizada em imagens de três campos de cada corte histológico das artérias ilíacas dos animais dos grupos: Soro fisiológico (SF), Moringa (Mo) e Cilostazol (Cz) e coradas com hematoxilina/eosina (H/E).

As lâminas foram montadas, preparadas e examinadas por patologista devidamente credenciado nas objetivas de 2,5X 10X, 40X. As amostras foram examinadas em microscópio de luz (Olympus BH2, Tóquio, Japão) e as imagens foram transferidas para o computador, utilizando um conversor digital com câmera de vídeo (Olympus DP71, Tóquio, Japão).

O microscópio foi ligado a um sistema de captura de imagem, utilizado em todas as lâminas dos grupos para as medições. Foram selecionados, aleatoriamente, três campos de cada lâmina, proveniente dos animais de cada grupo e analisadas, usando o software (ImageJ Tool, UTHSCSA—versão 3.0 para Windows, sistema de análise).

As imagens foram processadas e as medidas foram realizadas em secções transversais. Assim, a parede miointimal foi isolada, externamente, pela lâmina limitante elástica externa e, internamente, pela luz do vaso, usando-se a imagem do sistema analisador (ImageJ), assistida por computador para cálculo da razão entre a lesão e a área total. Desta forma, baseado em estudos prévios (CORTELEKOGU et al., 2006; PAPADOPULOS et al., 2007) modificado, foi calculado o índice miointimal; fazendo-se a diferença entre a área total (At) e a área da luz (L), dividida pela área total (Figura 4).

Figura 4 – Representação do cálculo do índice miointimal: At = área total; L = luz do vaso; Pm = parede miointimal



Fonte: Autor.

✓ **A média de espessura de parede miointimal no grupo moringa (Mo)**

As técnicas de colorações e análise morfométrica empregadas para a determinação da média de espessura miointimal, neste grupo, foram semelhantes ao grupo soro fisiológico.

✓ **A média de espessura de parede miointimal no grupo cilostazol (Cz)**

Da mesma forma, a média de espessura miointimal, neste grupo, foi determinada com a mesma técnica do grupo soro fisiológico.

3.5.2.1 Colorações imuno-histoquímica

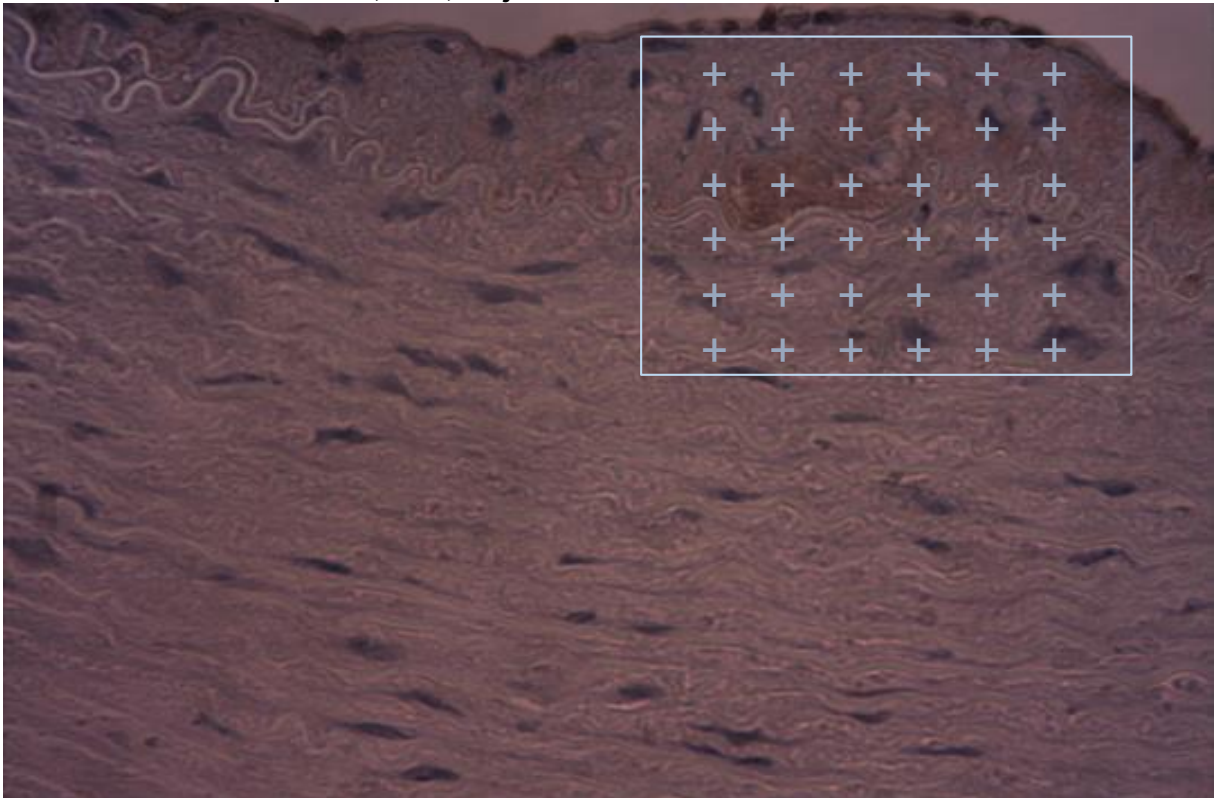
3.5.2.2 Áreas positivas para o marcador C4d

O C4d é um produto da degradação do componente C4 da via clássica do complemento e como um biomarcador, C4d permite visualizar a ligação direta entre anticorpos e a lesão dos tecidos em locais de ligação do anticorpo ao local da lesão. É um marcador com potencial para identificar os pacientes, que podem se beneficiar do uso de um fármaco testado (COHEN et al., 2012).

✓ **Detecção do marcador C4d**

Realizada conforme técnica empregada por Faleiros (2009), as lâminas foram desparafinadas em concentrações decrescentes de xilol e de álcool (absoluto, 90%, 80% e 70%) até água destilada. A seguir, foram incubadas em câmara úmida e escura com peróxido de hidrogênio a 3% para bloqueio da peroxidase endógena. As lâminas foram lavadas com PBS (*Phosphate Buffer Solution*) e colocadas em uma cuba, contendo solução de recuperação antigênica (*Target Retrieval Solution* DAKO). A cuba foi colocada em uma panela ao vapor a 100° C por 40 minutos. Depois, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas em câmara úmida e escura com uma gota de bloqueador de proteínas (*Protein Block Serum-free* DAKO) por 30 minutos. Posteriormente, foi retirado o excesso de bloqueador e as lâminas foram incubadas em câmara úmida e escura com anticorpo primário anti-C4d (1:600, ALPCO) a 4° C. As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas na mesma câmara com o link (*Kit Advance HPR Detection System* DAKO) por 30 minutos à temperatura ambiente, depois foram lavadas em PBS e incubadas com a enzima (*Kit Advance HPR Detection System* DAKO) por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas com PBS e incubadas com o cromógeno diamino benzidina por 5 minutos. Posteriormente, foram lavadas com PBS e colocadas em água destilada por 10 minutos. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris por 30 segundos e lavadas em água corrente por 5 minutos. Depois, as lâminas foram desidratadas em uma sequência de álcoois (70%, 80%, 90%, 95%), diafanizadas em xilol e montadas com uma gota de entelan e lamínula. As lâminas foram visualizadas em microscópio de luz comum e analisadas empregando-se a técnica do teste de 36 pontos (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). A área dos imunomarcadores foi calculada pela estereoscopia, por um sistema de teste composto por teste de pontos e linhas-teste sobre um quadro, conhecido como área-teste, que estima a densidade de volume. A densidade de volume foi estimada por contagem de pontos, que tocam os imunomarcadores (coloração acastanhada) em uma área teste equivalente a 200,0 μm^2 , conforme Figura 5.

Figura 5 – Técnica para determinação da esteroscopia pela coloração imuno-histoquímica, C4d, Obj 40x.



Fonte: Acervo pessoal do autor.

✓ **Determinação da área marcada da imuno-histoquímica pela esteroscopia**

A estereologia usa um sistema de teste, geralmente, composto por teste de pontos, linhas-teste sobre um quadro conhecido como área-teste e estima densidades por volume:

Para a histeroscopia das colorações imuno-histoquímicas HHF35 monoclonal e C4d, foram utilizados o teste dos 36 pontos (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003), em que a área dos imunomarcadores foi calculada pela fórmula:

$$A = Vv/2Qa \mu\text{m}^2$$

Onde:

Vv é a densidade de volume do imunomarcador estimada por contagem de pontos pelo teste dos 36 pontos, dividida pela densidade numérica por área de núcleos.

$$Vv = Pp/Pt$$

Pp = número total de pontos que tocam os imunomarcadores

Pt = número total de pontos da área teste (200,0 μm^2) que, no caso deste estudo, foi 36 pontos

Qa = densidade numérica por área de núcleos (estimada pela fórmula):

$$Qa = N/At$$

Onde:

N = número de núcleos contados dentro da área teste

At = a área teste utilizada, equivalente a 200,0 μm^2

a = área marcada da imuno-histoquímica

3.5.2.3 Áreas positivas para o marcador HHF35 monoclonal

O HHF35 é um anticorpo específico para células musculares (antiactina que reconhece isótipos de actina (alfa e gama), comuns a todas as células musculares, incluindo células do músculo liso) (GOWN; TSUKADA; ROSS, 1986; TSUCADA et al., 1991). Imuno-histoquímica de tecido, fixado em formalina, geralmente, geram sinais de coloração mais fracos (NICKELEIT; MIHATSCH, 2003).

✓ **Detecção do marcador HHF35 Monoclonal**

Utilizou-se, para o estudo imuno-histoquímico, técnica em conformidade com Santis-Isolan (2009). Os anticorpos foram diluídos com diluente de anticorpos Dakocytomation®, que consiste em um tampão Tris-HCL 0.05 M, contendo 0,1% de Tween, proteína transportadora, para reduzir a coloração de fundo e Azida Sódica 15 mM. Empregou-se, como anticorpo secundário, o EnVision®+Dual Link/Peroxidase, marca Dakocytomation®. Este reagente contém imunoglobulinas de cabra antiovelho e anticamundongo, conjugadas a um polímero, marcado com peroxidase, em tampão Tris-HCL, contendo proteína carreadora e um agente antimicrobiano. Utilizou-se como cromógeno, para revelar as reações, o 3,3'-diaminobenzidina (DAB); Sistema

Substrato-Cromógeno marca Dakocytomation®. Na oxidação, o DAB forma um produto final marrom no sítio do antígeno. Na preparação do reagente, foi adicionado 1 ml de substrato tamponado para cada gota de DAB cromógeno. Foi utilizado o Anticorpo monoclonal Muscle Specific Actin (HHF35) (DakoCytomation®). A positividade da coloração imuno-histoquímica foi identificada nas áreas de pigmentação acastanhada. As matrizes de tecidos corados pelos anticorpos foram analisadas pelo microscópio óptico da marca Zeiss® em aumento de 40 vezes em três campos distintos. As imagens digitalizadas foram capturadas e analisadas pelo programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, Califórnia, EUA), para Windows, por meio da ferramenta “Measures”, calibrada, previamente, para objetiva 40X. Após o reconhecimento pelo programa das áreas marcadas pelos anticorpos; a contagem de áreas identificadas pelo marcador HHF35 monoclonal, de coloração acastanhada foi empregada a esteroscopia, visualizada em microscópio de luz comum e analisada, empregando-se a técnica do teste de 36 pontos (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003), que é um sistema composto por teste de pontos e linhas-teste sobre um quadro conhecido como área-teste, que estima a densidade de volume de área. A densidade de volume foi estimada por contagem de pontos, que tocam os imunomarcadores (coloração acastanhada) em uma área teste equivalente a 200,0 μm^2 , conforme Figura 4.

✓ **A média de colesterol total**

O colesterol é o principal esteroide de todos os animais superiores, distribuído nos tecidos do corpo, especialmente, no cérebro e na medula espinhal, e nas gorduras e óleos animais (BIREME, 2011). É um esteroide (uma combinação de esteroide e álcool), um lipídio, encontrado nas membranas celulares de todos os tecidos do corpo humano, que é transportado no plasma sanguíneo de todos os animais (GHASI; NWOBODO; OFILI, 1999).

✓ **A média de HDL-C**

É a classe de lipoproteínas compostas de partículas de pequeno tamanho e peso denso. É sintetizada no fígado sem um centro lipídico e acumula ésteres de colesterol periférico e os transporta para o fígado para ser reutilizado ou eliminado do corpo (o transporte inverso do colesterol). Faz uma ponte de ida e volta entre as

apolipoproteína C e apolipoproteína E para formar lipoproteínas ricas em triglicerídeos durante seu catabolismo. O nível plasmático de HDL tem sido inversamente correlacionado com o risco de doenças cardiovasculares (BIREME, 2014).

✓ **A média de LDL-C**

São lipoproteínas compostas de partículas de pequeno tamanho com um centro constituído, principalmente, de ésteres de colesterol e pequenas quantidades de triglicerídeos. A monocamada superficial consiste, na sua maioria, de fosfolipídios, uma única cópia de apolipoproteína b-100, e de colesterol livre. O LDL é formado quando um colesterol se liga a uma lipoproteína de baixa densidade para ser transportado pela corrente sanguínea. Sua sigla LDL vem do inglês *Low Density Lipoproteins*, traduzida para português como Lipoproteínas de Baixa Densidade. O colesterol ligado à LDL é o que se deposita nas paredes das artérias, quando em excesso. Por isso denominado “mau colesterol”, quando em excesso. A função principal do LDL é o transporte de colesterol e ésteres de colesterol aos tecidos extra-hepáticos (BIREME, 2011).

✓ **A média de VLDL-C**

É o colesterol que está contido ou ligado a uma lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). Altos níveis circulantes de colesterol-VLDL são encontrados na Hiperlipoproteinemia Tipo IIB. O colesterol no VLDL é finalmente liberado pelas lipoproteínas de baixa densidade para os tecidos, após o catabolismo do VLDL em lipoproteínas de densidade intermediária, e, em seguida, em LDL (BIREME, 2014).

✓ **A média de triglicerídeo**

É o nome genérico de qualquer tri-éster, oriundo da combinação do glicerol (um tri-álcool) com ácidos, especialmente, ácidos graxos (ácidos carboxílicos de longa cadeia alquílica), no qual as três hidroxilas (do glicerol) sofreram condensação carboxílica com os ácidos, os quais não precisam ser, necessariamente, iguais. Triacilgliceróis são prontamente reconhecidos como óleos ou gorduras, produzidos e armazenados nos organismos vivos para fins de reserva alimentar (LEHNINGER; NENSON, 2002).

3.5.3 Dados complementares

✓ **Peso corporal dos animais**

É a massa ou quantidade de peso de um indivíduo, expresso em unidades de quilogramas ou libras (BIREME, 2011). Os animais foram pesados semanalmente, iniciado momentos antes da administração das drogas e a última pesagem foi realizada no dia anterior à eutanásia dos coelhos, conforme (NOGUEIRA, 2012; ROLIM, 2012).

✓ **A Frequência de isquemia de membro**

Isquemia é a hipoperfusão do sangue através de um órgão (ou tecido), causado por constrição patológica, obstrução de seus vasos sanguíneos ou ainda ausência de circulação sanguínea (BIREME, 2011).

✓ **A Frequência de perda de membro**

É a remoção de um membro por amputação (BIREME, 2014).

✓ **A Frequência de morte**

Morte é a cessação irreversível de todas as funções corpóreas, manifestada por ausência de respiração espontânea e perda total das funções cardiovascular e cerebral (BIREME, 2011).

✓ **A Frequência de infecção**

Infecção resulta da invasão e multiplicação de micro-organismos no organismo hospedeiro, que podem causar doenças ou condições patológicas (BIREME, 2011).

3.6 Método estatístico

3.6.1 Cálculo do tamanho da amostra

Neste estudo, o tamanho da amostra foi arbitrado em 10 coelhos por grupo, em três grupos, conforme dados da literatura (CORTELEKOGU et al., 2006), totalizando 30 (trinta) coelhos. Foi fundamentado em trabalhos, que comprovaram resultados

estatísticos aceitáveis, com número menor de animais, em modelos experimentais (CORTELEKOGLU et al., 2006; BRASSELET et al., 2008; Santos, 2008), respeitando as normas da COBEA.

Foi utilizada uma calculadora eletrônica disponível na Internet no URL: http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/di_2_pro.html, na qual os dados foram inseridos para o cálculo do tamanho da amostra. E, para os cálculos estatísticos, o programa estatístico GraphPad InStat® Versão 3.06 de 32 bit para Windows (criado em 5 de setembro de 2003).

3.6.2 Análise estatística

Os dados foram coletados em um formulário padronizado (Anexo H) e tabulados e armazenados em uma planilha eletrônica de dados (Microsoft Excel® 2003. Redmond, WA, EUA). As entradas de dados foram realizadas de forma cegas e independentes.

A análise estatística foi realizada com os testes paramétricos de Análise de Variância (ANOVA) one-way (uma classificação) e ANOVA two way (duas classificações) com pós-teste de “Tukey” e calculado o intervalo de confiança (IC) de 95% para as estimativas das diferenças entre médias e para análise do perfil lipídico dos animais, antes e depois do tratamento. O teste t paramétrico, para comparação de dados emparelhados, foi realizado para a análise do perfil lipídico, antes e depois do tratamento dos coelhos. O teste de associação de Qui-quadrado foi aplicado aos eventos (Colangite, células espumosas, esteatose hepática, Infiltrado portal, isquemia, Infecção e perda de membros). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valor de $p \leq 0,05$.

A análise descritiva foi realizada, calculando-se as medidas de posição e de variabilidade, média e desvio padrão amostral e o intervalo de confiança de 95% Gardner e Altman (1989) para a média estimada. Os cálculos foram realizados com o auxílio do aplicativo estatístico GraphPad InStat® (Versão atual, GraphPad Software Inc., San Diego, CA) 3.06 de 32 bit para Windows (criado em 5 de setembro de 2003). As discordâncias foram resolvidas por consenso.

3.6.2.1 Hipóteses estatísticas

$H_0: P_{M_0} = P_{Cz} = P_{SF}$ (A diferença de média de hiperplasia miointimal é a mesma para os grupos do extrato etanólico das folhas da moringa, do cilostazol e do soro fisiológico).

$H_1: P_{M_0} \neq P_{Cz} \neq P_{SF}$ (A diferença de média de hiperplasia miointimal é diferente para os grupos da moringa, do cilostazol e do soro fisiológico).

3.6.2.2 Testes estatísticos

Foram utilizados análise de variância ANOVA paramétrico One-way (uma classificação) ou ANOVA two-way (duas classificações) e no caso de resultado estatisticamente significativo, ou seja, valor de $p \leq 0,05$, utilizou-se o pós-teste de comparações múltiplas de “Tukey”. Foram também empregados os testes Qui-Quadrado (X^2) e t student para dados emparelhados.

A Hiperplasia miointimal foi analisada pela ANOVA paramétrica (one-way) na comparação das médias entre os grupos. As premissas para sua utilização foram satisfeitas: a) Normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($p > 0,05$) e b) Teste de Levene para igualdade de variâncias ($p > 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Desvios da pesquisa

Dos 35 coelhos que receberam dieta hipercolesterolêmica, cinco animais foram excluídos na fase de instalação da aterosclerose e após a indução da hiperplasia miointimal pela angioplastia na artéria ilíaca externa direita, antes do início do emprego das drogas (Cz, Mo e SF). Assim; três coelhos foram a óbito devido a provável ingestão de gema de ovo diretamente nos pulmões. Os dois últimos; um por hemorragia incontrolável e outro por ruptura da artéria ilíaca direita angioplastada (Figura 3).

4.2 Características da amostra

Durante o tratamento com o cilostazol, o extrato etanólico e a solução salina, não houve morte dos animais. O peso apresentou redução durante o tratamento, porém, significativa apenas, no grupo soro fisiológico ($p=0,024$), conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Média, Desvio Padrão e IC95% dos pesos inicial e final segundo os grupos (SF, Mo e Cz)

Grupos	Peso inicial (g)		Peso final (g)		Teste t ⁽⁺⁾
	M ± DP	IC95%	M ± DP	IC95%	Sig. P
SF	3.198,0 ± 652,8	2.731,0 a 3.665,0	2.155,1 ± 609,5	2.519,1 a 3.391,1	$p=0,024^*$
Mo.	3.392,6 ± 326,9	3.158,7 a 3.626,5	3.276,1 ± 367,0	3.013,6 a 3.538,6	$p=0,277$
Cz	3.180,0 ± 491,7	2.828,3 a 3.531,7	3.050,4 ± 513,7	2.682,9 a 3.417,9	$p=0,221$

Fonte: Autor.

Notas: SF; Soro Fisiológico, Mo; *Moringa oleifera*, Cz; Cilostazol, M; média e DP; Desvio Padrão e IC.

(+) Teste t (dados emparelhados); Resultado significativo, (*) $p \leq 0,05$

4.3 Variáveis

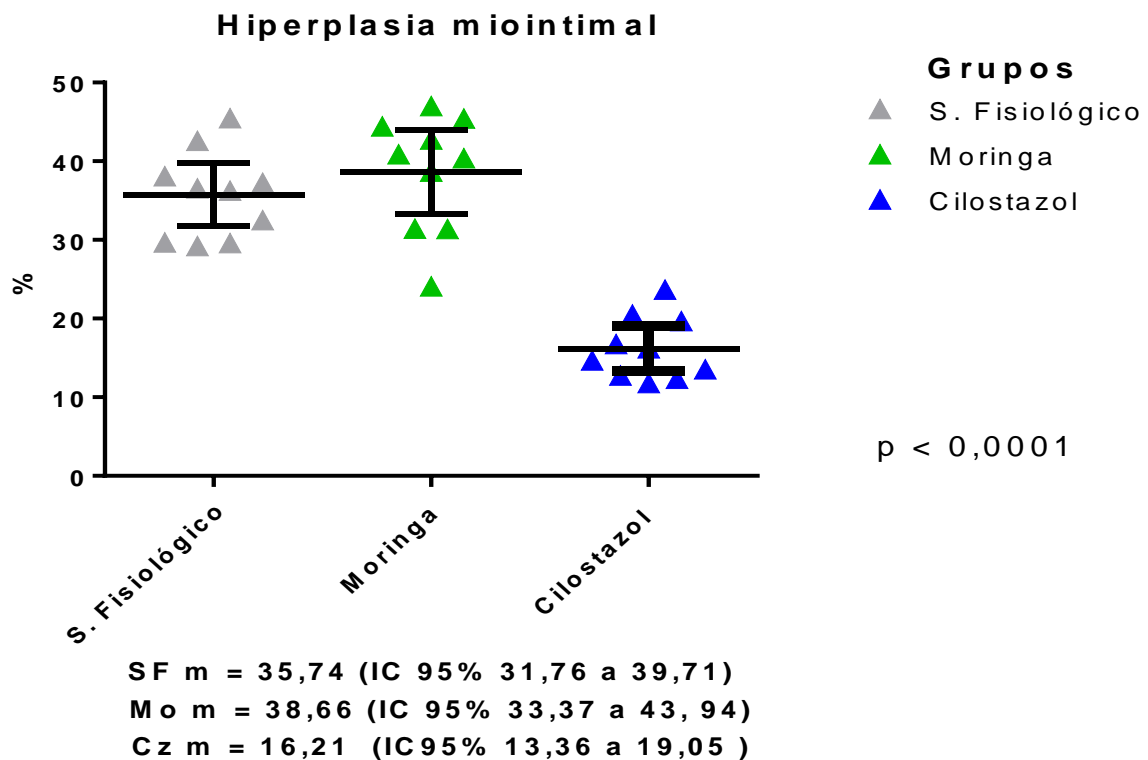
4.3.1 Variável primária

✓ Diferença de média de hiperplasia miointimal

A diferença de média de hiperplasia miointimal, avaliada por análise de variância; ANOVA (*one way*) para comparação das médias entre os três grupos: (SF, Mo e Cz), resultou em diferença estatisticamente significativa ($p<0,0001$). A média de

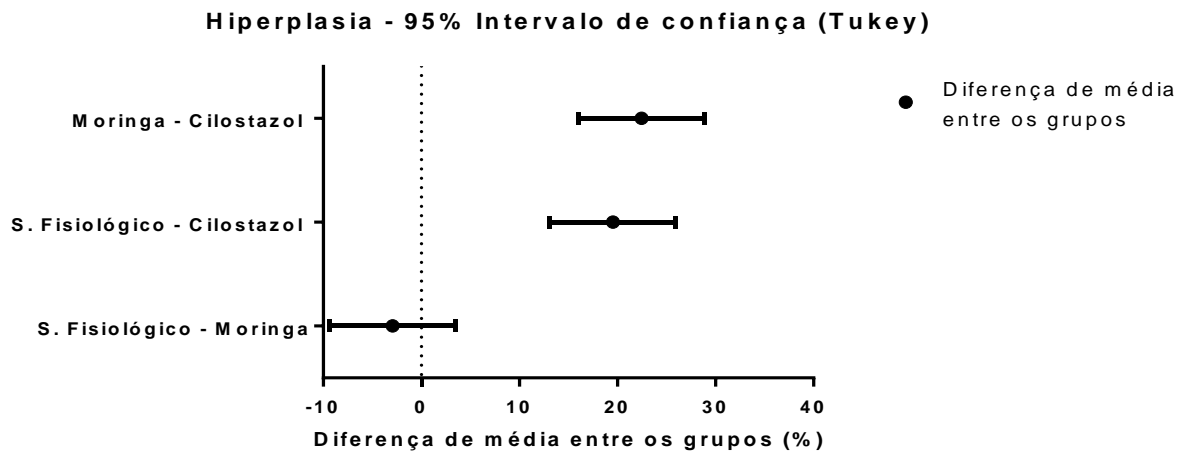
cada grupo e o respectivo intervalo de confiança foram representados da seguinte forma: SF $m = 35,74$ (IC 95% 31,76 a 39,71), Mo $m = 38,66$ (IC 95% 33,37 a 43,94) e o Cz $m = 16,21$ (IC 95% 13,36 a 19,05) (Figura 6). Quando empregado o teste “Tukey” de comparações múltiplas entre as diferenças de médias, o resultado foi confirmado, fornecendo os seguintes resultados: Mo - Cz $m = 22,452$ (IC 95% 16,010 a 28,894) ($p < 0,05$), SF - Cz $m = 19,529$ (IC 95% 13,087 a 25,971) ($p < 0,05$) e SF - Mo $m = -2,923$ (IC 95% -9,365 a 3,519) ($p > 0,05$) (Figura 7). Indicando, portanto, uma melhor resposta ao tratamento com cilostazol (Tabela 2).

Figura 6 – Representação gráfica da comparação de média de hiperplasia miointimal entre os grupos (%)



Fonte: Autor.

Figura 7 – Comparações múltiplas de médias de hiperplasia miointimal entre os grupos (%)



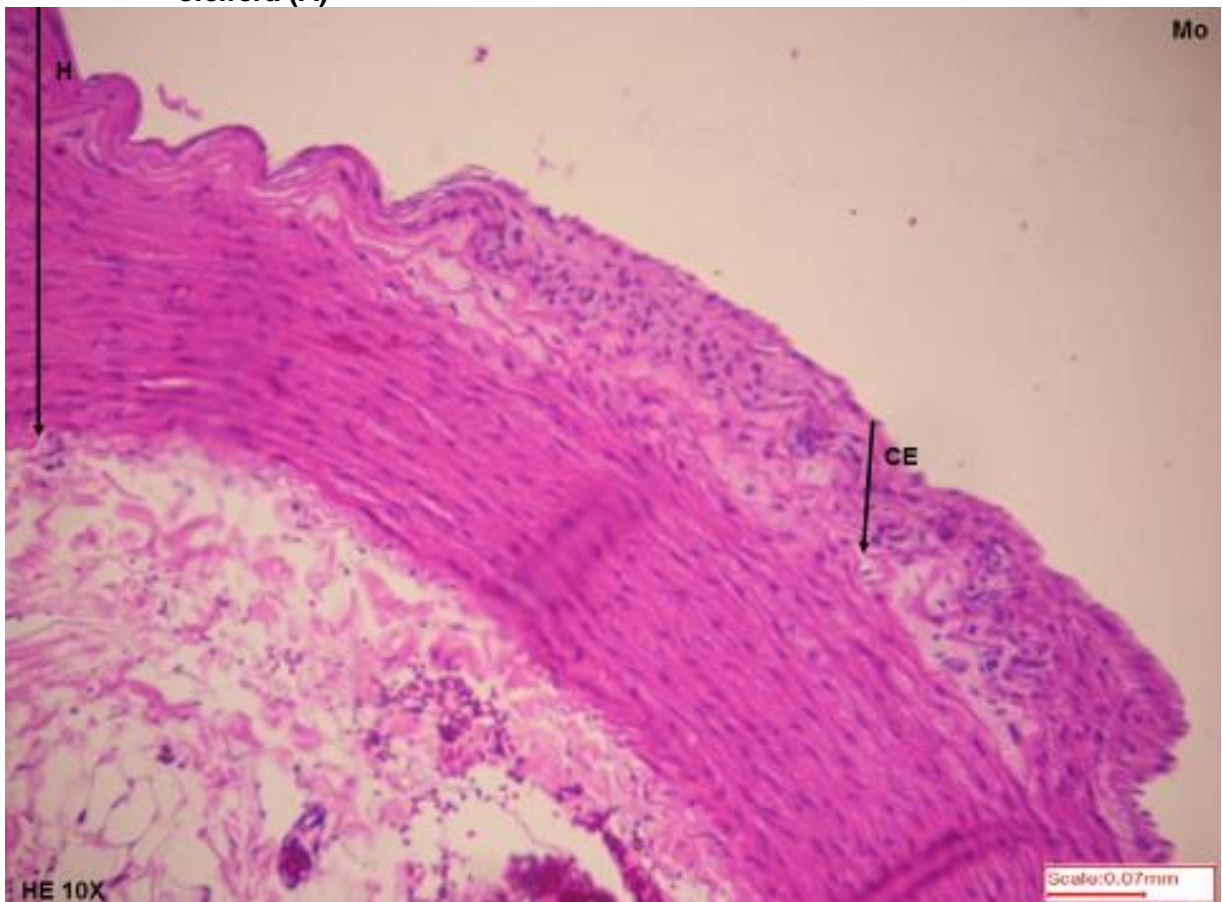
Mo - Cz m = 22,452 (IC 95% 16,010 a 28,894) $p < 0,05$

SF - Cz m = 19,529 (IC 95% 13,087 a 25,971) $p < 0,05$

SF - Mo m = -2,923 (IC 95% -9,365 a 3,519) $p > 0,05$

Fonte: Autor.

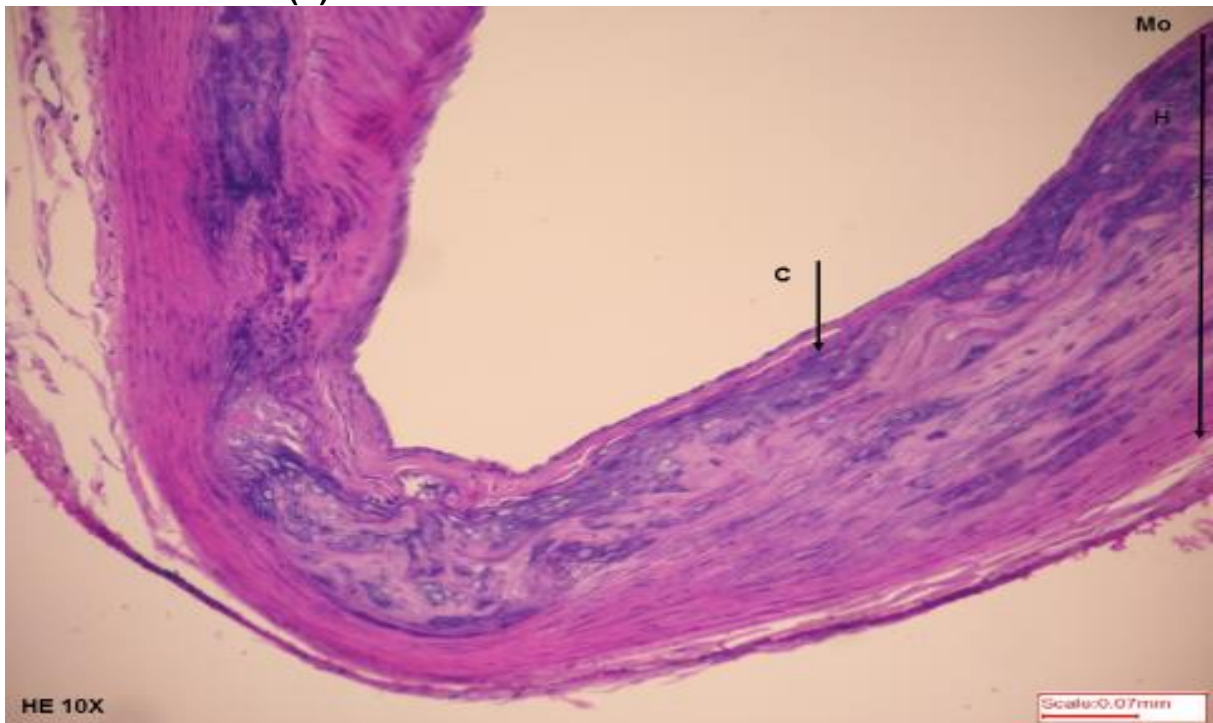
Figura 8 – Fotomicrografia em HE, Obj. 10x da artéria ilíaca direita do grupo Mo: *Moringa oleífera* (A)



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Seta H aponta hiperplasia miointimal, CE: células espumosas. Escala 0,07mm.

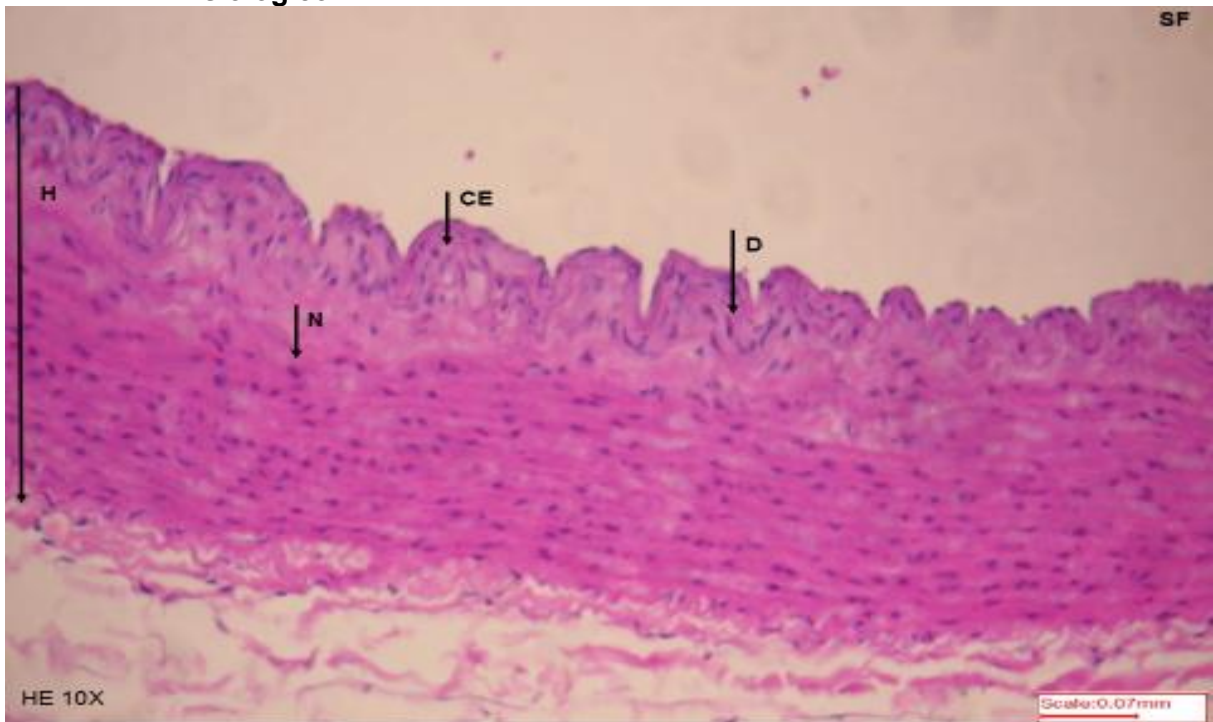
Figura 9 – Fotomicrografia em HE, Obj. 10x da artéria íliaca direita do grupo Mo: *Moringa oleífera* (B)



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Seta H aponta hiperplasia miointimal, C: cálcio. Em escala 0,07mm.

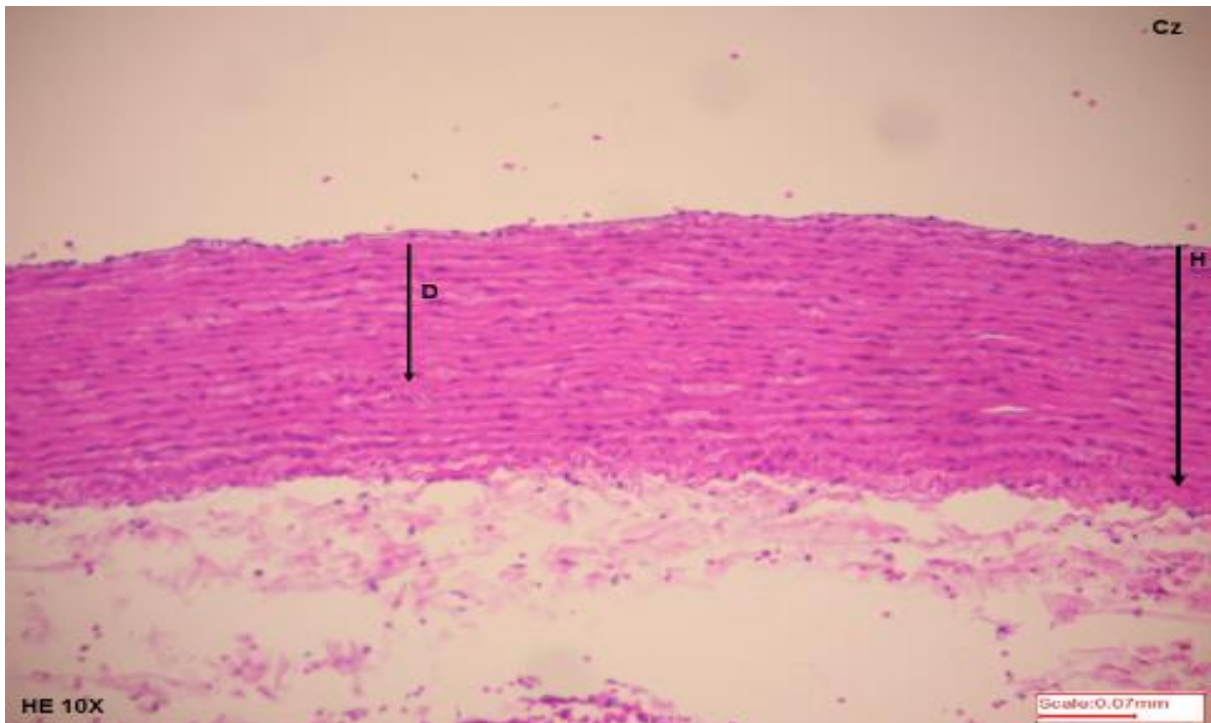
Figura 10 – Fotomicrografia em HE, Obj. 10x da artéria íliaca direita do grupo SF: Soro Fisiológico



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Seta H aponta hiperplasia miointimal, D: desarranjo de núcleos celulares, CE: células espumosas e N: núcleo. Em escala 0,07mm.

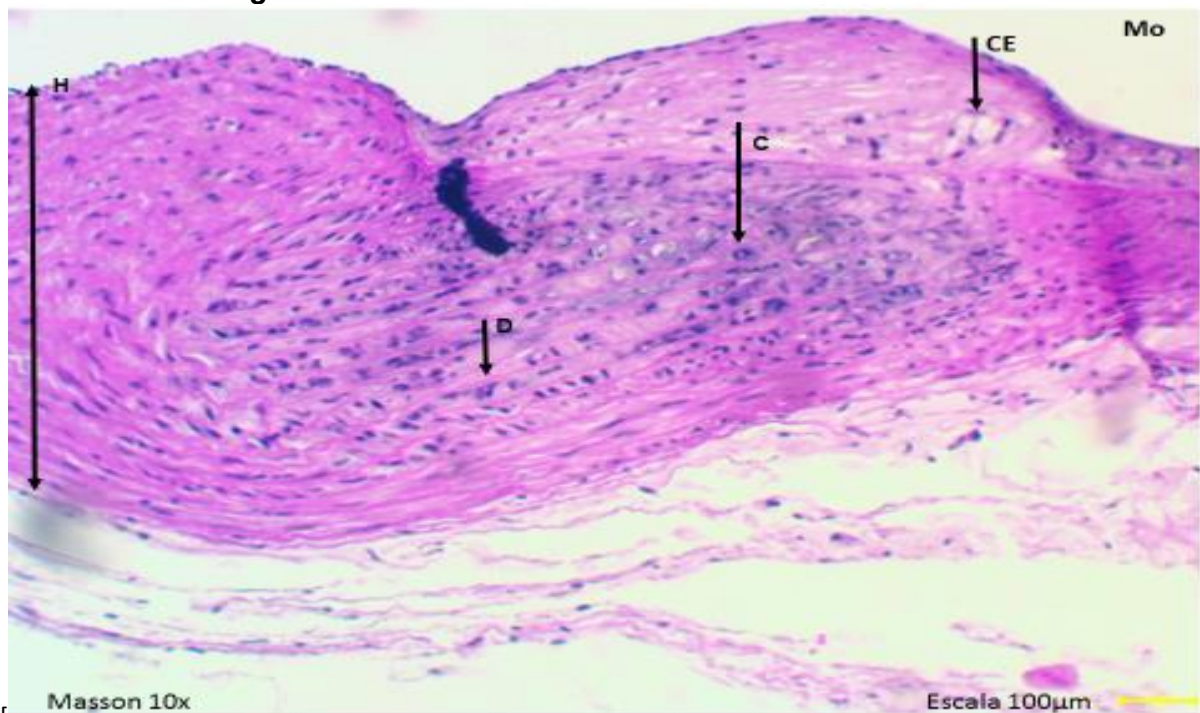
Figura 11 – Fotomicrografia em HE, Obj. 10x da artéria ilíaca direita do grupo Cz: Cilostazol



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Seta H aponta hiperplasia miointimal, D: desarranjo de núcleos celulares. Em escala 0,07mm.

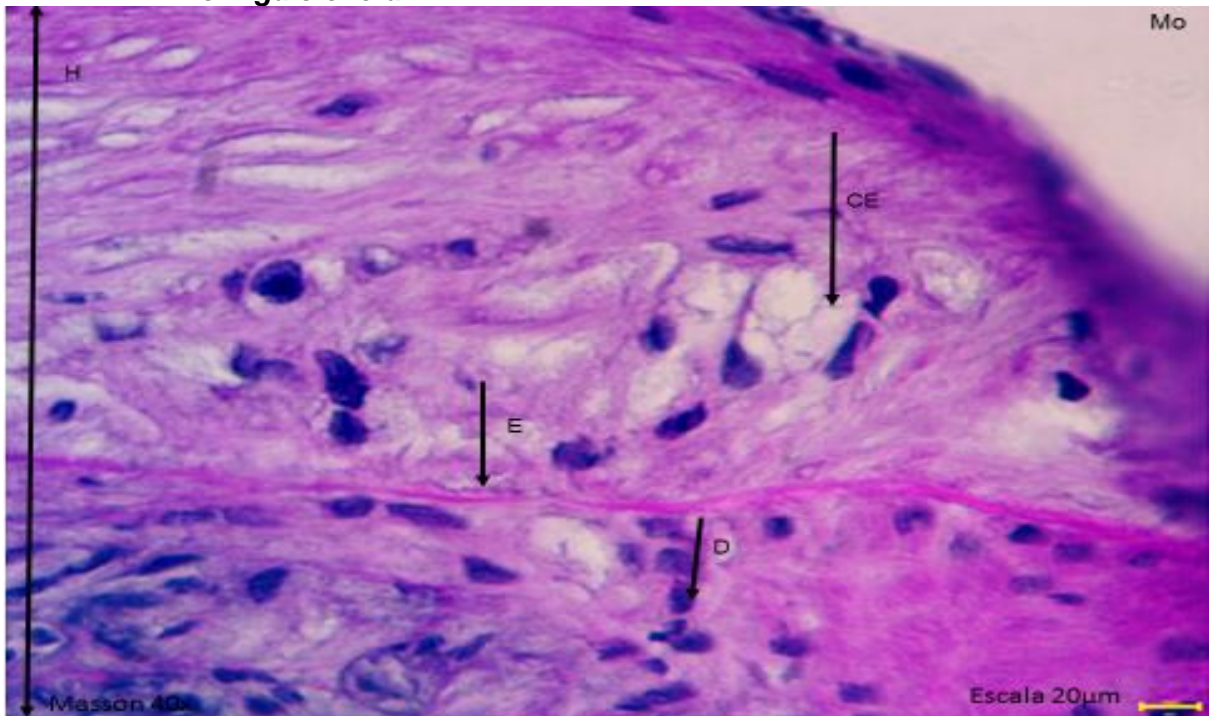
Figura 12 – Fotomicrografia em Masson, Obj. 10x da artéria ilíaca direita do grupo Mo: *Moringa oleifera*



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Seta H aponta hiperplasia miointimal, D: desarranjo de núcleos celulares, CE: células espumosas. Em escala 20µm

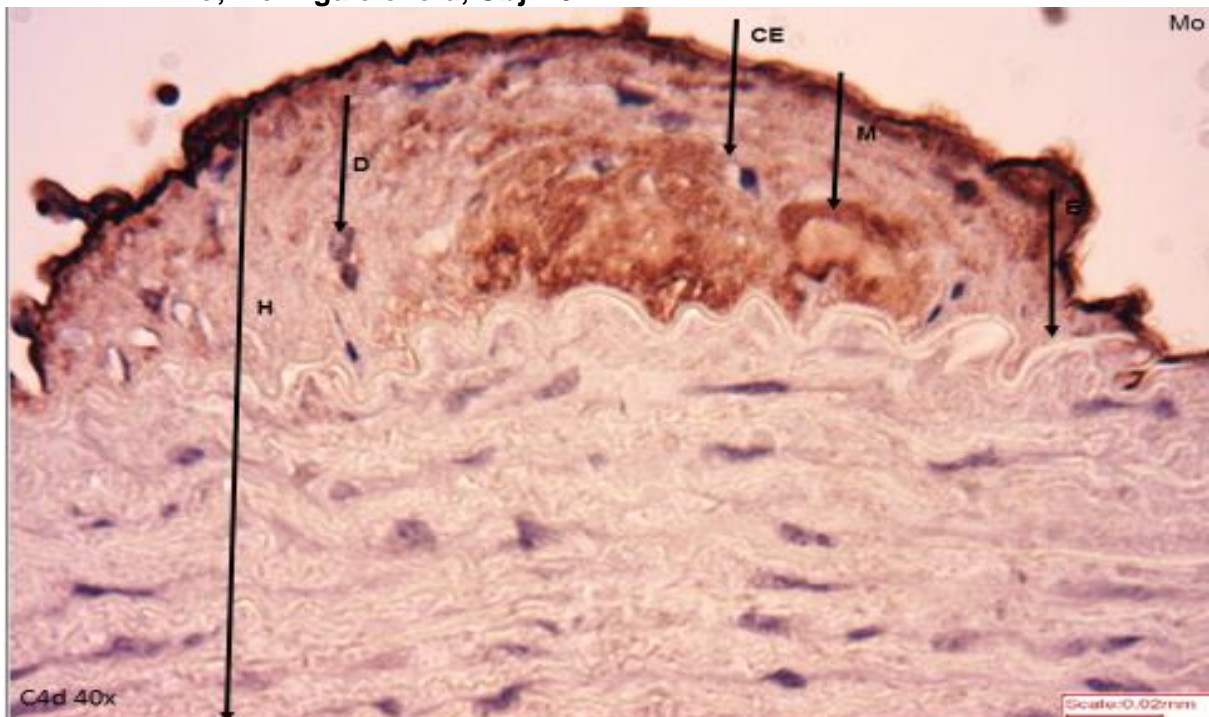
Figura 13 – Fotomicrografia em Masson, Obj. 40x da artéria ilíaca direita do grupo Mo: *Moringa oleifera*



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Seta H aponta hiperplasia miointimal, D: desarranjo de núcleos celulares, E: lâmina elástica interna, CE: células espumas. Em escala 20 μ m

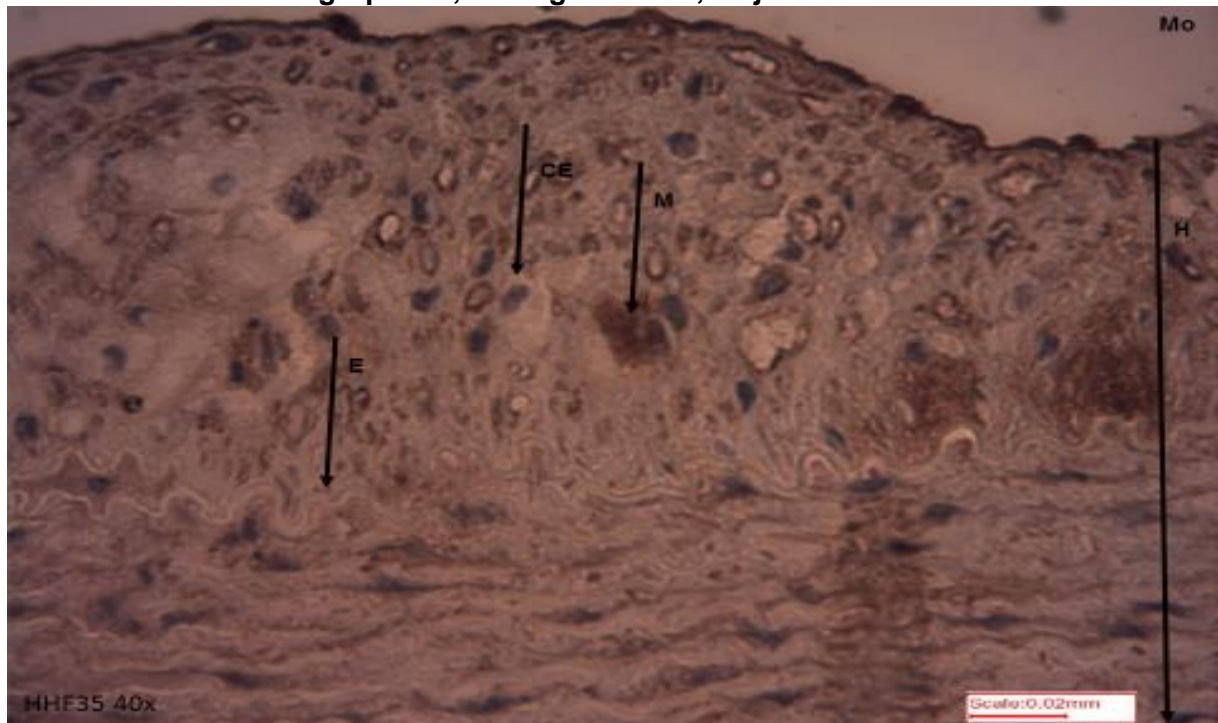
Figura 14 – Fotomicrografia imuno-histoquímica C4d da artéria ilíaca direita do grupo Mo; *Moringa oleifera*, Obj. 40x



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Seta H aponta hiperplasia miointimal, D: desarranjo de núcleos celulares, E: membrana elástica interna, M: marcador C4d e CE: célula espumosa. Escala 0,02mm.

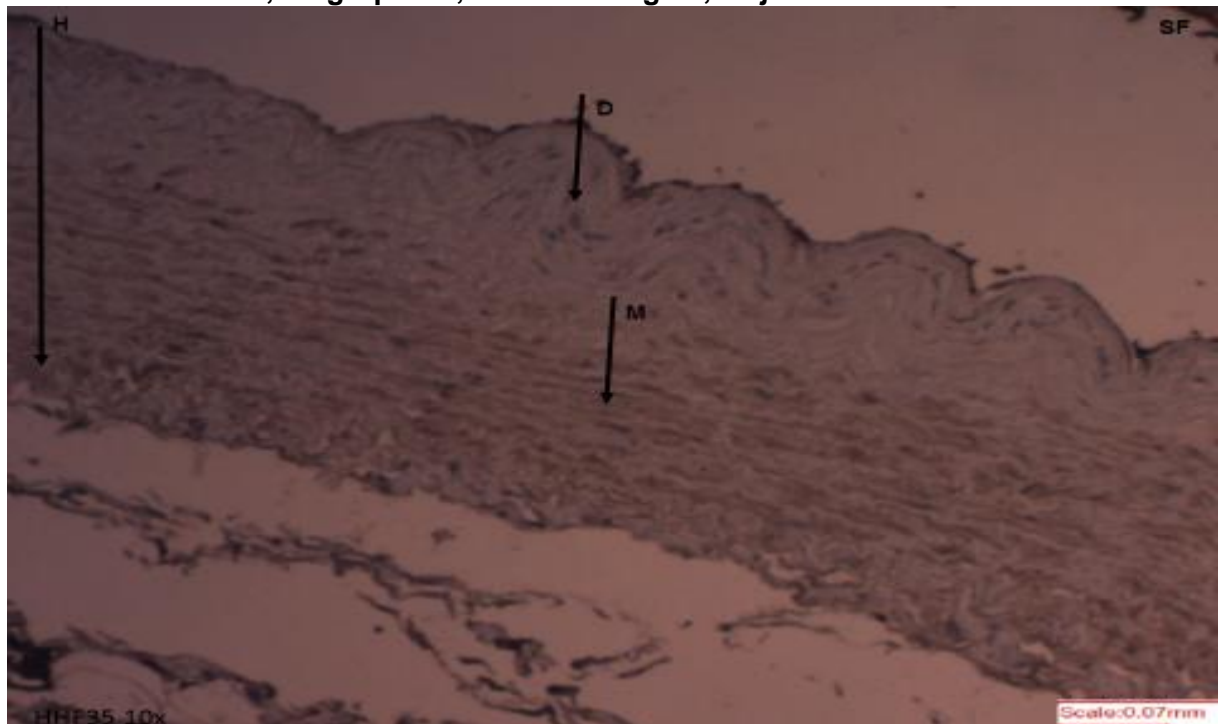
Figura 15 – Fotomicrografia imuno-histoquímica HHF35 monoclonal, da artéria íliaca direita do grupo Mo; Moringa oleifera, Obj. 40x



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Seta H sinaliza hiperplasia miointimal, CE: célula espumosa, M: marcador HHF35 monoclonal, E: membrana limitante elástica interna. Escala 0,02mm.

Figura 16 – Fotomicrografia imuno-histoquímica HHF35 monoclonal, da artéria íliaca direita, do grupo SF; Soro Fisiológico, Obj. 10x



Fonte: Acervo pessoal do autor

Notas: Seta H sinaliza hiperplasia miointimal, M: marcador HHF35 monoclonal. Escala 0,07mm.

4.3.2 Variáveis secundárias

4.3.2.1 Médias de espessura de parede miointimal avaliada nos grupos

Quando avaliada as médias de espessura de parede através da análise de variância, ANOVA (*one way*), satisfeitas as premissas de normalidades dos dados e igualdade de variâncias, foram evidenciados os seguintes resultados: medidas descritivas (média \pm DP) dos grupos e significância p-valor $< 0,05$. Assim, a média de cada grupo e o respectivo intervalo de confiança foram representados da seguinte forma: Mo m = 38,66 (IC 95% 33,37 a 43,94), o Cz m = 16,21 (IC 95% 13,36 a 19,05) e o SF m = 35,74 (IC 95% 31,76 a 39,71), de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 – Média, Desvio Padrão e IC95% do percentual da área de parede nos grupos

Droga	N	% Parede (M \pm DP)	IC95% (L _{inf} , L _{sup})	
Moringa	10	(38,66 \pm 7,39)	(33,37 a 43,94)	
Cilostazol	10	(16,21 \pm 3,98)	(13,36 a 19,05)	P < 0,0001*
S. Fisiológico	10	(35,74 \pm 5,55)	(31,76 a 39,71)	

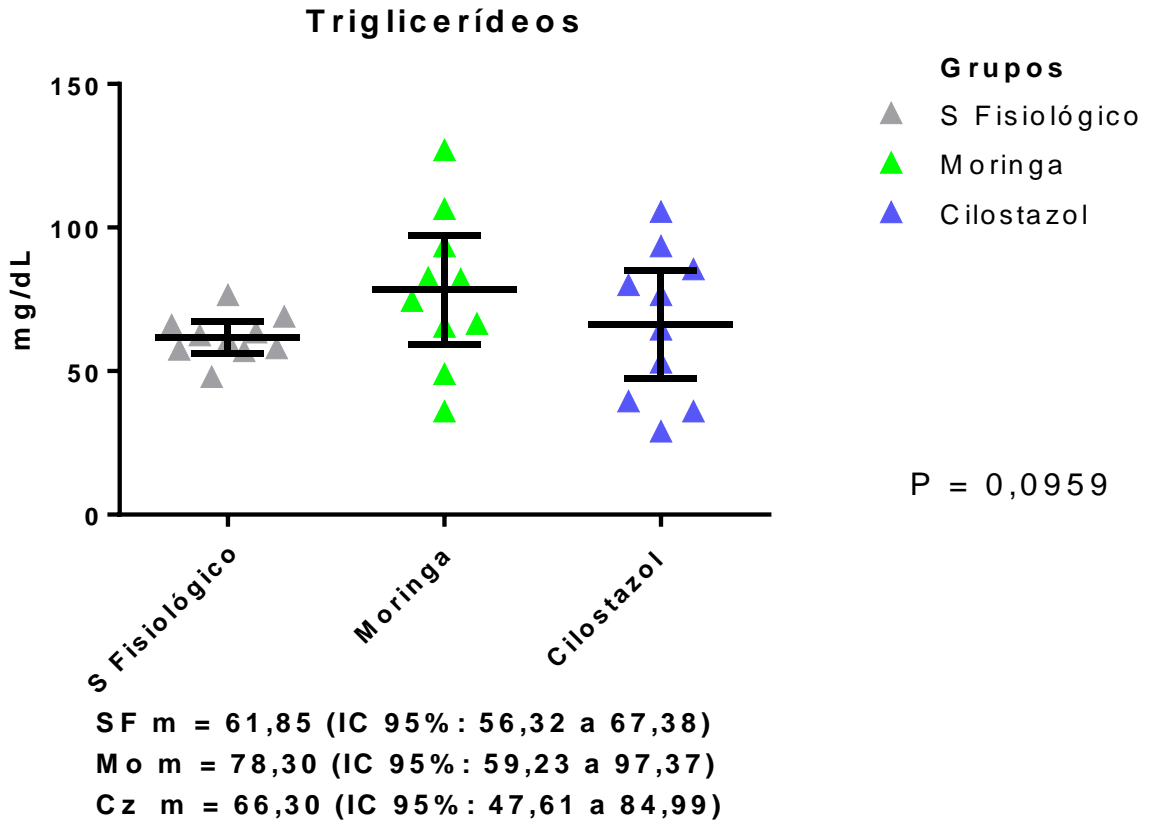
Fonte: Autor.

Nota: M: média e DP: desvio padrão - (*) ANOVA resultado significativo: p < 0,05

4.3.2.2 Avaliação do triglicérido

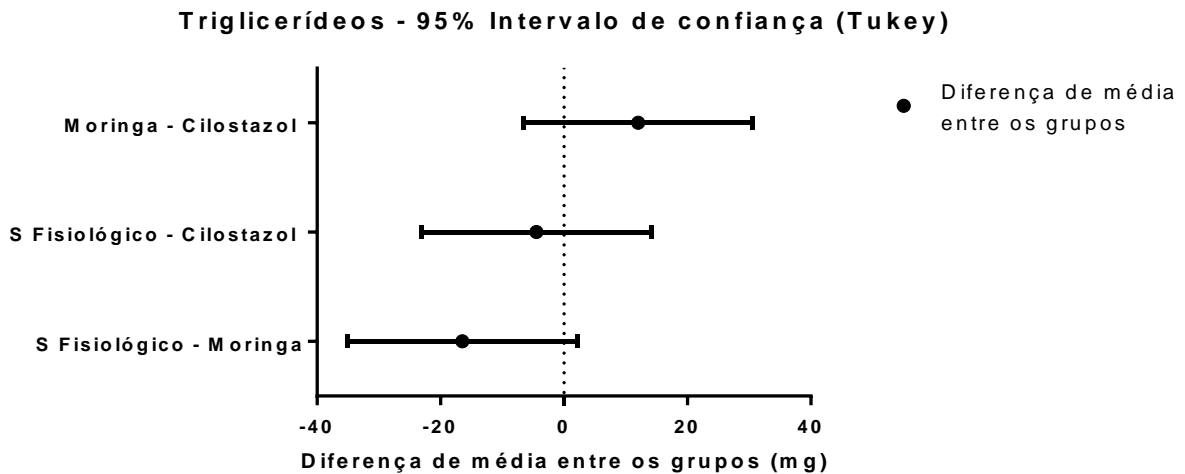
As médias de triglicérido iniciais e finais pela análise de variância; ANOVA (*two-way*), segundo os grupos (SF, Mo e Cz) não apresentaram resultado estatisticamente significativo (p=0,0959). A média de cada grupo e o respectivo intervalo de confiança foram representados da seguinte forma: SF m = 61,85 (IC 95%: 56,32 a 67,38), Mo m = 78,30 (IC 95%: 59,23 a 97,37) e Cz m = 66,30 (IC 95%: 47,61 a 84,99) (Figura 17). Para a confirmação destes resultados, foi realizado o teste “Tukey” de comparações múltiplas, quando as diferenças de médias entre os grupos foram confirmadas: Mo - Cz m = 12,00 (IC 95%: -6,62 a 30,62) p>0,05, SF - Cz m = -4,45 (IC 95%: -23,07 a 14,17) p<0,05 e SF - Mo m = -16,45 (IC 95%: -35,07 a 2,07) p>0,05 (Figura 18).

Figura 17 – Representação gráfica da comparação de médias de triglicerídeo entre os grupos



Fonte: Autor.

Figura 18 – Comparações múltiplas de médias de triglicerídeo entre os grupos



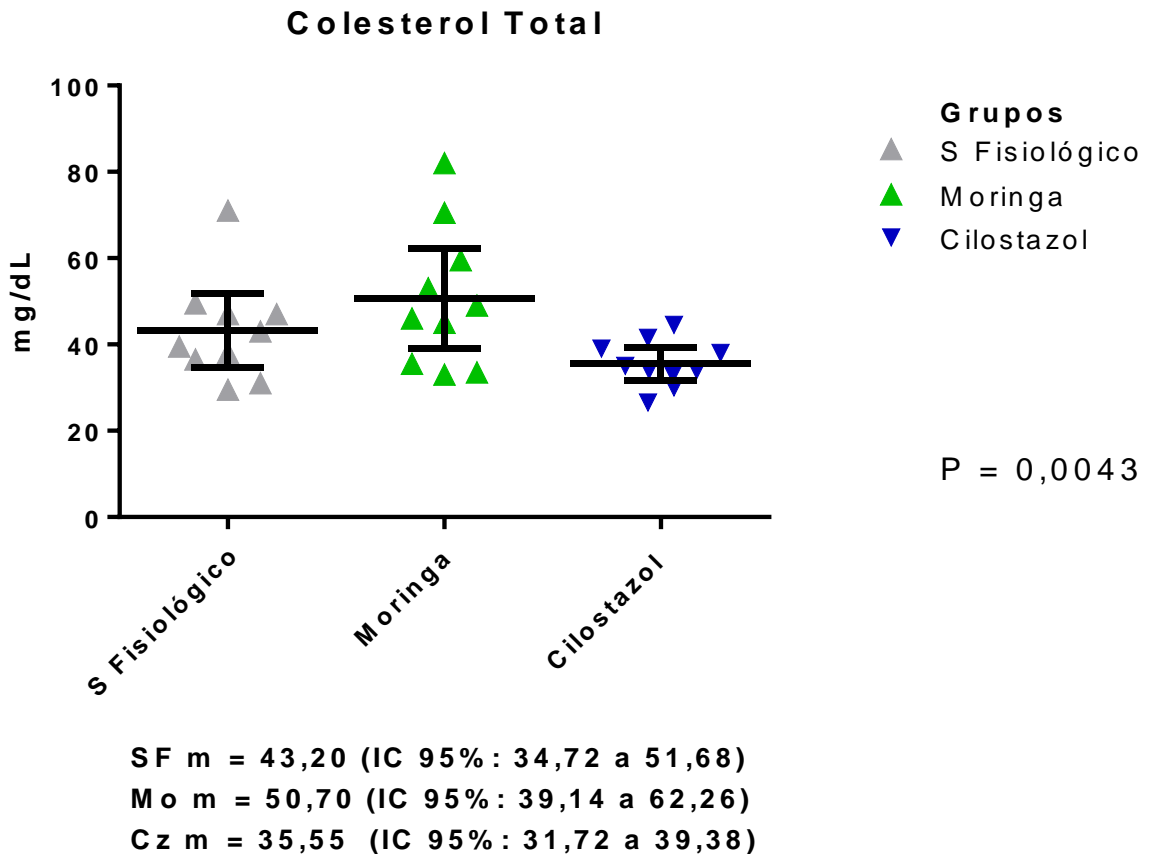
Mo - Cz m = 12,00 (IC 95% : -6,62 a 30,62) p>0,05
 SF - Cz m = -4,45 (IC 95% : -23,07 a 14,17) p>0,05
 SF - Mo m = -16,45 (IC 95% : -35,07 a 2,07) p>0,05

Fonte: Autor.

4.3.2.3 Avaliação do colesterol total

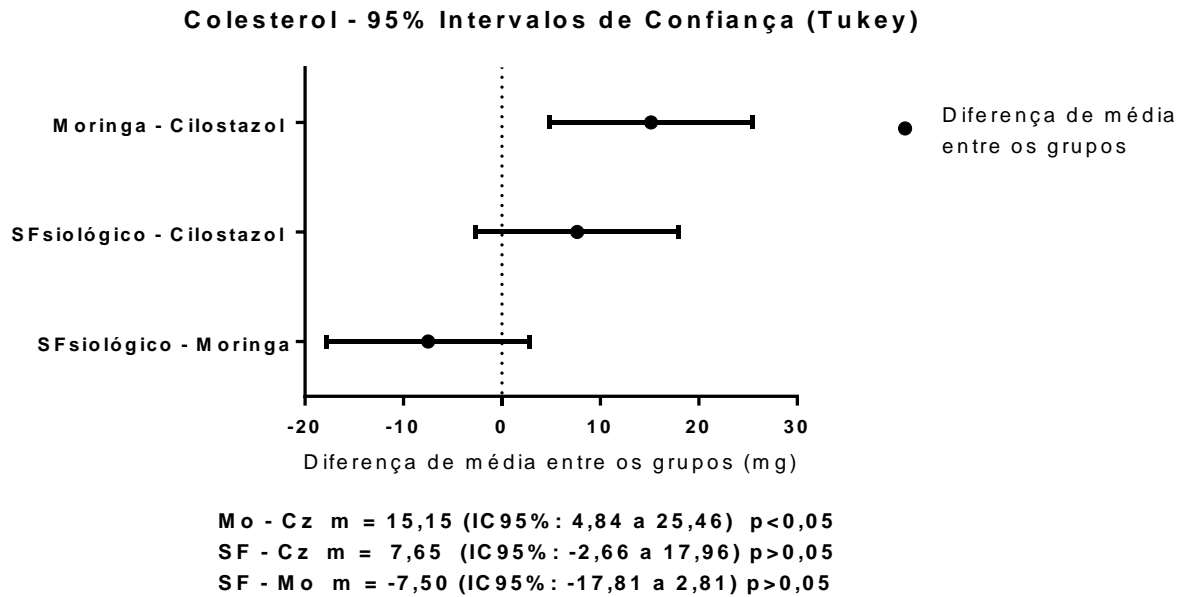
A avaliação da média inicial e final do colesterol total pela análise de variância; ANOVA (*two way*) em cada grupo (SF, Mo e Cz) apresentou resultados estatisticamente significativos ($p = 0,0043$). A média de cada grupo e o respectivo intervalo de confiança foram representados: SF $m = 43,20$ (IC 95%: 34,72 a 51,68), Mo $m = 50,70$ (IC 95%: 39,14 a 62,26) e Cz $m = 35,55$ (IC 95%: 31,72 a 39,38) (Figura 19). Quando os grupos foram avaliados pelo teste “Tukey” para as diferenças de médias, foram confirmados os resultados acima. Assim: Mo - Cz $m = 15,15$ (IC95%: 4,84 a 25,46) $p < 0,05$, SF - Cz $m = 7,65$ (IC95%: -2,66 a 17,96) $p > 0,05$ e SF - Mo $m = -7,50$ (IC95%: -17,81 a 2,81) $p > 0,05$ (Figura 20), mostrando melhor resposta ao tratamento com o cilostazol.

Figura 19 – Representação gráfica da comparação de médias de colesterol total entre os grupos



Fonte: Autor.

Figura 20 – Comparações múltiplas de médias de colesterol total entre os grupos

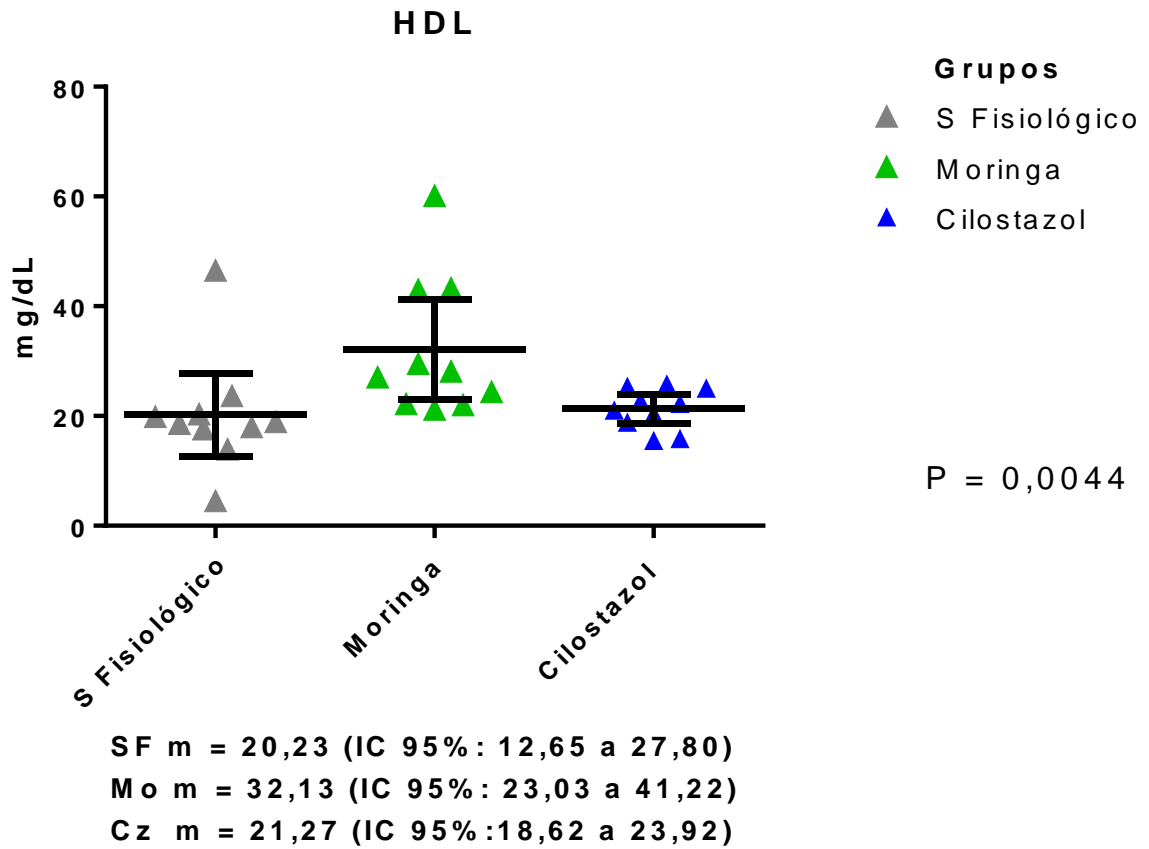


Fonte: Autor.

4.3.2.4 Avaliação do HDL

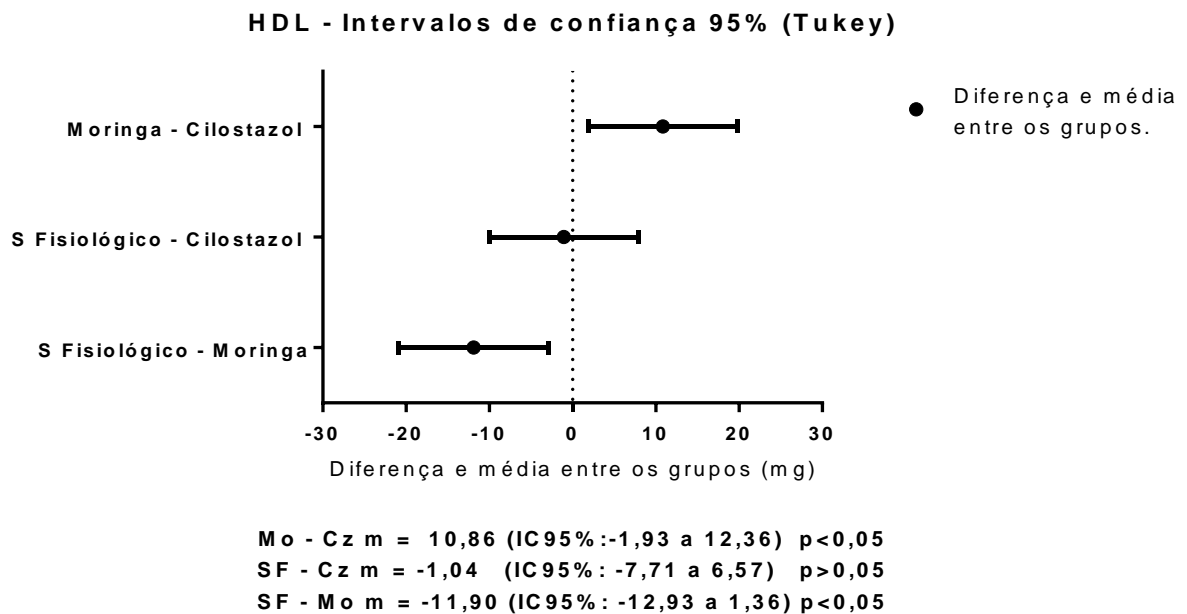
A média inicial e final do HDL em cada grupo de coelhos, avaliados pela análise de variância; ANOVA (*two-way*), segundo os grupos (SF, Mo e Cz) apresentou diferença estatisticamente significantes ($p = 0,0044$). A média e o intervalo de confiança de cada grupo foram representados: SF $m = 20,23$ (IC 95%: 12,65 a 27,80), Mo $m = 32,13$ (IC 95%: 23,03 a 41,22) e Cz $m = 21,27$ (IC 95%: 18,62 a 23,92). (Figura 21). A diferença de média entre os grupos foi avaliada pelo teste “Tukey”, que confirmou o resultado significativo. Assim: Mo - Cz $m = 10,86$ (IC95%: -1,93 a 12,36) $p < 0,05$, SF - Cz $m = -1,04$ (IC95%: -7,71 a 6,57) $p > 0,05$ e SF - Mo $m = -11,90$ (IC95%: -12,93 a 1,36) $p > 0,05$, confirmando maior média de HDL no grupo moringa (Figura 22).

Figura 21 – Representação gráfica da comparação de médias de HDL entre os grupos



Fonte: Autor.

Figura 22 – Comparações múltiplas de médias de HDL entre os grupos

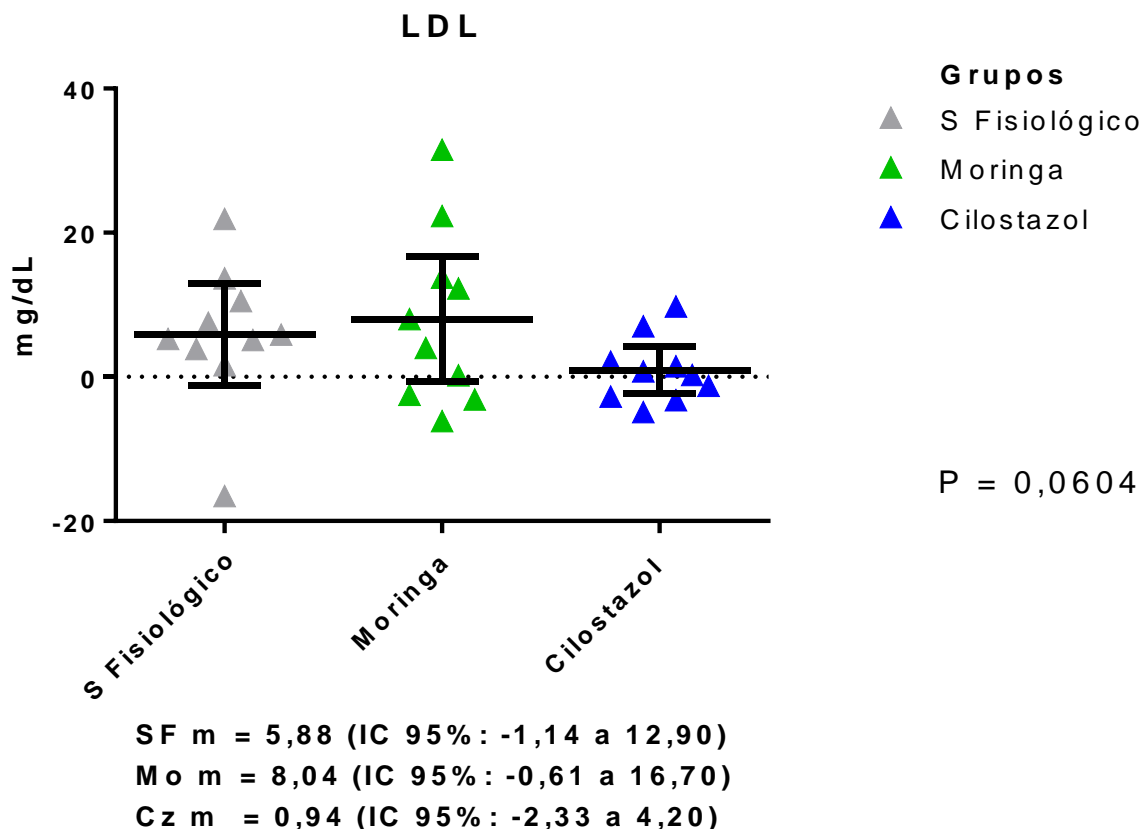


Fonte: Autor.

4.3.2.5 Avaliação do LDL

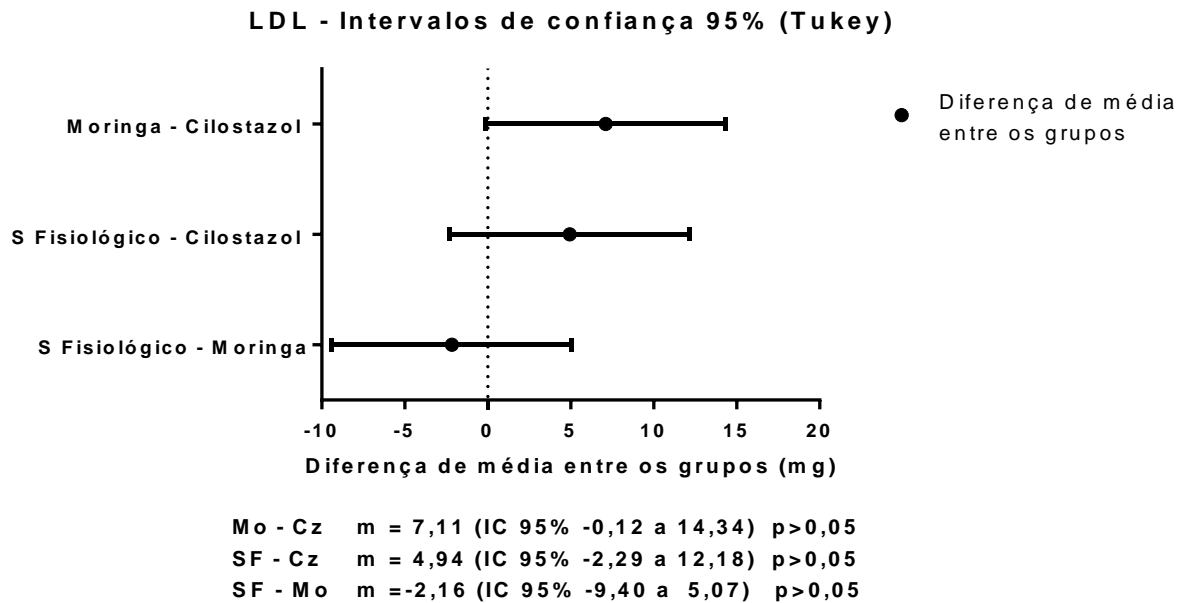
Da mesma forma, a média inicial e final do LDL foi avaliada pela análise de variância; ANOVA (*two-way*), segundo os grupos (SF, Mo e Cz) e não apresentou resultado estatisticamente significativos ($p=0,0604$). A média e intervalo de confiança de cada grupo foram aqui representados: SF $m = 5,88$ (IC 95%: -1,14 a 12,90), Mo $m = 8,04$ (IC 95%: -0,61 a 16,70) e Cz $m = 0,94$ (IC 95%: -2,33 a 4,20) (Figura 23). Quando a diferença de média do LDL pelo teste “Tukey” de comparações múltiplas entre os grupos, foi confirmado o resultado: Mo - Cz $m = 7,11$ (IC 95% -0,12 a 14,34) $p>0,05$, SF - Cz $m = 4,94$ (IC 95% -2,29 a 12,18) $p>0,05$ e SF - Mo $m = -2,16$ (IC 95% -9,40 a 5,07) $p>0,05$ (Figura 24).

Figura 23 – Representação gráfica da comparação de médias de LDL entre os grupos.



Fonte: Autor.

Figura 24 – Comparações múltiplas de médias de LDL entre os grupos

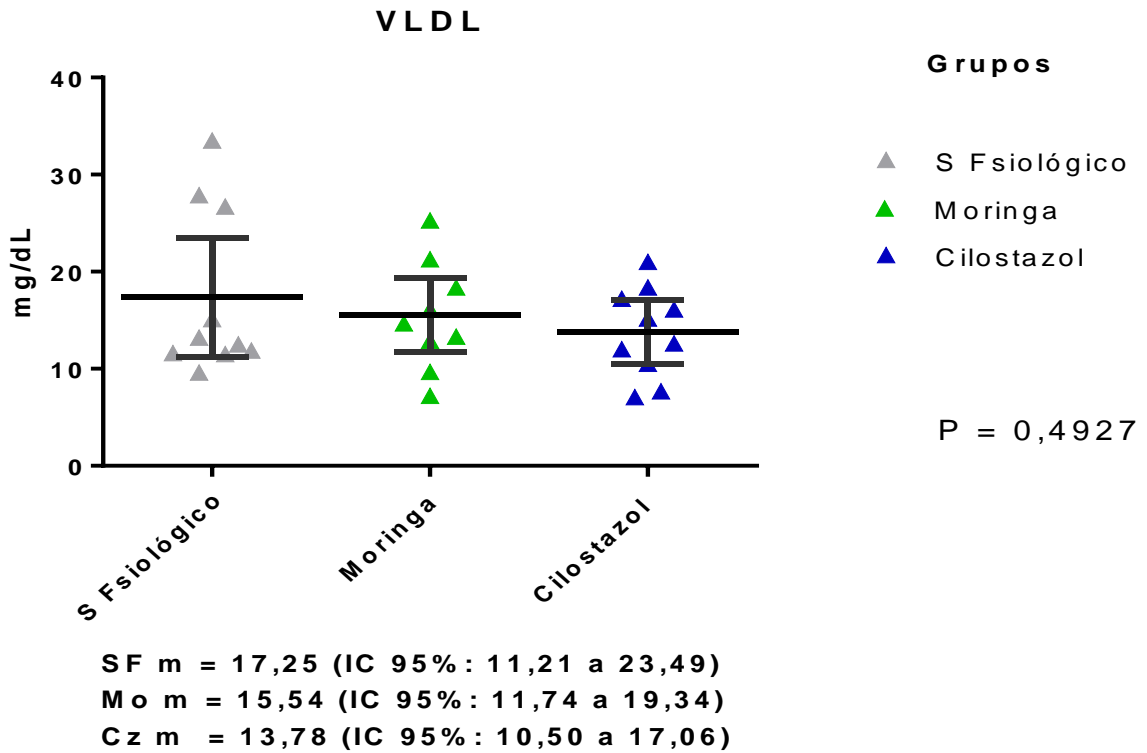


Fonte: Autor.

4.3.2.6 Avaliação do VLDL

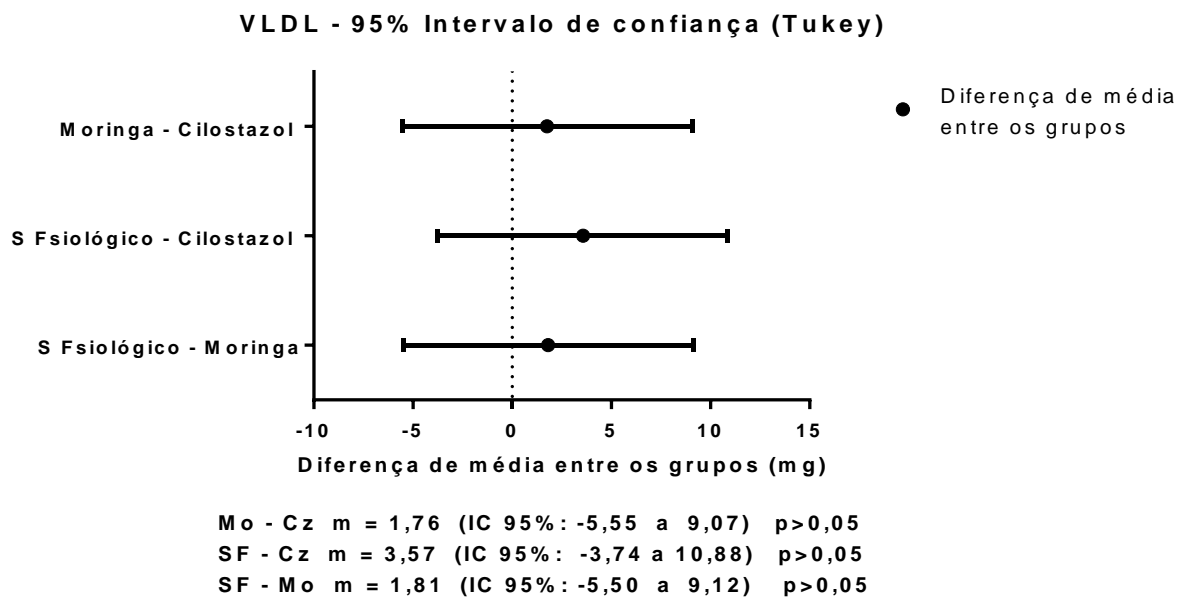
A avaliação pela análise de variância ANOVA (*two-way*) para as medidas inicial e final de VLDL (mg/dL) dos coelhos, segundo os grupos: (SF, Mo e Cz) não apresentou resultados estatisticamente significantes ($p=0,4927$). A média e intervalo de confiança de cada grupo estão representados por: SF $m = 17,25$ (IC 95%: 11,21 a 23,49), Mo $m = 15,54$ (IC 95%: 11,74 a 19,34) e Cz $m = 13,78$ (IC 95%: 10,50 a 17,06) (Figura 25). O teste “Tukey” para comparações múltiplas entre as diferenças de médias, confirmou os resultados: Mo - Cz $m = 1,76$ (IC 95%: -5,55 a 9,07) $p > 0,05$, SF - Cz $m = 3,57$ (IC 95%: -3,74 a 10,88) $p < 0,05$ e SF - Mo $m = 1,81$ (IC 95%: -5,50 a 9,12) $p > 0,05$, (Figura 26).

Figura 25 – Representação gráfica da comparação de médias de VLDL entre os grupos



Fonte: Autor.

Figura 26 – Comparações múltiplas de médias de VLDL entre os grupos



Fonte: Autor.

✓ **Avaliação dos valores médios do perfil lipídico dos animais**

Os valores médios: inicial e final dos lipidogramas com os respectivos percentuais e valores de (p), avaliados pelo teste t student de dados emparelhados, são mostrados na Tabela 3. Os valores médios de Colesterol total apresentaram decréscimo estatisticamente significativo ($p=0,0133$) no grupo Mo, estatisticamente sem significância ($p>0$) no grupo Cz e acréscimo não significativo ($p>0$) no grupo SF. Os valores médios de HDL apresentaram decréscimo não significativo ($p>0$) em todos os grupos (Cz, Mo e SF). Os valores médios de LDL apresentaram acréscimo não significativo ($p>0$) no grupo SF e decréscimo não significativo ($p>0$) nos grupos Mo e Cz. Do mesmo modo, os valores médios de VLDL apresentaram acréscimo não significativo ($p>0$) no grupo SF e decréscimo não significativo ($p>0$) nos grupos Mo e Cz. Assim, também, os triglicerídeos apresentaram decréscimo não significativo ($p>0$) no grupo Mo e acréscimo não significativo ($p>0$) nos grupos SF e Cz.

Tabela 3 – Comparação dos valores médios inicial x final dos LIPIDOGRAMAS com respectivos percentuais de acréscimos ou decréscimos representados pelo valor da significância (p) em cada grupo.

Grupos	Média_i	Média_f	Dif_media	Perc (%)	Desfecho	Teste t ⁽⁺⁾ (sig. p-valor)
S. FISIOLÓGICO						
COL (inicial x final)	40,0	46,4	-6,4	16,0	Acréscimo	$p=0,332$
HDL (inicial x final)	24,7	15,8	8,9	36,0	Decréscimo	$p=0,075$
LDL (inicial x final)	4,2	7,6	-3,4	81,0	Acréscimo	$p=0,490$
VLDL (inicial x final)	12,3	22,4	-10,1	25,1	Acréscimo	$p=0,126$
TRIGL(inicial x final)	61,8	61,9	-0,1	0,1	Acréscimo	$p=0,991$
MORINGA						
COLESTEROL	54,6	45,0	9,8	17,6	Decréscimo	$p=0,0133$
HDL	34,8	29,5	4,6	15,2	Decréscimo	$p=0,489$
LDL	10,5	5,6	4,9	46,7	Decréscimo	$p=0,271$
VLDL	15,6	15,5	0,1	0,6	Decréscimo	$p=0,965$
TRIGLICERÍDEOS	79,1	77,5	1,6	2,0	Decréscimo	$p=0,864$
CILOSTAZOL						
COL (inicial x final)	37,2	33,9	3,3	8,9	Decréscimo	$p=0,323$
HDL (inicial x final)	22,5	20,0	2,5	11,1	Decréscimo	$p=0,220$
LDL (inicial x final)	2,8	-0,9	3,7	132,1	Decréscimo	$p=0,302$
VLDL (inicial x final)	11,8	15,8	-4,0	33,9	Acréscimo	$p=0,145$
TRIGL(inicial x final)	60,1	72,5	-12,4	20,6	Acréscimo	$p=0,406$

Fonte: Autor.

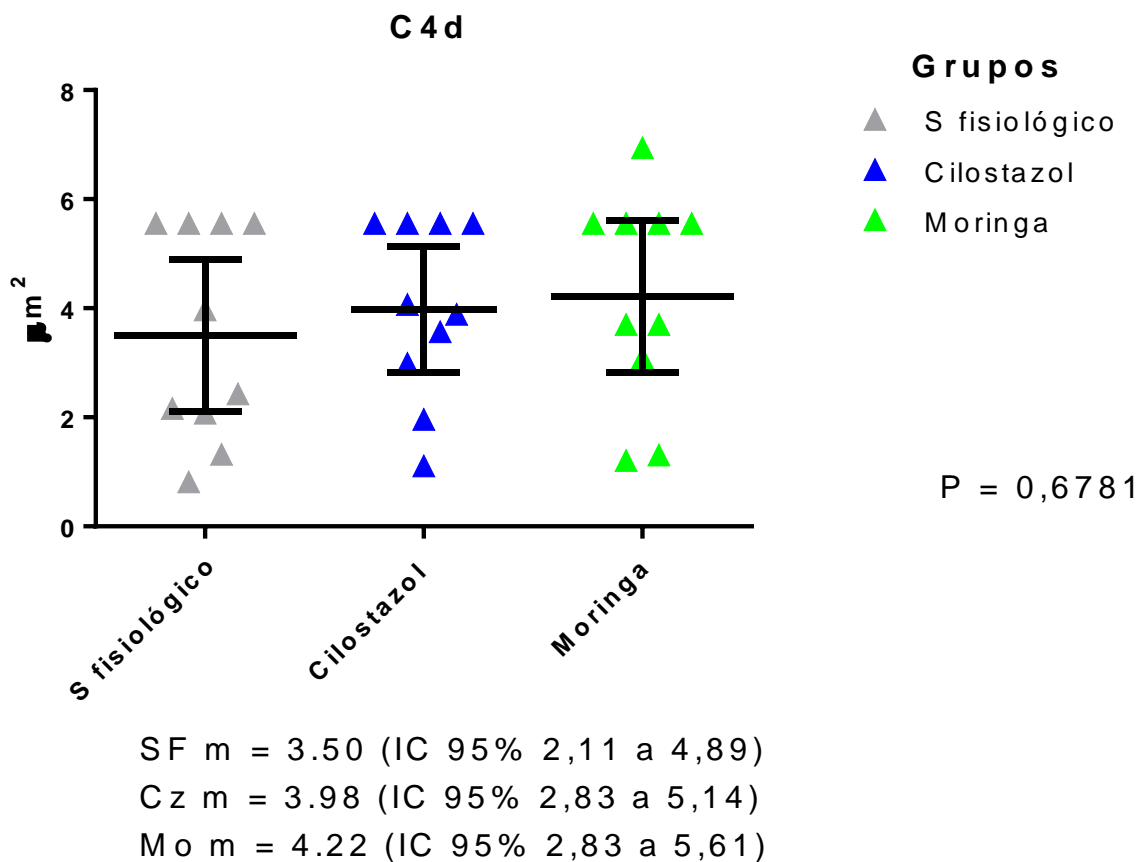
Nota: (+) Teste t dados emparelhados, resultado significativo: p-valor < 0,05

4.3.2.7 Imuno-histoquímica

4.3.2.7.1 Esteroscopia C4D

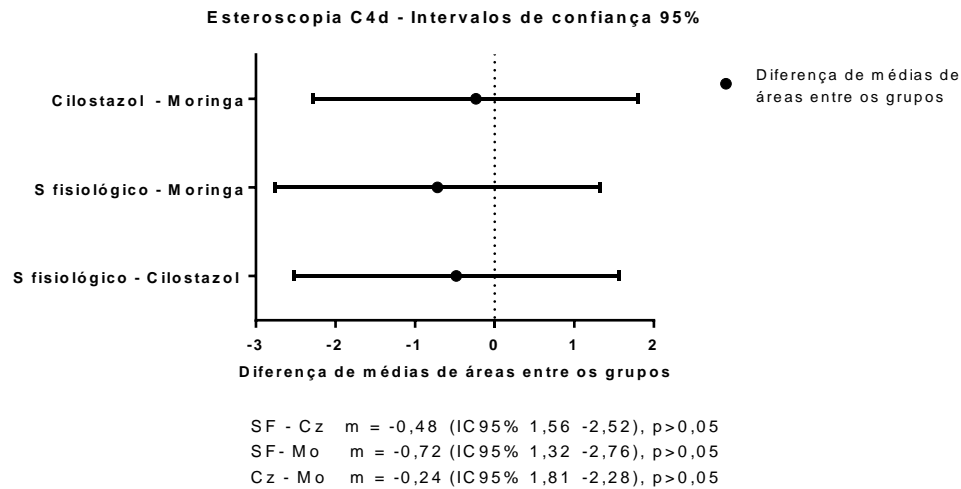
A média de área do marcador C4d entre os três grupos; (SF, Mo e Cz), a partir da aplicação da análise de variância; ANOVA (*one-way*), não apresentou resultado estatisticamente significativo ($p=0,6781$). A média e intervalo de confiança de cada grupo foram: SF $m = 3.50$ (IC 95% 2.11 a 4,89), Cz $m = 3,98$ (IC 95% 2.83 a 5,14) e Mo $m = 4,22$ (IC 95% 2.83 a 5.61), em acordo com a (Figura 27). Quando as diferenças de médias de áreas deste marcador foram avaliadas pelo teste “Tukey”, foi confirmado este resultado (Figura 28). Assim: SF - Cz $m = -0,48$ (IC 95% -2,52 a 1,56) ($p>0,05$), SF - Mo $m = -0,72$ (IC 95% -2,76 a 1,32) ($p>0,05$) e Cz - Mo $m = -0,24$ (IC 95% -2,28 a 1,81) ($p>0,05$).

Figura 27 – Representação gráfica da comparação de médias de áreas entre os grupos



Fonte: Autor.

Figura 28 – Comparações múltiplas de médias de áreas entre os grupos

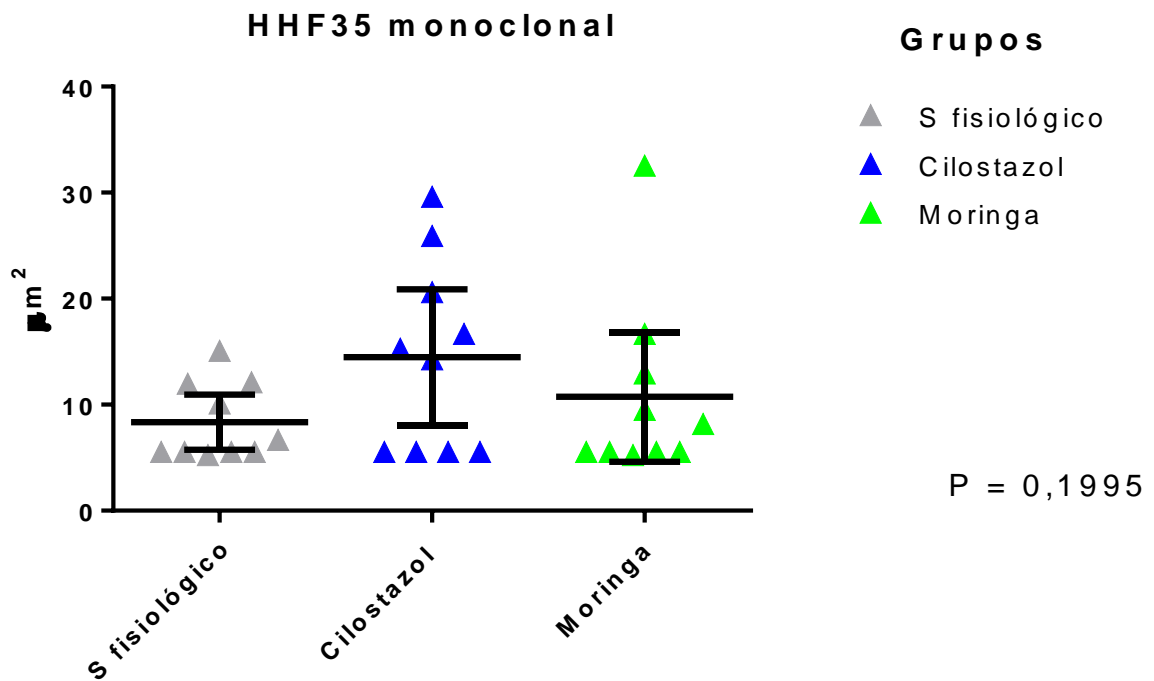


Fonte: Autor.

4.3.2.7.2 Esteroscopia HHF35 monoclonal

A média de área do marcador HHF35 monoclonal em cada grupo (SF, Mo e Cz), avaliada por análise de variância; ANOVA (*one-way*), não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,1995$). Assim, a média e intervalo de confiança de cada grupo: SF $m = 8,34$ (IC 95% 5,74 a 10,95), Cz $m = 14,47$ (IC 95% 8,06 a 20,88) e Mo $m = 10,74$ (IC 95% 4,61 a 16,87) (Figura 29). A avaliação pelo teste “Tukey”, para comparações múltiplas, entre as diferenças de médias de áreas, confirma este resultado (Figura 30), não apresentando resultados estatisticamente significantes e as diferenças de médias foram representadas: SF – Cz $m = -6,13$ (IC 95% -14,39 a 2,15) ($p>0,05$), SF- Mo $m = -2,39$ (IC 95% -10,67 a 5,88) ($p>0,05$) e Cz – Mo $m = 3,73$ (IC 95% -4,54 a 12,00) ($p>0,05$).

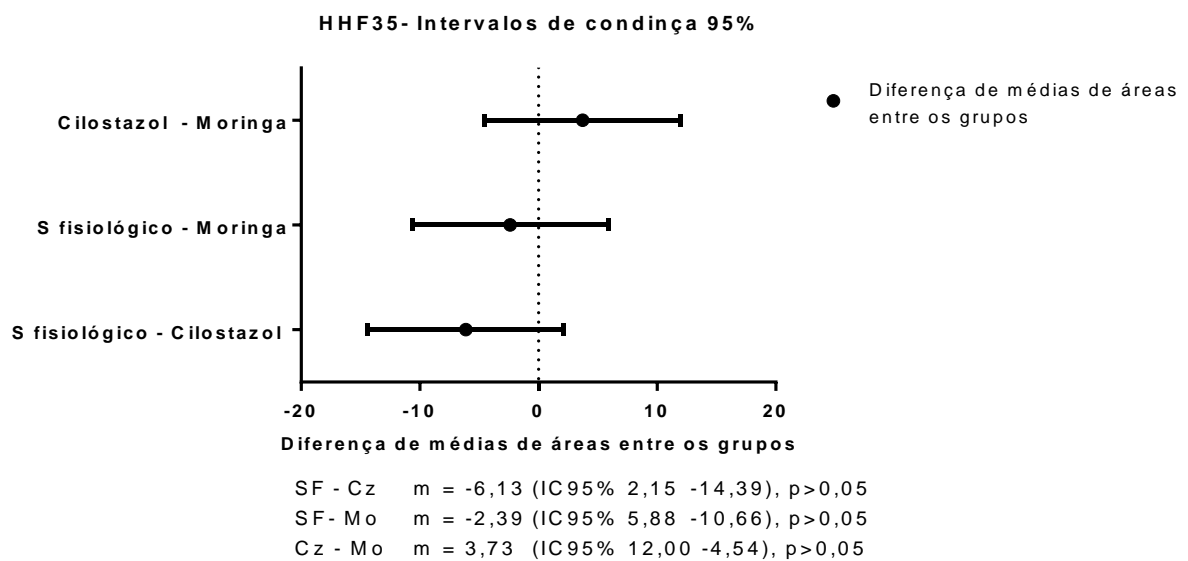
Figura 29 – Representação gráfica da comparação de médias de áreas entre os grupos



SF m = 8,34 (IC 95% 5,74 a 10,95)
 Cz m = 14,47 (IC 95% 8,06 a 20,88)
 Mo m = 10,74 (IC 95% 4,61 a 16,87)

Fonte: Autor.

Figura 30 – Comparações múltiplas de médias de áreas entre os grupos



Fonte: Autor.

✓ Dados complementares

A frequência de eventos, resultantes do procedimento operatório e do emprego das drogas, durante o tratamento dos grupos (SF, Mo e Cz), avaliados pelo teste de associação de Qui-quadrado, aplicado aos eventos (Células espumosas, Colangite, Infiltrado portal e Infecção) não apresentaram resultados significantes ($p > 0,05$). Para os eventos Esteatose hepática, Isquemia e Perda de membros não puderam ser realizados o teste de Qui-quadrado, conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Distribuições conjunta da frequência de eventos, segundo o tipo de Drogas

Frequência/eventos	Total		Tipo de Drogas						Teste de χ^2 Sig. p-valor
			Cilostazol		S.Fisiológico		Moringa		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Células espumosas									
Sim	5	17	1	10	1	10	3	30	p=0,383
Não	25	83	9	90	9	90	7	70	
Total	30	100	10	100	10	100	10	100	
Colangite Hepática									
Sim	21	70	8	80	6	60	7	70	p=0,621
Não	9	30	2	20	4	40	3	30	
Total	30	100	10	100	10	100	10	100	
Esteatose Hepática									
Sim	1	3,3	1	10	-	-	-	-	n. r. (*)
Não	29	96,7	9	90	10	100	10	100	
Total	30	100	10	100	10	100	10	100	
Infiltrado Portal									
Sim	21	70	8	80	6	60	7	70	p=0,621
Não	9	30	2	20	4	40	3	30	
Total	30	100	10	100	10	100	10	100	
Isquemia									
Sim	3	10	-	-	3	30	-	-	n. r. (*)
Não	27	90	10	100	7	70	10	100	
Total	30	100	10	100	10	100	10	100	
Infecção									
Sim	11	36,7	5	50	4	40	2	20	p=0,366
Não	19	63,3	5	50	6	60	8	80	
Total	30	100	10	100	10	100	10	100	
Perda de membros⁺									
Sim	3	10	-	-	3	30	-	-	n. r. (*)
Não	27	90	10	100	7	70	10	100	
Total	30	100	10	100	10	100	10	100	

Fonte: Autor.

Notas: Teste de Associação de Qui-Quadrado, resultado não significativo: $p > 0,05$

(⁺) Teste de Qui-Quadrado: n.r. (não realizado) não válido em virtude de células vazias.

5 DISCUSSÃO

A hipótese da *Moringa oleifera* ser superior ao cilostazol na redução da hiperplasia miointimal, em artérias ilíacas de coelhos com aterosclerose, foi rejeitada porque a variável primária mostrou que em números absolutos, houve maior redução da hiperplasia miointimal no grupo do cilostazol. É provável que este resultado tenha ocorrido em virtude da dose insuficiente da *Moringa oleifera* empregada ou pelo tempo de tratamento reduzido, neste estudo.

5.1 Discussão dos métodos

Para este experimento, foi selecionado o coelho, por ser de fácil manuseio, manutenção e relativamente barato, além da conhecida tendência a desenvolver hipercolesterolemia e lesões ateroscleróticas, quando alimentados com dieta rica em colesterol. A seleção do animal para esta pesquisa está em acordo com o método de seleção de outros autores (ROSS; MINICK; ZILVERSMIT, 1978; ANDERSON, 1992; BOCAN et al., 1993; FERRER et al., 2010). A explicação para esta concordância pode ser, porque o coelho, provavelmente, apresenta anatomia adequada à instalação da hiperplasia e fisiopatologia aterosclerótica em fase inicial semelhante ao ser humano.

O emprego de coelhos fêmeas, nesta investigação, foi devido a serem animais dóceis, de fácil manipulação, além de poderem ser mantidos em dois animais numa mesma gaiola. Como também, já foi mostrado não haver diferença de intensidade de hiperplasia e de aterosclerose entre coelhos machos e fêmeas. Estas informações são corroboradas por outros estudos (O'BRIEN et al., 1991; ASADA et al., 1996; FERRER et al., 2010; GUZELOGLU et al., 2012; VAN CRAEYVELD et al., 2012), que também empregaram coelhos fêmeas em seus estudos. A justificativa, para a seleção de coelhos fêmeas, nesta pesquisa, foi por comodidade de espaço no biotério onde foi realizada a investigação.

Neste estudo, a aterosclerose foi instalada nos coelhos pela gema de ovo de galinha granjeirense, por ser uma fonte alimentar de colesterol de baixo custo. Além do mais, a gema de ovo é rica em gorduras saturadas e proteínas animais, o que causa mais lesões ateroscleróticas nas artérias de coelhos. Estes dados estão em concordância com outras pesquisas (JALDIN et al., 2006; SANTOS, 2008; NOGUEIRA, 2012; ROLIM, 2012). A explicação para o uso da gema de ovo, poderia ser devida à sua concentração elevada em gordura e colesterol e, principalmente, pelo

baixo custo e disponibilidade, além de poucos efeitos colaterais nos animais. Diferente da gema de ovo, a aquisição do colesterol purificado não é tão acessível quanto à gema do ovo, além do alto custo, o que pode limitar o seu emprego em larga escala, no estudo da aterosclerose experimental. Além do mais, foi mostrado por Santos (2008) que 20 mL de gema de ovo produziu maior aumento de colesterol sérico que um grama (1 g) de colesterol, durante seu estudo.

A hiperplasia miointimal, nesta investigação, foi instalada por lesão endotelial através de balão expandido intraluminal, associada à dieta hipercolesterolêmica pela gema de ovo para aumentar a produção de hiperplasia e aterosclerose. Este método experimental empregado está em acordo com outros estudos (BRASSELET et al., 2008; NOGUEIRA, 2012; ROLIM, 2012; TAKIGAWA et al., 2012), que utilizaram modelos experimentais semelhantes, com instalação da aterosclerose pela via alimentar, associada à lesão mecânica endotelial por balão. Esta associação poderia ser justificada pela necessidade de maior produção de células espumosas nas camadas íntima e média para aumento da resposta proliferativa das células musculares lisas, semelhante à observada em artérias ateroscleróticas humanas.

Para a realização da desnudação endotelial pelo balão, nesta pesquisa, foi empregado, como acesso, a artéria femoral direita dos coelhos para a angioplastia na artéria ilíaca externa ipsilateral. Em concordância com este estudo, métodos semelhantes foram empregados (USUI et al., 1999; BRASSELET et al., 2008; NOGUEIRA, 2012; ROLIM, 2012). A justificativa para o emprego desta via de acesso poderia ser pela facilidade de abordagem desta artéria, além do diâmetro adequado para a passagem do balão até o território da artéria ilíaca externa direita, onde foi realizada a angioplastia por balão.

Terminada a angioplastia, a hemostasia foi feita por ligadura da artéria femoral superficial ipsilateral, com cuidado, para não ocluir a femoral comum, para evitar fenômenos isquêmicos no membro ipsilateral. Corroborando com esta técnica, estudos prévios realizaram mesmo procedimento (PLATE et al., 1989; HEHRLEIN et al., 1996; BRASSELET et al., 2008). A explicação para a ligadura da artéria femoral, nesta investigação, foi devido à ausência de material adequado para a reconstituição arterial no centro cirúrgico, onde foi realizada a pesquisa.

O tratamento com o extrato etanólico das folhas da *Moringa oleifera*, neste estudo, foi empregado, porque este extrato contém maior concentração de princípios ativos fenólicos antioxidante do que o extrato aquoso, segundo Siddhuraju e Becker,

(2003). Desta forma, o extrato etanólico foi administrado aos coelhos desta pesquisa, em dose única diária. Estes dados concordam de modo semelhante com o método empregado por Rolim (2012). A justificativa para a escolha do extrato etanólico, neste estudo, além do conhecimento da maior concentração de princípios ativos antioxidante extraído pelo álcool etanólico, foi também pela maior disponibilidade e facilidade de manuseio desse produto no laboratório bioquímico, onde foi realizada esta investigação.

Diferentemente desta pesquisa, que empregou a *Moringa oleifera* para inibir a hiperplasia miointimal pelo período de 35 dias, outros estudiosos (MEHTA et al., 2003) empregaram esse extrato pelo período de 120 dias, com o objetivo de reduzir a dislipidemia. De modo semelhante Chumark *et al.* (2008), fizeram uso do extrato aquoso das folhas da moringa em dose reduzida; 100 mg/kg de peso corporal pelo período de 12 semanas. A diferença de período de tempo entre esses estudos, poderia ser justificada pelo objetivo e planejamento diferente de cada pesquisa.

De modo comparativo, a *Moringa oleifera* e o cilostazol foram empregados no tratamento da hiperplasia miointimal em dose única diária pelo período de cinco semanas. Este método está em acordo com a pesquisa realizada por Tsai et al. (2008), em que o cilostazol foi administrado na mesma dose diária e pelo mesmo período de tempo, em coelhos ateroscleróticos. Por outro lado, outras pesquisas (ITO et al., 2012; TAKIGAWA et al., 2012) fizeram uso do cilostazol com metade da dose empregada, neste estudo, por período, variando de 21 a 70 dias, com o objetivo de obter o controle da hiperplasia miointimal e da aterosclerose, em coelhos hipercolesterolêmicos. As variações de doses medicamentosas e intervalos de tempo diferentes, envolvidos naquelas pesquisas, poderiam ser explicadas pelo interesse dos estudiosos em descobrir e solucionar as consequências da hiperplasia miointimal e da aterosclerose nos seres humanos, através dos diversos estudos bem controlados.

As artérias angioplastadas foram avaliadas pela histologia e pela morfometria, após as colorações hematoxilina/eosina para a visualização das anormalidades na parede arterial lesada pelo balão e para determinação do índice miointimal pela morfometria. Estes dados estão em acordo com estudo prévio Rolim (2012), em que foi empregado método semelhante em sua pesquisa para determinar a hiperplasia miointimal. De outra forma, nesta pesquisa, foi empregada a coloração Tricromo de Masson para identificar colágeno e suas anormalidades, além da coloração Verhoeff

para identificar desestruturação e fragmentação ou perda de integridade de fibras elásticas, após angioplastia por balão. Estas variações de colorações, empregadas nos estudos, podem ser justificadas para facilitar a identificação de estruturas celulares e aumentar o entendimento das anormalidades celulares nas doenças vasculares.

Neste estudo, também foi avaliada a presença de reação imunológica nas áreas angioplastadas das artérias dos coelhos, pela imuno-histoquímica, através do marcador C4d para identificar anticorpos na área da lesão arterial. Estes dados estão em concordância com estudos prévios (NICKELEIT; MIHATSCH, 2003; FALEIROS, 2009; COHEN et al., 2012). Da mesma forma, foi investigada a invasão da camada íntima vascular por células musculares lisas, pela presença do marcador HHF35 monoclonal. Este é um marcador específico para células musculares, mostrando a presença de anticorpos específicos contra músculo liso na área lesada pela angioplastia. Isto está em consonâncias com outros estudos (GOWN; TSUKADA; ROSS, 1986; O'BRIEN et al., 1991). A justificativa para o emprego das colorações imuno-histoquímicas, neste estudo, seria para avaliar a capacidade de ação de cada droga empregada em reduzir as reações imunológicas nas áreas angioplastadas.

5.2 Discussão dos resultados

Na variável primária, a diferença de média de hiperplasia miointimal foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre as médias dos grupos (Mo, Cz e SF), quando avaliada pela análise de variância ANOVA (*one way*) (Figura 6). Esta diferença mostrou melhor resposta ao tratamento pelo cilostazol, confirmada pelo teste Post Hoc (comparações múltiplas) – “Tukey”, conforme Figura 7. Este resultado está em acordo com outros estudos (MIN et al., 2007; TSAI et al., 2008; TAKIGAWA et al., 2010; TAKIGAWA et al., 2012; IIDA et al., 2013), que mostraram redução da hiperplasia intimal pelo emprego do cilostazol. Isto poderia ser explicado pela provável melhoria do fluxo sanguíneo, resultante da ação vasodilatadora do cilostazol e seu efeito anti-inflamatório, em conjunto com a melhora da função endotelial vascular e a inibição da proliferação das células musculares lisas vasculares.

Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa de hiperplasia miointimal entre os grupos tratados com a *Moringa oleifera* e o controle negativo, o soro fisiológico. Este resultado foi corroborado por estudo prévio (ROLIM, 2012), que não encontrou diferença significativa entre os grupos tratados com moringa e soro

fisiológico. Diferentemente desta pesquisa, em estudo recente, envolvendo ratos diabéticos (KUMAR GUPTA et al., 2013) tratados com *Moringa oleifera* por 24 semanas, foi mostrado inibição do espessamento da membrana basal, quando comparado com os ratos não diabéticos. Os resultados deste estudo poderiam ser explicados pelo provável período de tempo reduzido ou dose insuficiente da *Moringa oleifera*, empregada no tratamento. Além do mais, foi comparado extrato bruto das folhas desta planta com um princípio ativo purificado, o cilostazol.

A redução da hiperplasia miointimal pelo tratamento com a *Moringa oleifera* em coelhos, embora não tenha alcançado superioridade em números absolutos sobre o cilostazol, pelo provável período de tempo reduzido de tratamento neste estudo, também não houve inatividade sobre a hiperplasia. Houve sim, uma diferença entre os resultados, favorável ao cilostazol, mostrando que novos rumos se abrem para a pesquisa no campo das doenças cardiovasculares com os produtos da *Moringa oleifera*. Isto pode ser possível, uma vez que, estudos prévios (GHASI; NWOBODO; OFILI, 1999; MEHTA et al., 2003; CHUMARK et al., 2008), envolvendo a *Moringa oleifera* por períodos de tempo mais prolongados mostraram redução significativa da placa aterosclerótica e do espessamento intimal em carótidas de coelhos, alimentados com dieta hipercolesterolêmica, além de redução da dislipidemia.

Desse modo, a placa aterosclerótica em carótidas de coelho foi reduzida em 86% e o colesterol sérico reduzido em 52%, em um estudo com duração de 12 semanas (CHUMARK et al., 2008), o que pode sugerir elevado potencial para prevenir as doenças cardiovasculares. A diferença de média de hiperplasia favorável ao cilostazol, neste estudo, talvez pudesse ser justificada por ser o cilostazol um princípio ativo purificado, em que foi comparado com um extrato bruto da moringa, ou talvez pelo período de tempo reduzido deste estudo, para os princípios desta planta produzirem os efeitos desejados, sugerindo novos estudos com período mais prolongado para a confirmação da hipótese, desta investigação.

Nas variáveis secundárias, a avaliação da espessura da parede miointimal, entre os grupos estudados, mostrou maior redução de parede miointimal no grupo cilostazol, quando comparado com os grupos moringa e soro fisiológico, conforme Tabela 2. Isto demonstrou que o cilostazol, nesta pesquisa, reduziu a hiperplasia miointimal e, portanto, a espessura da parede miointimal. Estes dados concordam com estudos anteriores (TSAI et al., 2008; LEE et al., 2009; ITO et al., 2012; TAKIGAWA et al., 2012), que também identificaram redução de hiperplasia intimal e

da espessura de parede no grupo tratado com cilostazol, em comparação com o grupo controle. Assim, este estudo reproduziu o efeito do cilostazol semelhante aqueles estudos citados. Isto poderia ser explicado pela ação vasodilatadora e provável efeito antiproliferativo do cilostazol sobre as células musculares lisas.

Por outro lado, foi mostrado que a *Moringa oleifera* empregada pelo período de 12 semanas reduziu em 86% a espessura da placa aterosclerótica em carótida de coelhos com aterosclerose (CHUMARK et al., 2008). Talvez por falta de tempo de tratamento adequado para a ação da *Moringa oleifera*, neste estudo, tenha sido a causa principal do resultado obtido, uma vez que, o estudo referido, realizado em 12 semanas, mostrou redução importante da placa aterosclerótica.

Quando avaliada a diferença de médias de HDL, por análise de variância ANOVA (*two-way*), segundo os grupos (Mo, Cz e SF) apresentou diferença estatisticamente significativa: ($p > 0,0044$) (Figura 21), no grupo tratado com *Moringa oleifera*. Isto foi confirmado pelo teste “Tukey” de múltiplas variâncias, representado na Figura 22, mostrando aumento do HDL no grupo moringa. Este resultado concorda com estudos prévios (MEHTA et al., 2003; CHUMARK et al., 2008), que obtiveram resultados semelhantes, mostrando um efeito benéfico da *Moringa oleifera*, sugerindo a possibilidade de controle das doenças cardiovasculares pelos derivados desta planta.

Por outro lado, as diferenças de médias de colesterol total, triglicérides, LDL e VLDL, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p > 0$) entre os grupos, quando os coelhos foram tratados pela *Moringa oleifera*. Estes resultados concordam com estudo anterior (ROLIM, 2012), que não encontrou diferença significativa no perfil lipídico entre os grupos tratados com a *Moringa oleifera*. Diferentemente desta pesquisa, estudos prévios (GHASI; NWOBODO; OFILI, 1999; MEHTA et al., 2003; CHUMARK et al., 2008) demonstraram redução significativa de colesterol total, triglicérides, LDL e aumento do HDL em coelhos hipercolesterolêmicos, tratados com *Moringa oleifera*. A explicação, para os resultados deste estudo, poderia ser pela ausência da dieta hipercolesterolêmica durante o tratamento. Isto foi corroborado por Mehta et al. (2003), quando mostraram que a *Moringa oleifera* empregada em coelhos com dieta normal; sem acréscimo de colesterol, reduziu o HDL sérico. Assim, provavelmente, haveria diferença entre os grupos pela atuação da moringa ou cilostazol sobre estes componentes do lipidograma, na presença da dieta hipercolesterolêmica.

Quando avaliada a diferença de média de colesterol total nos grupos (Mo, Cz e SF) por análise de variância, ANOVA (*two way*), foi observada diferença estatisticamente significativa ($p=0,0043$), visto na Figura: 19. O teste Post Hoc de “Tukey” confirmou essas diferenças, conforme a Figura 20, mostrando resposta favorável ao tratamento com o cilostazol. Estes resultados estão em acordo com os achados (ITO et al.,2012) em coelhos hipercolesterolêmicos, tratados com cilostazol, quando reduziu o colesterol significativamente ($p<0,05$) e em pacientes com aterosclerose cerebral, espessamento intimal carotídeos e isquemia cerebral, tratados com cilostazol, mostrando redução significativa do colesterol (GENG et al., 2012; KIM et al., 2012; KIM et al., 2014). Esta ação do cilostazol poderia ser justificada pela provável melhora do metabolismo dos lipídeos.

Quando avaliada as diferenças de médias de triglicerídeo, LDL e de VLDL nos grupos (Mo, Cz e SF) por análise de variância, ANOVA (*two way*), não foram observadas diferença estatisticamente significativa do triglicerídeo ($p=0,0959$), do LDL ($p=0,06040$) e do VLDL ($p=0,04927$), conforme Figuras: 17, 23 e 25, respectivamente. O teste Post Hoc de “Tukey” confirmou estas diferenças, conforme as Figuras: 18, 24 e 26, respectivamente. Estes resultados estão em desacordo com os achados de Ito et al. (2012) em coelhos hipercolesterolêmicos e Geng et al. (2012) em pacientes com espessamento intimal carotídea, tratados com cilostazol, quando foi observada redução significativamente o triglicerídeo ($p<0,05$), além da redução significativa de LDL (KIM et al., 2014). Os resultados obtidos neste estudo, poderiam ser justificados pela ausência de dieta aterogênica durante o tratamento dos coelhos com as drogas.

A avaliação histológica e morfométrica pelo auxílio da coloração HE, permitiu o mensuramento da espessura da parede miointimal em cada grupo, de acordo com a Figura 3 e, quando avaliada a percentagem de parede, foi mostrado maior redução de espessura no grupo cilostazol, conforme Tabela 2. Estes dados concordam com os resultados de pesquisas prévias (CORTELEKOGLU et al., 2006; PAPADOPULOS et al., 2007), que utilizaram método semelhante para comparação dos grupos estudados, mostrando maior redução de hiperplasia nos grupos tratados com os fármacos comparados com os grupos controles. Estes resultados poderiam ser justificados pela ação efetiva dos fármacos empregados, mostrando superioridade sobre os outros grupos na redução da hiperplasia.

Na avaliação imuno-histoquímica, foi observada reação imunológica nas áreas das lesões arteriais pelo balão de angioplastia. Esta resposta dos anticorpos foi

evidenciada pelo marcador C4d, de coloração acastanhada, em todos os grupos, conforme a Figura 14. Porém, quando avaliados por análise de variância ANOVA (*one way*), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,0678$), visto na Figura 27 e confirmado pelo teste “Tukey”, mostrado na Figura 28. Estes dados discordam de outros estudos (NICKELEIT; MIHATSCH, 2003; FALEIROS, 2009) que mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e os controles. Estes resultados poderiam ser justificados pela dificuldade de interpretação dos padrões de coloração pela sensibilidade relativamente baixa do marcador C4d nas áreas de lesão, uma vez que, os tecidos foram fixados em formalina (NICKELEIT; MIHATSCH, 2003). No entanto, o seu emprego torna-se importante para avaliar a suscetibilidade de pacientes a determinado fármaco usado nos grupos tratados em comparação com os não tratados, conforme Cohen et al. (2012).

Da mesma forma, o marcador específico para músculo; HHF35 monoclonal esteve presente em todos os grupos, mostrado nas Figuras: 15 e 16, com invasão da camada íntima por células musculares lisas na maioria dos grupos, conforme a Figura 15. Porém, quando avaliados por análise de variância ANOVA (*one way*), não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,1975$) entre os grupos, mostrado na Figura 29 e confirmado pelo teste “Tukey”, na Figura 30. Os dados desta investigação concordam com estudos prévios (ASADA et al., 1996; GÜZELOĞLU et al., 2011; GUZELOGLU et al., 2012), que encontraram invasão da camada íntima por células musculares lisas. Porém, discordam dos estudos apresentados, que mostraram que os fármacos empregados reduziram a frequência de células musculares lisas na íntima estatisticamente significativa, quando comparado com o grupo controle. Os resultados, deste estudo, poderiam ser justificados pela provável redução de efeito dos fármacos empregados sobre a imunologia ou talvez por causa de dose do imunorreagente insuficiente ou ainda por baixa sensibilidade dos anticorpos ao corante empregado.

Neste estudo, de acordo com as técnicas histológicas, não houve um padrão uniforme de hiperplasia nas artérias, onde foi realizada a angioplastia, apresentando distribuição de hiperplasia em diferentes níveis nas camadas. Na camada íntima, mostrada nas Figuras: 8, 10, 13, 14, 15 e 16. Na média, a hiperplasia é visualizada na Figura 11. Em outras lâminas, a hiperplasia envolve as duas camadas juntas, mostradas nas Figuras: 9, 12 e 13, distribuídas de forma focal na circunferência da parede arterial. Diferente desta pesquisa, outros estudos (USUI et al., 1999;

CORTELEKOGLU et al., 2006) mostraram hiperplasia concêntrica, em toda a circunferência do vaso. Os resultados, deste estudo, poderiam ser explicados por provável período de tempo de tratamento reduzido entre a angioplastia e a eutanásia dos coelhos, conforme sugerido por Asada et al. (1996).

5.3 Implicações para a prática clínica

A dosagem e o tempo reduzidos de tratamento clínico da hiperplasia miointimal pela *Moringa Oleifera*, neste estudo, podem ter sido os responsáveis pelos resultados obtidos em números absolutos. Portanto, novas pesquisas, com o extrato desta planta, são necessárias; com doses variadas em período de tempo mais prolongado para confirmar a verdadeira eficácia esperada da *Moringa oleifera* sobre a hiperplasia miointimal e as doenças cardiovasculares.

Levando-se em consideração que foi empregado um extrato bruto das folhas da *Moringa oleifera* no tratamento da hiperplasia miointimal, comparado com um fármaco purificado; o cilostazol, que é um princípio ativo, então, não houve inatividade da *Moringa oleifera* sobre a hiperplasia. Houve sim, uma diferença na redução de espessura da parede miointimal, favorável ao cilostazol, o que deve ser investigada, cuidadosamente, por estudos bem controlados, para melhor conhecimento do efeito da *Moringa oleifera* sobre a hiperplasia miointimal.

5.4 Implicações para a pesquisa

A *Moringa oleifera* na dose empregada, neste estudo, para o tratamento da hiperplasia miointimal e o período de tempo reduzido mostraram que outras pesquisas, em animais de experimentação, deverão ser realizadas com dosagem variadas e maiores que a empregada, nesta pesquisa. Este estudo abriu um leque de possibilidades para novas pesquisas, envolvendo a *Moringa oleifera* em doses variadas e superiores a já empregada e, em períodos mais longos de tratamento para a descoberta do real valor da moringa no tratamento da hiperplasia miointimal. Desta forma, estudos prospectivos randomizados e bem controlados, envolvendo a *Moringa oleifera*, poderão alcançar sucesso na inibição da hiperplasia miointimal e controle das doenças cardiovasculares.

6 CONCLUSÕES

A diferença de média de hiperplasia miointimal na artéria ilíaca de coelhos com aterosclerose, tratados com *Moringa oleifera*, comparada com cilostazol, apresentou maior redução no grupo tratado com cilostazol.

A hiperplasia miointimal apresentou maior redução no grupo tratado com cilostazol.

O HDL foi aumentado pelo tratamento com a *Moringa oleifera* e o colesterol total foi reduzido pelo tratamento com o cilostazol.

REFERÊNCIAS

- AJIBADE, T. O.; AROWOLO, R.; OLAYEMI, F. O. Phytochemical screening and toxicity studies on the methanol extract of the seeds of moringa oleifera. **J. Complement. Integr. Med.**, Berkeley, v. 10, n. 1, p. 1-6, May, 2013.
- ANDERSON, P. G. Restenosis: animal models and morphometric techniques in studies of the vascular response to injury **Cardiovasc. Pathol.**, New York, v. 1, n. 4, p. 263-278 Oct.-Dec. 1992.
- ANWAR, F.; BHANGER, M. I. Analytical characterization of Moringa oleifera seed oil grown in temperate regions of Pakistan. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 51, n. 22, p. 6558-6563, Oct. 2003.
- ASADA, Y. et al. Effects of inflation pressure of balloon catheter on vascular injuries and subsequent development of intimal hyperplasia in rabbit aorta. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 121, n. 1, p. 45-53, Mar. 1996.
- ASIEDU-GYEKYE, I. J. et al. Micro- and Macroelemental Composition and Safety Evaluation of the Nutraceutical Moringa oleifera Leaves. **J. Toxicol.**, Cairo, v. 2014, p. 1-13, Jul. 2014.
- AWODELE, O. et al. Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of Moringa oleifera Lam. (Moringaceae). **J. Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 139, n. 2, p. 330-336, Jan. 2012.
- BAHNSON, E. S. et al. Nitric oxide inhibits neointimal hyperplasia following vascular injury via differential, cell-specific modulation of SOD-1 in the arterial wall. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 44, p. 8-17, Jan. 2015.
- BAKRE, A. G.; ADERIBIGBE, A. O.; ADEMOWO, O. G. Studies on neuropharmacological profile of ethanol extract of Moringa oleifera leaves in mice. **J. Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 149, n. 3, p. 783-789, Aug. 2013.
- BAUMGARTNER, H. R. The role of blood flow in platelet adhesion, fibrina deposition, and formation of mural thrombi. **Microvasc. Res.**, New York, v. 5, n. 2, p. 167-179, Mar. 1973.
- BIREME. Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. Biblioteca Virtual em Saúde. **DeCS-Descritores em Ciências da Saúde 2011**. São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://decs.bvs.br/P/decs2011p.htm>>. Acesso em: set. 2011.
- _____. **DeCS-Descritores em Ciências da Saúde 2014**. São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://decs.bvs.br/P/decs2014p.htm>>. Acesso em: fev. 2014.

BOCAN, T. M. et al. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 9-22, Aug. 1993.

BRASSELET, C. et al. Effect of local heating on restenosis and in-stent neointimal hyperplasia in the atherosclerotic rabbit model: a dose-ranging study. **Eur Heart J.**, London, v. 29, n. 3, p. 402-412, Feb. 2008.

CARVALHO, F. B. **Influência da idade, da linhagem, do sistema e do tempo de conservação na qualidade interna e da casca de ovos comerciais** 2003. 40 f. Monografia (Especialização em Zootecnia) - Escola de Veterinária Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2003.

CHISOLM, G. M.; STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v. 28, n. 12, p. 1815-1826, Jun. 2000.

CHUMARK, P. et al. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. **J. Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 116, n. 3, p. 439-446, Mar. 2008.

COHEN, D. et al. Pros and cons for C4d as a biomarker. **Kidney Int.**, New York, v. 81, n. 7, p. 628-639, Apr. 2012.

CORTELEKOGLU, T. et al. The effects of clopidogrel and calcium dobesilate on intimal hyperplasia following vascular injury. **Acta Chir. Belg.**, Bruxelles, v. 106, n. 2, p. 206-210, Mar.-Apr. 2006.

COSTA, R. F. B.; FAGUNDES, D. J. Modelos experimentais de hiperplasia intimal: efeitos da radiação ionizante **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 189-193, May, 2002.

DAVIES, M. G. Hiperplasia da íntima: resposta básica à lesão e reconstrução do enxerto arterial e venoso. In: RUTHERFORD, R. B. (Ed.). **Cirurgia vascular**. Rio de Janeiro: DiLivro, 2007. v. 1, p.149-172.

DE MEYER, G. R.; BULT, H. Mechanisms of neointima formation--lessons from experimental models. **Vasc. Med.**, London, v. 2, n. 3, p. 179-189, 1997.

FAIZI, S. et al. Hypotensive constituents from the pods of *Moringa oleifera*. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 64, n. 3, p. 225-228, Apr. 1998.

FALEIROS, A. C. G. **Detecção de complemento - C4d em capilares peritubulares e análise morfológica de biópsias de enxerto renal**. 2009. 87 f. Tese (Doutorado em Patologia Geral) - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2009.

FERRER, M. D. et al. The rabbit as an experimental model: technique for the induction of vascular lesions and incidents. **Radiologia**, Madrid, v. 52, n. 1, p. 45-50, Jan.-Feb. 2010.

- FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, Baltimore, v. 18, n. 6, p. 499-502, Jun. 1972.
- GARDNER, M. J.; ALTMAN, D. J. **Estatistic with confidence**: confidence intervals and statistical guidelines. London: BMJ Publishing Group, 1989.
- GELLMAN, J. et al. Effect of lovastatin on intimal hyperplasia after balloon angioplasty: a study in an atherosclerotic hypercholesterolemic rabbit. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 17, n. 1, p. 251-259, Jan. 1991.
- GENG, D. F. et al. Effect of cilostazol on the progression of carotid intima-media thickness: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 220, n. 1, p. 177-183, Jan. 2012.
- GHASI, S.; NWOBODO, E.; OFILI, J. O. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 69, n. 1, p. 21-25, Jan. 1999.
- GOWN, A. M.; TSUKADA, T.; ROSS, R. Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 125, n. 1, p. 191-207, Oct. 1986.
- GUZELOGLU, M. et al. Effect of tadalafil on neointimal hyperplasia in a rabbit carotid artery anastomosis model. **Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, Tokyo, v. 19, n. 6, p. 468-474, Dec. 2013
- GÜZELOĞLU, M. et al. The effects of zoledronic acid on neointimal hyperplasia: a rabbit carotid anastomosis model. **Anadolu Kardiyol. Derg.**, Cağaloğlu, v. 11, n. 2, p. 93-100, Mar 2011.
- GUZELOGLU, M. et al. The effects of PPAR γ agonist rosiglitazone on neointimal hyperplasia in rabbit carotid anastomosis model **J. Cardiothorac. Surg.**, London, v. 7, p. 57, Jun. 2012.
- HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. Procedimentos clínicos. In: HARKNESS, J. E. (Ed.). **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. 3. ed. São Paulo: Roca, 1993. p. 57-85.
- HEHRLEIN, C. et al. Pure beta-particle-emitting stents inhibit neointima formation in rabbits. **Circuiontat**, Dallas, v. 93, n. 4, p. 641-645, Feb. 1996.
- HUSSAIN, S.; MALIK, F.; MAHMOOD, S. Review: an exposition of medicinal preponderance of *Moringa oleifera* (Lank.). **Pak. J. Pharm. Sci.**, Karachi, v. 27, n. 2, p. 397-403, Mar. 2014.
- IIDA, O. et al. Cilostazol reduces angiographic restenosis after endovascular therapy for femoropopliteal lesions in the Sufficient Treatment of Peripheral Intervention by Cilostazol study. **Circulation**, Dallas, v. 127, n. 23, p. 2307-2315, Jun. 2013.

ITO, H. et al. Cilostazol inhibits accumulation of triglyceride in aorta and platelet aggregation in cholesterol-fed rabbits. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 6, p. e39374, 2012.

JALDIN, R. G. et al. Atherosclerotic lesion formation in rabbits fed on egg yolk-supplemented diet: an inexpensive experimental model. **J. Vasc. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 4, p. 247-256, Dec. 2006.

KALIORA, A. C.; DEDOISSIS, G. V.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 187, n. 1, p. 1-17, Jul. 2006.

KIM, D. E. et al. Association between changes in lipid profiles and progression of symptomatic intracranial atherosclerotic stenosis: a prospective multicenter study. **Stroke**, Dallas, v. 43, n. 7, p. 1824-1830, Jul. 2012.

KIM, J. H. et al. Probucol plus cilostazol attenuate hypercholesterolemia-induced exacerbation in ischemic brain injury via anti-inflammatory effects. **Int. J. Mol. Med.**, Athens, v. 34, n. 3, p. 687-694, Sep. 2014.

KUMAR GUPTA, S. et al. Retinoprotective effects of *Moringa oleifera* via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-angiogenic mechanisms in streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Ocul. Pharmacol. Ther.**, New York, v. 29, n. 4, p. 419-426, May, 2013.

LAFONT, A. et al. Restenosis after experimental angioplasty. Intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodeling. **Circ. Res.**, Dallas, v. 76, n. 6, p. 996-1000, Jun. 1995.

LAMBOLE, V.; KUMAR, U. Phytochemicals and acute toxicity of *moringa oleifera* barks in rats. **Int. J. Biomed. Res.**, Maharashtra, v. 2, n. 10, p. 548-53, 2011.

LARSON, K. et al. Hematoxylin and eosin tissue stain in Mohs micrographic surgery: a review. **Dermatol. Surg.**, New York, v. 37, n. 8, p. 1089-1099, Aug. 2011.

LEE, K. M. et al. Cilostazol inhibits high glucose-and angiotensin II-induced type 1 plasminogen activator inhibitor expression in artery wall and neointimal region after vascular injury. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 207, n. 2, p. 391-398, Dec. 2009.

LEHNINGER, C. M.; NENSON, D. L. **Lehninger**: princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: Servier, 2002. 282 p.

LIU, M. W.; ROUBIN, G. S.; KING, S. B. R. Restenosis after coronary angioplasty potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. **Circulation**, Dallas, v. 79, n. 6, p. 1374-1387, Jun. 1989

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. **J. Agric. Sci.**, Cambridge, v. 128, n. 3, p. 311-322, 1997.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 4, p. 469-486, Dec. 2003.

MASSON, P. Some histological methods: trichrome stainings and their preliminary technique. **J. Techn. Methods**, v. 12, p. 75-90, 1929.

MEHTA, K. et al. Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. **J. Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 86, n. 2-3, p. 191-195, Jun. 2003.

MIN, P. K. et al. Effect of cilostazol on in-stent neointimal hyperplasia after coronary artery stenting: a quantitative coronary angiography and volumetric intravascular ultrasound study **Circ. J.**, Kyoto, v. 71, n. 11, p. 1685-1690, Nov. 2007.

MOYO, B. et al. Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera* leaves/sunflower seed cake. **Meat. Sci.**, Barking, v. 91, n. 4, p. 441-447, Aug. 2012.

NEWBY, A. C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. **Cardiovasc. Res.**, London, v. 69, n. 3, p. 614-624, Feb. 2006.

NICKELEIT, V.; MIHATSCH, M. J. Kidney transplants, antibodies and rejection: is C4d a magic marker? **Nephrol. Dial. Transplant.**, Oxford, v. 18, n. 11, p. 2232-2239, Nov. 2003.

NOGUEIRA, M. R. S. **Diferença de média de hiperplasia médio-intimal pós angioplastia na artéria ilíaca de coelhos tratados com estrato seco de curcuma longa**. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Cirúrgicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

NUNES, G. L.; ALFONSO, T.; OLIVEIRA, A. T. Reestenose coronária: fisiopatologia e epidemiologia. **Rev. Bras. Cardiol. Ivans.**, Brasília, DF, v. 12, n. 4, p. 178-184, 2004.

O'BRIEN, K. et al. Probucol treatment affects the cellular composition but not anti-oxidized low density lipoprotein immunoreactivity of plaques from Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v. 11, n. 3, p. 751-759, 1991.

PAPADOPULOS, F. et al. Common tasks in microscopic and ultrastructural image analysis using Image J. **Ultrastruct. Pathol.**, New York, v. 31, n. 6, p. 401-407, 2007.

PARK, S. J. et al. A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 348, n. 16, p. 1537-1545, Apr. 2003.

PLATE, G. et al. Effect of platelet inhibitors on platelet and fibrin deposition following transluminal angioplasty of the atherosclerotic rabbit aorta. **Eur. J. Vasc. Surg.**, London, v. 3, n. 2, p. 127-133, Apr. 1989.

ROLIM, J. C. **Diferença de hiperplasia médio intimal em coelhos submetidos a angioplastia e tratados com moringa oleífera**. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Cirúrgicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

ROSENBAUM, M. A. et al. Antioxidant therapy reverses impaired graft healing in hypercholesterolemic rabbits. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v. 51, n. 1, p. 184-193, Jan. 2010.

ROSS, A. C.; MINICK, C. R.; ZILVERSMIT, D. B. Equal atherosclerosis in rabbits fed cholesterol-free, low-fat diet or cholesterol-supplemented diet. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 301-305, 1978.

SAHAKITPICHAN, P. et al. Unusual glycosides of pyrrole alkaloid and 4'-hydroxyphenylethanamide from leaves of *Moringa oleifera*. **Phytochemistry**, London, v. 72, n. 8, p. 791-795, Jun. 2011.

SANTIS-ISOLAN, P. M. B. **Enxerto homólogo congelado de diafragma na correção dos defeitos da parede abdominal de ratos**. 2009. 158 f. Tese (Doutorado em Ciência da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009).

SANTOS, A. F. S. **Moléculas bioativas de Moringa oleifera: detecção, isolamento e caracterização**. 2007. 112 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

SANTOS, J. A. B. **Estudo da aterosclerose induzida por diferentes tipos de dieta hiperlipídica em coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*)** 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológica e Saúde) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 51, n. 8, p. 2144-2155, Apr. 2003

STERPETTI, A. V. et al. Progression and regression of myointimal hyperplasia in experimental vein grafts depends on platelet-derived growth factor and basic fibroblastic growth factor production. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v. 23, n. 4, p. 568-575, Apr. 1996

TABELA Brasileira de Composição de Alimentos: TACO 2011. 4. ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011. Disponível em:
<http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada>. Acesso em:

TAKIGAWA, T. et al. Cilostazol reduces restenosis after carotid artery stenting. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v. 51, n. 1, p. 51-56, Jan. 2010.

TAKIGAWA, T. et al. Cilostazol suppression of arterial intimal hyperplasia is associated with decreased expression of sialyl Lewis X homing receptors on mononuclear cells and E-selectin in endothelial cells. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v. 55, n. 2, p. 506-516, Feb. 2012.

TSAI, C. S. et al. Cilostazol attenuates MCP-1 and MMP-9 expression in vivo in LPS-administrated balloon-injured rabbit aorta and in vitro in LPS-treated monocytic THP-1 cells. **J. Cell. Biochem.**, New York, v. 103, n. 1, p. 54-66, Jan. 2008.

TSUCADA, T. et al. Immunocytochemical analysis of the atherosclerotic lesion. **Jpn. Circ. J.**, Kyoto, v. 55, n. 10, p. 996-1002, Oct. 1991.

USUI, M. et al. Photodynamic therapy for the prevention of intimal hyperplasia in balloon-injured rabbit arteries. **Jpn. Circ. J.**, Kyoto, v. 63, n. 5, p. 387-393, May, 1999.

VAN CRAEYVELD, E. et al. A critical reassessment of murine and rabbit models of atherosclerosis: focus on lesion progression and remodelling. **Acta Cardiol.**, Bruxelles, v. 67, n. 1, p. 11-21, Feb. 2012.

VERHOEFF, F. H. Some new staining methods of wide applicability; including artpid differential stain for glastic tissue. **JAMA**, Chicago, v. 50, n. 11, p. 876-7, Mar. 1908.

VIEIRA, S. Metodologia científica para a área de saúde. In: (Ed.). São Paulo: Sarvier, 1984. p. 98.

WEI, G. L. et al. Temporally and spatially coordinated expression of cell cycle regulatory factors after angioplasty. **Circ. Res.**, Baltimore, v. 80, n. 3, p. 418-426, Mar 1997.

WISSOWZKY, A. Ueber das Eosin als reagenz auf Hämoglobin und die Bildung von Blutgefässen und Blutkörperchen bei Säugetier und Hühnerembryonen. **Archiv für mikroskopische Anatomie.**, v. 13, p. 479-496, 1876.

XU, H.; SHI, D.; CHEN, K. Atherosclerosis: an integrative East-west medicine perspective. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, Oxford, v. 2012, p. 4, Apr. 2012.

ANEXOS

ANEXO A – Patente modelo de utilidade (Mu)



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 20 2012 017634-9 U2

(22) Data de Depósito: 10/07/2012
(43) Data da Publicação: 20/05/2014
(RPI 2263)



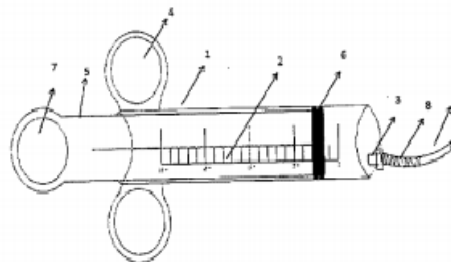
(51) Int.Cl.:
A61M 3/00

(54) Título: INJETOR MANUAL COM CÂNULA MALEÁVEL PARA GAVAGEM DE LÍQUIDOS E PASTOSOS A COELHOS EM PESQUISA DE LABORATÓRIO

(73) Titular(es): Francisco Chavier Vieira Bandeira, Rafael Nóbrega Bandeira

(72) Inventor(es): Francisco Chavier Vieira Bandeira, Rafael Nóbrega Bandeira

(57) Resumo: INJETOR MANUAL COM CÂNULA MALEÁVEL PARA GAVAGEM DE LÍQUIDOS E PASTOSOS A COELHOS EM PESQUISA DE LABORATÓRIO. O registro do dispositivo para administração de drogas líquidas ou pastosas por gavagem a coelhos em pesquisa de laboratório. Caracteriza-se por um cilindro reto, de forma geométrica de um cone reto com duas empunhaduras em anéis na extremidade proximal e um bico ejetor na extremidade distal. Um êmbolo cilíndrico reto com uma empunhadura em anel na extremidade distal para vedação e imulsão do conteúdo dentro do cilindro por manipulação manual. E ainda uma cânula de silicone com uma lâmina de aço trançada no terço proximal e maleável nos dois terços distais.



**ANEXO B – Protocolo nº 0512/09 do Comitê de Ética em Pesquisa do
Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal
da Paraíba**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

CERTIDÃO

João Pessoa, 19 de janeiro de 2009
CEPA N.º. 0512/09

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisadores: Prof. Guilherme Benjamin Brandão Pitta. Doutorando: Francisco Chavier Vieira Bandeira.

Departamento/Setor: LTF.

Ref.: A diferença de frequência de hiperplasia intimal pós-angiosplastia na artéria ilíaca de coelhos com aterosclerose experimental tratados com extrato aquoso das folhas da *Moringa oleifera* comparados aos tratados com simvastatina.

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU e APROVOU** a execução do projeto acima.

Atenciosamente,


Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB.

ANEXO C – Protocolo n. 64-A do Comitê em Pesquisa da Universidade de Ciências da Saúde de Alagoas - UNCISAL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE ALAGOAS – UNCISAL
Transformada pela lei nº 6.860 de 28 de dezembro de 2005
Campus Governador Lamerda Filho
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UNCISAL
Rua Jorge de Lima 113, Trapiche do Sítio,
Cep 57.010.500 – Maceió-AL

Protocolo Nº 64-A

Título: "A diferença de frequência de hiperplasia intimal pós-angioplastia na artéria ilíaca de coelhos com aterosclerose experimental tratados com extrato aquoso das folhas de Moringa oleifera comparados aos tratados com simvastatina"

Pesquisador Responsável: Francisco Chavier Vieira Bandeira


Maceió, 05 de abril de 2010

Sr(a). Pesquisador(a),

Conforme deliberação em plenária ordinária do CEP/UNCISAL ocorrida no dia 31/03/10 foi de consenso a aprovação do protocolo nº 64-A, intitulado: "A diferença de frequência de hiperplasia intimal pós-angioplastia na artéria ilíaca de coelhos com aterosclerose experimental tratados com extrato aquoso das folhas de Moringa oleifera comparados aos tratados com simvastatina", podendo a pesquisa ser iniciada.

Nesta oportunidade, lembramos que o pesquisador tem o dever de durante a execução do experimento, manter o CEP informado através do envio a cada seis meses, de relatório substanciado acerca da pesquisa, seu desenvolvimento, bem como qualquer alteração, problema ou interrupção da mesma.

Atenciosamente,


GRACILIANO RAMOS ALENCAR DO NASCIMENTO
Coordenador do CEP

cep-uncisal@hotmail.com - tel: (82) 3315-6787

ANEXO D – Termo de responsabilidade e compromisso do pesquisador responsável

Eu, Francisco Chavier Vieira Bandeira, pesquisador responsável pelo projeto “A diferença de média de hiperplasia miointimal pós-angioplastia na artéria ilíaca de coelhos com aterosclerose induzida tratados com extrato etanólico das folhas da *Moringa oleifera* comparados com cilostazol”, declaro estar ciente e que cumprirei os termos da Resolução 196 de 09/10/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde e declaro:

1. Assumir o compromisso de zelar pela privacidade e sigilo das informações;
2. Tornar os resultados desta pesquisa pública seja eles favoráveis ou não; e
3. Comunicar ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL) sobre qualquer alteração no projeto de pesquisa, nos relatórios semestrais ou por meio de comunicação protocolada, que me forem solicitadas.

Maceió, 21 de fevereiro de 2010.

ANEXO E – Termo de responsabilidade do orientador

Eu, Guilherme Benjamin Brandão Pitta, orientador do pesquisador Francisco Chavier Vieira Bandeira do projeto “A diferença de média de hiperplasia miointimal pós-angioplastia na artéria ilíaca de coelhos com aterosclerose induzida tratados com extrato etanólico das folhas da *Moringa oleifera* comparado com cilostazol” declaro estar ciente e que cumprirei os termos da Resolução 196 de 09/10/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

Maceió, 21 de fevereiro de 2010.



Orientador

ANEXO F – Termo de responsabilidade do biotério

Eu, José Crispim Duarte, responsável pelo biotério do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba, Campus I, declaro estar ciente das normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA, em 1991, sobre os Princípios Éticos na Experimentação Animal e que o nosso biotério tem condições de aceitar a realização do projeto de pesquisa “A diferença de média de hiperplasia miointimal após angioplastia na artéria ilíaca de coelhos com aterosclerose induzida tratados com extrato etanólico das folhas da moringa oleifera comparado com cilostazol”..

João Pessoa – PB, 20 de março de 2010



Jose Crispim Duarte
Biotério / LTF / UFPB
Mat. 330609

Responsável pelo Biotério do LTF/UFPB

Mat. 330609

ANEXO G – Termo de responsabilidade da instituição:

O LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA após aprovação dos comitês de éticas em pesquisa animal aprovou a execução desta pesquisa.

	UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
CERTIDÃO	
João Pessoa, 19 de janeiro de 2009 CEPA N.º 0512/09	
Ilmo(a). Sr(a). Pesquisadores: Prof. Guilherme Benjamin Brandão Pitta. Doutorando: Francisco Chavier Vieira Bandeira. Departamento/Setor: LTF Ref.: A diferença de frequência de hiperplasia intimal pós-angioplastia na artéria ilíaca de coelhos com aterosclerose experimental tratados com extrato aquoso das folhas da <i>Moringa oleifera</i> comparados aos tratados com simvastatina.	
O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, ANALISOU e APROVOU a execução do projeto acima.	
Atenciosamente,  Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB	
<small>LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA • UFPB • CAIXA POSTAL 5001 • CEP 58051-970 JOÃO PESSOA • PARAÍBA • BRASIL • FAX: (081) 216-7502 - 216-7511 FONE: (081) 216-7173 - 216-7125 • Home Page: http://www.ltf.ufpb.br</small>	

ANEXO H – Formulário de Coleta de dados

A - IDENTIFICAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS POR SEMANA

Tratamento	Coelho	Peso (g)/Data				
		Data 1	Data 2	Data 3	Data 4	Data 5
Moringa Oleifera						
Cilostazol						
Soro Fisiológico						

B - ANGIOPLASTIA FEMORAL DIREITA

Data da cirurgia: _____ Coelho: _____

Eventos:

1. Isquemia do membro _____ () Sim () Não data: _____
2. Perda do membro _____ () Sim () Não data: _____
3. Fístula arteriovenosa _____ () Sim () Não data: _____
4. Hematoma ou equimose ____ () Sim () Não data: _____
5. Infecção _____ () Sim () Não data: _____
6. Hemorragia _____ () Sim () Não data: _____
7. Morte _____ () Sim () Não data: _____

C - NÍVEIS LIPÍDICOS:

Coelho	Tratamento	Níveis Lipídicos	Data	
			Data da cirurgia	Data da eutanásia
		HDL		
		LDL		
		VLDL		
		Colesterol Total		
		Triglicerídeo		

D - ACHADOS HISTOLÓGICOS

Coelho: _____

Histologia

- | | | | |
|------------------------------|---------|---------|-------------|
| 1. Oclusão do vaso por placa | () Sim | () Não | data: _____ |
| 2. Diminuição da placa | () Sim | () Não | data: _____ |
| 3. Trombose | () Sim | () Não | data: _____ |
| 4. Aumento da Placa | () Sim | () Não | data: _____ |
| 5. Hiperplasia intimal | () Sim | () Não | data: _____ |
| 6. Espessura da placa | () Sim | () Não | data: _____ |
| 7. Células espumosas | () Sim | () Não | data: _____ |

ANEXO I – Execução laboratorial do Lipidograma

A execução dos Triglicérideo, Colesterol Total, HDL, LDL e VLDL foram realizados pelo método de calorimetria do Kit LABTEST exposto a seguir:

TRIGLICÉRIDES Liquiform

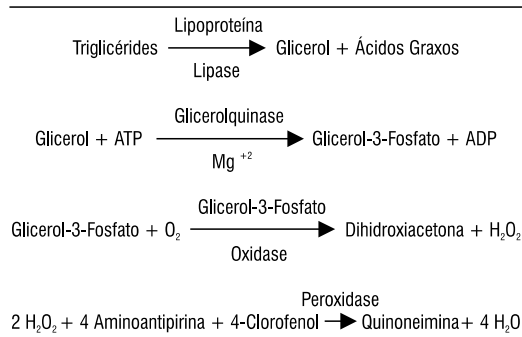
Instruções de Uso

Ref.: 87
MS 10009010070

Finalidade . Sistema enzimático para determinação dos triglicérides por reação de ponto final em amostras de soro ou plasma (EDTA).

[Somente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio¹⁻⁵ . Os triglicérides são determinados de acordo com as seguintes reações:



A lipoproteína lipase promove a hidrólise dos triglicérides liberando glicerol, que é convertido, pela ação da glicerolquinase, em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina que tem máximo de absorvância em 505 nm.

A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração dos triglicérides na amostra.

Características do sistema . Triglicérides Liquiform utiliza metodologia colorimétrica enzimática que confere boa reprodutibilidade e grande especificidade ao sistema.

O reagente é disponibilizado sob a forma líquida, facilitando assim sua aplicação e eliminando a possibilidade de se introduzir erros durante as preparações de reagentes.

A necessidade de se repetir o teste em amostras de valores elevados é minimizada pela grande linearidade do sistema que se estende até 1100 mg/dL.

Os dados de repetitividade e reprodutibilidade obtidos com o sistema Triglicérides Liquiform demonstram que o método é capaz de fornecer resultados que superam as metas de desempenho para as medidas dos triglicérides estabelecidas pelo National Cholesterol Education Program (NCEP). A comparação entre as imprecisões encontradas na repetitividade e na reprodutibilidade demonstra que o sistema de medição é bastante robusto nas regiões de concentrações significativas para uso clínico, indicando que tem um desempenho muito estável no dia a dia.

O sistema é facilmente aplicável a analisadores automáticos e semi-automáticos capazes de medir com exatidão a absorvância em 505 nm.

Metodologia . Enzimático-Trinder⁶.

Reagentes:

1. [REACT] - Reagente 1 - Armazenar entre 2 - 8 °C.

Contém tampão 50 mmol/L, pH 7,0; íons magnésio 4 mmol/L; 4-clorofenol 2,70 mmol/L; 4-aminoantipirina 300 µmol/L; ATP 1,8 mmol/L; lipoproteína lipase ≥1400 U/L; glicerolquinase ≥1000 U/L; glicerolfosfato oxidase ≥1500 U/L; peroxidase ≥900 U/L e azida sódica 0,095%.

Para preservar o desempenho, o reagente deve permanecer fora da geladeira somente o tempo necessário para se obter o volume a ser utilizado. Evitar exposição à luz solar direta. **O reagente apresenta uma tonalidade amarelada.**

2. [CAL] - Padrão - Armazenar entre 2 - 30 °C.

Contém triglicérides 200 mg/dL e azida sódica 0,045%. Após o manuseio armazenar bem vedado para evitar evaporação.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução do tempo de estabilidade.

Precauções e cuidados especiais

Para preservar o desempenho, os reagentes devem permanecer fora da geladeira somente o tempo necessário para se obter o volume a ser utilizado. Evitar exposição à luz solar direta.

Não utilizar o Reagente 1 quando sua absorvância medida contra água em 505 nm for igual ou maior que 0,300 ou quando mostrar-se turvo ou com sinais de contaminação. **O reagente apresenta uma tonalidade amarelada.**

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação dos reagentes.

Os reagentes contêm azida sódica que é tóxica. Deve-se tomar cuidado para evitar a ingestão e no caso de contato com os olhos deve-se lavar imediatamente com grande quantidade de água e procurar auxílio médico.

A azida pode formar compostos altamente explosivos com tubulações de chumbo e cobre. Utilizar grandes volumes de água para descartar os reagentes.

Material necessário e não fornecido

1. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
2. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorvância entre 490 e 520 nm.
3. Pipetas para medir amostras e reagente.
4. Cronômetro.

Influências pré-analíticas^{5,7,8}. Como a concentração de triglicérides é influenciada por hábitos dietéticos recentes, como consumo de álcool e por variações do peso corporal e exercício físico, os valores dos triglicérides em um mesmo indivíduo são bastante variáveis. Os dados obtidos dentro de um mês, usando um método com CV analítico de 3,0%, mostraram que a variação biológica pode ser maior que 90% da variação intra-individual total. Mesmo nos estados de jejum, ocorre considerável variação biológica, podendo mostrar diferenças de 21% em medições repetidas no mesmo indivíduo.

Na ausência de jejum a concentração plasmática dos triglicérides modifica-se consideravelmente no mesmo indivíduo apresentando diferenças de até 1000%.

Amostras colhidas com heparina podem fornecer resultados falsamente diminuídos.

Obter a amostra com o paciente assentado. O torniquete não deve ser mantido por tempo maior que um minuto. Liberar o torniquete antes de aspirar o sangue.

A contaminação do material utilizado ou da amostra com glicerol fornece valores falsamente elevados. Assim, os resultados obtidos em pacientes recebendo alimentação parenteral devem ser interpretados com cautela porque esta alimentação contém elevados teores de glicerol.

Níveis elevados de ácido ascórbico (vitamina C) produzem interferências negativas por competição com o cromogênio na reação da peroxidase. Se houver suspeita da presença de ácido ascórbico, deixar o soro em repouso durante 90 minutos antes de iniciar a dosagem para evitar resultados de triglicérides falsamente diminuídos. Este procedimento minimiza os valores de ácido ascórbico, podendo não ser eficiente caso a concentração deste esteja elevada na amostra.

Amostra

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para colheita, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

A amostra de sangue deve ser obtida após jejum de 12-14 horas. Deve-se enfatizar ao paciente a necessidade do jejum no tempo recomendado. A falta de padronização nas colheitas das amostras para a dosagem dos triglicérides tem gerado enormes conflitos entre pacientes, médicos clínicos e os laboratórios, porque, em muitos casos, não se toma o cuidado de enfatizar aos pacientes a necessidade do jejum de 12-14 horas antes da colheita da amostra.

Usar soro ou plasma com EDTA. O analito é estável por dois dias entre 2 - 8 °C. O armazenamento prolongado da amostra não é recomendado. Os triglicérides podem ser hidrolisados, liberando glicerol, o que leva à obtenção de resultados falsamente diminuídos quando o ensaio utiliza branco para eliminar a interferência do glicerol livre.

A heparina promove a ativação in vivo ou in vitro da lipoproteína lipase, fazendo com que a concentração dos triglicérides se reduza gradativamente em amostras contendo heparina. Este fenômeno ocorre também em amostras de soro obtidas em pacientes recebendo doses terapêuticas de heparina.

Estas orientações para obtenção e conservação da amostra estão padronizadas segundo as recomendações do NCEP⁹.

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras de sangue não transmitem infecções, todas elas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las, deve-se seguir as normas estabelecidas para Biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico, sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

Valores de Bilirrubina até 10 mg/dL e Hemoglobina até 200 mg/dL não produzem interferências significativas. Valores de bilirrubina maiores que 10 mg/dL produzem resultados falsamente diminuídos.

Devido ao rápido consumo do oxigênio do meio, pode-se obter resultados de triglicérides normais em amostras fortemente lipêmicas (triglicérides superior a 2000 mg/dL). Deste modo, deve-se diluir essas amostras 1:10 (1 parte de amostra e 9 partes de NaCl 150 mmol/L), antes da realização do teste¹⁰.

Para avaliar a concentração aproximada da hemoglobina em uma amostra hemolisada pode-se proceder do seguinte modo: Diluir 0,05 mL da amostra em 2,0 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) e medir a absorvância em 405 ou 415 nm, acertando o zero com água deionizada ou destilada.

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} \approx \text{Absorbância}_{405} \times 601$$

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} \approx \text{Absorbância}_{415} \times 467$$

Procedimento

Separar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	----	0,01 mL	----
Padrão	----	----	0,01 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar em banho maria a 37 °C durante 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 505 nm ou filtro verde (490 a 520), acertando o zero com o branco. A cor é estável 60 minutos.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente, sem prejuízo para o desempenho do teste, mantendo-se inalterado o procedimento de cálculo. Em caso de redução dos volumes, é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes de amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

Cálculos . Ver linearidade

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 200$$

Exemplo:

Absorbância do Teste = 0,174
Absorbância do Padrão = 0,244

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = \frac{0,174}{0,244} \times 200 = 143$$

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia, pode-se utilizar o método do fator.

$$\text{Fator de Calibração} = \frac{200}{\text{Absorbância do Padrão}}$$

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = \text{Absorbância do Teste} \times \text{Fator}$$

Exemplo:

$$\text{Fator} = \frac{200}{0,244} = 820$$

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = 0,174 \times 820 = 143$$

Calibração . O padrão é rastreável ao Standard Reference Material (SRM) 1951 do National Institute of Standards and Technology (NIST).

Calibrações manuais

Obter o fator de calibração ao usar novo lote de reagentes e quando o controle interno da qualidade indicar.

Sistemas automáticos

Branco de reagentes: água ou solução de cloreto de sódio 150 mmol/L (0,85%);

Usar calibrador da linha Calibra - Labtest. A concentração de Triglicérides no calibrador é rastreável ao SRM 1951 do NIST.

Frequência de calibrações

Calibração de 2 pontos ao mudar de lote;

Calibração de 2 pontos quando o controle interno da qualidade indicar.

Linearidade

O resultado da medição é linear até 1100 mg/dL. Para valores maiores, diluir a amostra com NaCl 150 mmol/L (0,85%), realizar nova medição e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

Controle interno da qualidade . O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações da qualidade e limites de controle, ações corretivas e registro das atividades. Materiais de controle devem ser utilizados para avaliar a imprecisão e/ou desvios da calibração. Sugere-se procurar atender como limites máximos de controle as especificações propostas pelo NCEP¹¹ para coeficiente de variação $\leq 5,0\%$, erro sistemático (bias) $\leq 5,0\%$ e erro total $\leq 15,0\%$ ¹².

Sugere-se utilizar as preparações estabilizadas da linha Qualitrol - Labtest para controle interno da qualidade em ensaios de química clínica.

Valores desejáveis ou recomendados . São valores que substituem os valores de referência. Foram determinados a partir de dados epidemiológicos tratados estatisticamente e estabelecem a concentração de triglicérides como fator de risco independente para doença coronariana isquêmica¹³.

Triglicérides (mg/dL)	
Desejável	<150
Limiar Alto	150 - 199
Elevado	200 - 499
Muito Elevado	>500

Valores desejáveis ou recomendados pediátricos¹⁴

	Triglicérides (mg/dL)	
	<10 anos	10 a 19 anos
Desejável	≤ 100	≤ 130
Elevado	>100	>130

Conversão: Unidades Convencionais (mg/dL) $\times 0,0113$ = Unidades SI (mmol/L).

Características do desempenho¹⁵

Estudos de recuperação . A recuperação foi obtida utilizando diluições de amostras com valores elevados de triglicérides. As recuperações variaram entre 100 e 102%. O erro sistemático proporcional médio obtido em um valor de 200 mg/dL é igual a 4 mg/dL ou 2%.

Comparação de métodos . O método proposto foi comparado com um método similar utilizando 40 amostras de soro com valores situados entre 38 e 652 mg/dL medidas em duplicata. A comparação resultou na equação da regressão: $y = 1,035x - 1,4$ e um coeficiente de correlação (r) igual a 0,998. O erro sistemático total (constante e proporcional) verificado no nível de decisão (200 mg/dL) é igual a 7,0 mg/dL ou 3,5%. O erro total no mesmo nível de decisão é 5,0%.

Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e pacientes hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada e atende aos requisitos especificados pelo NCEP⁹.

Estudos de precisão . Os estudos de precisão foram realizados no sistema Labtest/Labmax 240[®], utilizando amostras com concentrações iguais a 151, 197 e 412 mg/dL.

Repetitividade - Imprecisão intra-ensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	80	151	1,59	1,06
Amostra 2	80	197	2,59	1,31
Amostra 3	80	412	4,30	1,04

Reprodutibilidade - Imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	80	151	2,89	1,92
Amostra 2	80	197	3,80	1,93
Amostra 3	80	412	6,58	1,60

Sensibilidade metodológica . Limite de detecção: 3 mg/dL. Equivale a 3 desvios padrão (DP) obtido a partir do resultado de 20 medições de uma amostra com concentração de triglicérides igual a 70 mg/dL.

Utilizando-se a absorbância do padrão como parâmetro, verificou-se que o limite de detecção fotométrica é de 0,82 mg/dL, correspondendo a uma absorbância igual a 0,001.

Efeitos da diluição da matriz . Duas amostras com valores iguais a 977 e 1051 mg/dL foram utilizadas para avaliar a resposta do sistema nas diluições da matriz com NaCl 150 mmol/L (0,85%). Usando fatores de diluição que variaram de 2 a 8 encontraram-se recuperações entre 100 e 102%.

Significado clínico . Recentes meta-análises de estudos prospectivos indicam que os triglicérides elevados são também um fator de risco independente para doença coronariana isquêmica (DCI). Fatores que contribuem para valores elevados de triglicérides na população em geral incluem obesidade e sobrepeso, inatividade física, tabagismo, consumo excessivo de álcool e dietas com elevado conteúdo de carboidratos.

Os achados de que valores triglicérides elevados representam um fator de risco independente para DCI sugerem que algumas lipoproteínas ricas em triglicérides sejam aterogênicas, principalmente, as VLDL parcialmente degradadas, comumente chamadas lipoproteínas remanescentes.

Na prática clínica, o colesterol VLDL (Triglicérides + 5) é a mais simples medida das lipoproteínas aterogênicas remanescentes. Assim, o colesterol VLDL pode ser também um alvo da terapêutica para redução do colesterol. O Adult Treatment Panel (ATP) III proposto pelo NCEP identifica a soma dos valores de colesterol LDL+VLDL [Colesterol não HDL (colesterol total - colesterol HDL)] como alvo secundário da terapêutica em pessoas com triglicérides elevados (≥ 200 mg/dL).

A meta para o colesterol não HDL, em pessoas com valores elevados de triglicérides, pode ser estabelecida como sendo o valor do colesterol LDL mais 30 mg/dL (VLDL), com base na premissa de que valores de colesterol VLDL menores que 30 mg/dL são considerados desejáveis¹⁰.

São causas de elevação dos triglicérides as várias doenças de lipídes chamadas hiperlipidemias ou hiperlipoproteinemias. Nestas, sejam de causa primária ou secundária, ocorre elevação dos triglicérides nos tipos I, IIb, III, IV e V.

As hiperlipidemias ocorrem secundariamente no diabetes, pancreatite, doença do armazenamento de glicogênio, síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, hipotireoidismo, gravidez e mieloma múltiplo.

Várias mulheres em uso de estrógenos ou contraceptivos orais apresentam aumento nas concentrações de triglicérides. A hipertrigliceridemia também encontra-se associada ao uso de bloqueadores beta-adrenérgicos, corticosteróides, diuréticos tiazídicos e retinóides.

Observações

1. A limpeza e secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

2. A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, deve ter resistividade ≥ 1 megaohm ou condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L (água tipo II). Para o enxágue da vidraria, a água pode ser do tipo III, com resistividade $\geq 0,1$ megaohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxágue final utilizar água tipo II. Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre a produção de água alcalina com liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

3. Para uma revisão das fontes fisiopatológicas e medicamentosas de interferência nos resultados e na metodologia sugere-se consultar Young DS, Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3^ª edição, Washington: AACC Press, 1990.

Referências

- Bucolo G, David H. Clin Chem 1973; 19: 475.
- Fossati P, Prencipe L. Clin Chem 1982; 28: 2077.
- Mc Gowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B. Clin Chem 1983; 29: 538.
- Nagele V, Hagele EO, Sauer G, Wiedeman E, Lehmann P, Wahlefeld AW, Gruber W J Clin Chem Clin Biochem 1984; 22: 165.
- Stein EA, Myers GI. Clin Chem 1995; 41: 1421-26.
- Trinder P. Ann Clin Biochem 1969; 6: 24.

7. Narayanan S. Indian J Clin Biochem 1996; 11: 12-16.
8. Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH. Handbook of lipoprotein testing., Washington: AACC Press, 1997: 75-97.
9. NCEP - Recommendations on Lipoprotein Measurement. NIH Publication 95-3044, Bethesda, MD, 1995.
10. Shephard MDS, Whiting MJ. Clin Chem 1990; 36 (2): 325-329.
11. Executive Summary of the Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment panel III). Jama 2001; 285: 2486-97.
12. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. Clin Chem 1981; 27: 493-501.
13. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Jama 2001; 285: 2486-97.
14. Leite PF, Martinez TLR, Halpeen A, Cendoroglo MS, Novazzi JP, Fonseca FAH, Dias JCA. Risco cardiovascular: fatores metabólicos e nutricionais: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Loyola, 1994. p.56.
15. Labtest: Dados de arquivo.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo	
Triglicérides Liquiform	87-2/100	RI 1	2 X 100 mL
		CAL	1 X 5 mL
	87-2/250	RI 1	2 X 250 mL
		CAL	1 X 5 mL

Estão disponíveis aplicações **para sistemas automáticos e semi-automáticos.**

O número de testes **em aplicações automáticas depende dos parâmetros de programação de cada equipamento.**

Informações ao consumidor

[Termos e Condições de Garantia]

A **Labtest Diagnóstica** garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções sejam seguidos corretamente.



Labtest Diagnóstica S.A.

CNPJ: 16.516.296 / 0001 - 38
Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Vista Alegre - CEP 33400-000
Lagoa Santa - Minas Gerais Brasil - www.labtest.com.br

Serviço de Apoio ao Cliente | 0800 031 34 11 (Ligação Gratuita)
e-mail: sac@labtest.com.br

Revisão: Novembro, 2004
Ref.: 240214

Copyright by Labtest Diagnóstica S.A.
Reprodução sob prévia autorização

COLESTEROL Liquiform

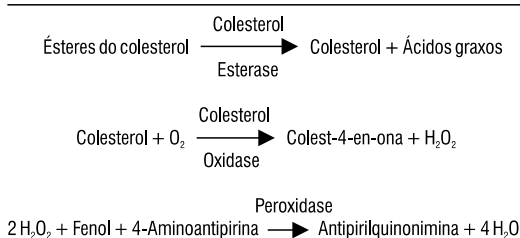
Instruções de Uso

Ref.: 76
MS 10009010068

Finalidade . Sistema enzimático para a determinação do colesterol total em amostras de soro, por reação de ponto final.

[Somente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio . O colesterol total é determinado de acordo com as seguintes reações:



Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina que tem absorvibilidade máxima em 500 nm.

A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

Características do Sistema . Os valores elevados do colesterol, principalmente o colesterol ligado às lipoproteínas de baixa densidade, são um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento da doença arterial coronariana. O National Cholesterol Education Program (NCEP)⁶ recomenda que os sistemas de medição do colesterol apresentem características de desempenho capazes de atingir os requisitos de exatidão e precisão necessários para que os resultados tenham utilidade médica.

Os dados de exatidão, repetitividade e reprodutibilidade obtidos com o sistema Colesterol Liquiform demonstram que o método é capaz de fornecer resultados que superam as exigências do NCEP, fazendo com que possa ser considerado como bastante seguro para a medição confiável do colesterol total nos níveis de decisão mais importantes. Adicionalmente, a comparação entre as imprecisões encontradas na repetitividade e na reprodutibilidade demonstra que o sistema de medição é bastante robusto nas regiões de concentrações significativas para uso clínico, indicando um desempenho estável no dia a dia.

O sistema é composto de um único reagente pronto para uso, com estabilidade que garante desempenho consistente em sua forma líquida original e manutenção das condições ótimas da reação.

Colesterol Liquiform possui um sistema clarificador de alta eficiência que elimina as interferências positivas produzidas por valores de triglicérides até 2600 mg/dL.

O sistema é facilmente aplicável em analisadores automáticos e semi-automáticos capazes de medir uma reação de ponto final em 500 nm e pode ser usado para medição do colesterol HDL após precipitação seletiva das LDL e VLDL.

Metodologia . Enzimático-Trinder.

Reagentes

1. **[RT]** - Reagente 1 - Armazenar entre 2 - 8 °C.

Contém tampão 50 mmol/L, pH 7,0; fenol 24 mmol/L; colato de sódio 500 µmol/L; azida sódica 15 mmol/L; 4-aminoantipirina 500 µmol/L; colesterol esterase ≥250 U/L, colesterol oxidase ≥250 U/L e peroxidase ≥1000 U/L.

Para preservar o desempenho, o reagente deve permanecer fora da geladeira somente o tempo necessário para se obter o volume a ser utilizado. Evitar exposição à luz solar direta.

2. **[CAL]** - Padrão - 200 mg/dL - Armazenar entre 2 - 30 °C.

Contém azida sódica 15 mmol/L. Após o manuseio sugere-se armazenar bem vedado para evitar evaporação.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos à contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Precauções e cuidados especiais

Não utilizar o Reagente 1 quando sua absorvância, medida contra a água em 500 nm, for igual ou maior que 0,300 ou quando mostrar-se turvo ou com sinais de contaminação.

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação do reagente. O Reagente 1 e o Padrão contém azida sódica que é tóxica. Deve-se tomar cuidado para evitar a ingestão e no caso de contato com os olhos deve-se lavar imediatamente com grande quantidade de água e procurar auxílio médico. A azida pode formar compostos altamente explosivos com tubulações de chumbo e cobre. Portanto, utilizar grandes volumes de água para descartar o reagente.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos à contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Material necessário e não fornecido

1. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
2. Fotômetro capaz de medir, com exatidão, a absorbância entre 490 e 510 nm.
3. Pipetas para medir amostras e reagente.
4. Cronômetro.

Influências Pré-analíticas . A postura durante a colheita da amostra deve ser padronizada porque pode ter efeitos significativos nos resultados. Se as amostras são obtidas com o paciente na posição sentada, deve-se padronizar para que o indivíduo esteja sentado durante 15 minutos e não mais que 30 minutos.

Um garroteamento maior que 1 minuto produz hemoconcentração, o que pode aumentar os valores do colesterol em 5,0% após 2 minutos e 10,0 a 15,0% após 5 minutos. Portanto, é muito importante obter a amostra de sangue após liberar o torniquete devendo-se padronizar todo o procedimento da colheita.

A variação biológica do colesterol, decorrente da variação também biológica das lipoproteínas transportadoras do colesterol, é observada quando a dosagem do colesterol é repetida em um mesmo laboratório no espaço mínimo de uma semana. Ela ocorre independentemente do erro analítico e pode variar entre 1,7 e 11,6% com uma média de 6,1% devido, principalmente, à variação biológica da LDL que é a principal lipoproteína transportadora de colesterol.

Níveis elevados de ascorbato (vitamina C) produzem interferências negativas por competição com o cromogênio na reação da peroxidase. Se houver suspeita da presença de ácido ascórbico deixar o soro em repouso durante 90 minutos antes de iniciar a dosagem para minimizar a ação do interferente.

Amostra

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para colheita, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

De modo geral, a amostra de sangue pode ser obtida com ou sem jejum, mas é altamente recomendável que todos os ensaios dos lípides sanguíneos, incluindo o colesterol, sejam realizados em amostras colhidas em jejum. As vantagens da utilização de amostras colhidas em jejum são decorrentes da padronização da colheita, pois permitem a realização da determinação de outros lípidos que requerem o jejum e minimizam a interferência da lipemia pós prandial que está freqüentemente presente em amostras obtidas sem o jejum.

Usar soro. Anticoagulantes como citrato, oxalato ou EDTA produzem resultados falsamente diminuídos. O analito é estável 7 dias entre 2 - 8 °C e 6 meses a 20 °C negativos⁶. Homogeneizar bem as amostras lipêmicas antes de iniciar a dosagem. Não utilizar amostras fortemente hemolisadas.

Como o volume de amostra é pequeno, deve-se pipetar com cuidado para minimizar a imprecisão do sistema de medição.

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras de sangue não transmitem infecções, todas elas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las, deve-se seguir as normas estabelecidas para biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico, sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

Valores de bilirrubina até 5 mg/dL, hemoglobina até 180 mg/dL e triglicérides até 2600 mg/dL não produzem interferências significativas. Valores de bilirrubina entre 5 e 38 mg/dL produzem resultados falsamente diminuídos proporcionais à concentração da bilirrubina.

Para avaliar a concentração aproximada da hemoglobina em uma amostra hemolisada pode-se proceder do seguinte modo: Diluir 0,05 mL da amostra em 2,0 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) e medir a absorbância em 405 ou 415 nm acertando o zero com água deionizada ou destilada.

$$\begin{aligned} \text{Hemoglobina (mg/dL)} &\cong \text{Absorbância}_{405} \times 601 \\ \text{Hemoglobina (mg/dL)} &\cong \text{Absorbância}_{415} \times 467 \end{aligned}$$

Procedimento

Ver **observações 1, 2 e 3**

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (Nº 2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e incubar em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. O nível de água no banho deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 510), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado.

Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculo se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

Cálculos

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 200$$

Exemplo

Absorbância do Teste = 0,290
Absorbância do Padrão = 0,345

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{0,290}{0,345} \times 200 = 168$$

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia, pode-se utilizar o método do fator.

$$\text{Fator de Calibração} = \frac{200}{\text{Absorbância do Padrão}}$$

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \text{Absorbância do Teste} \times \text{Fator}$$

Exemplo

$$\text{Fator} = \frac{200}{0,345} = 580$$

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = 0,290 \times 580 = 168$$

Calibração**Rastreabilidade do Sistema**

O padrão é rastreável ao *Standard Reference Material (SRM) 911* do *National Institute of Standards and Technology (NIST)*.

Calibrações manuais

Obter o fator de calibração ao usar novo lote de reagentes ou quando o controle interno da qualidade indicar.

Sistemas automáticos

Branco de reagentes: água deionizada ou destilada, ou solução de cloreto de sódio 150 mmol/L (0,85%);
Padrões: usar calibradores protéicos. As concentrações de Colesterol nos calibradores da linha Calibra Labtest são rastreáveis ao SRM 1951 do NIST.

Intervalo de calibrações

Deve-se recalibrar o sistema nas seguintes situações:
Calibração de 2 ou 3 pontos ao mudar de lote;
Calibração de 2 ou 3 pontos quando o controle interno da qualidade indicar.

Linearidade

O resultado da medição é linear até 500 mg/dL. Quando for obtido um valor igual ou maior que 500 mg/dL, diluir a amostra com NaCl 150 mmol/L (0,85%), realizar nova medição e multiplicar o resultado pelo fator de diluição. Diluir a amostra de tal modo que o valor encontrado se situe entre 150 e 300 mg/dL. Sugerimos a verificação da linearidade metodológica e fotométrica, no mínimo semestralmente, utilizando amostras com valores até 500 mg/dL.

Controle interno da qualidade . O laboratório deve manter um programa de controle da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações da qualidade e limites de controle, ações corretivas e registro das atividades.

Materiais de controle devem ser utilizados para avaliar a imprecisão e/ou desvios da calibração. Sugere-se procurar atender por limites máximos de controle as especificações propostas por NCEP¹⁰ para coeficiente de variação $\leq 3,00\%$, erro sistemático (bias) $\leq \pm 3,00\%$ e erro total $\leq 9,0\%$.

Sugere-se utilizar as preparações estabilizadas da linha Qualitrol - Labtest para controle interno da qualidade em ensaios de química clínica.

Valores recomendáveis ou desejados . Os valores abaixo substituem os valores de referência e foram determinados a partir de dados epidemiológicos tratados estatisticamente, que relacionam os níveis do colesterol com a prevalência de doença coronariana isquêmica (DCI).

Classificação ATP III de LDL, Colesterol Total e HDL (mg/dL):**Adultos¹⁰****Colesterol Total (mg/dL)**

Desejável	<200
Limiar elevado	200 - 239
Elevado	≥ 240

Colesterol HDL (mg/dL)

Baixo	< 40
Elevado (Desejável)	≥ 60

Colesterol LDL (mg/dL)

Ótimo	<100
Limiar ótimo	100 - 129
Limiar elevado	130 - 159
Elevado	160 - 189
Muito Elevado	≥ 190

Crianças e Adolescentes⁹**Colesterol Total (mg/dL)**

2 a 19 anos	Desejável	<170
	Limítrofe	170 - 199
	Elevado	200

Colesterol HDL (mg/dL)

<10 anos	Desejável	40
10 a 19 anos	Desejável	35

Colesterol LDL (mg/dL)

2 a 19 anos	Desejável	<110
	Limítrofe	110 - 129
	Elevado	130

Conversão: Unidades Convencionais (mg/dL) x 0,026 = Unidades SI (mmol/L).

Características do desempenho¹¹

Exatidão . Em duas amostras com concentrações de colesterol iguais a 146 e 245 mg/dL foram adicionadas quantidades diferentes do analito, obtendo-se recuperações entre 94 e 110%. O erro sistemático proporcional médio obtido em um valor de 200 mg/dL foi igual a 4,0 mg/dL ou 2,0%.

Especificidade . O método proposto foi comparado com um método similar utilizando 60 amostras com valores situados entre 96 e 495 mg/dL. A comparação resultou na equação da regressão: $y = 6,92 + 0,96x$ e um coeficiente de correlação (r) igual a 0,996.

O erro sistemático total (constante e proporcional) verificado no nível de decisão (200 mg/dL) foi igual a 1,08 mg/dL ou 0,54%. Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e pacientes hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada.

Repetitividade - Imprecisão intra-ensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	10	175	2,69	1,5
Amostra 2	10	255	3,08	1,2
Amostra 3	10	357	4,23	1,2

Reprodutibilidade - Imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	10	173	4,23	2,4
Amostra 2	10	253	5,77	2,2
Amostra 3	10	353	8,46	2,1

Sensibilidade metodológica . Uma amostra protéica não contendo colesterol foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio tendo sido encontrado um valor igual a 1,04 mg/dL, equivalente a média de 20 ensaios mais dois desvios padrão. Utilizando-se a absorbância do padrão como parâmetro verificou-se que o limite de detecção fotométrica é de 0,06 mg/dL, correspondendo a uma absorbância igual a 0,0001.

Efeitos da diluição da matriz . Duas amostras com valores iguais a 330 e 400 mg/dL foram utilizadas para avaliar a resposta do sistema nas diluições da matriz com NaCl 150 mmol/L (0,85%). Usando fatores de diluição que variaram de 2 a 8 encontraram-se recuperações entre 99 e 113%.

Significado clínico . O grande dilema da aterosclerose é que ela é um processo silente. Está ativa em todos os indivíduos e permanece sem qualquer manifestação por décadas e, subitamente se manifesta através de dor torácica, infarto agudo do miocárdio ou morte súbita. Estudos populacionais longitudinais como os de Tecumset, Albany, Framingham, Evans, Chicago, Oslo entre outros, e também dados epidemiológicos e estudos experimentais em animais, demonstraram uma correlação positiva entre os níveis do colesterol, mais especificamente do colesterol LDL e o risco de doença arterial coronariana (DAC). Ao mesmo tempo foi evidenciado que os níveis de colesterol HDL são inversamente proporcionais ao risco de DAC.

Valores aumentados de colesterol são encontrados na nefrose, hipotireoidismo, doenças colestáticas do fígado e nas hiperlipoproteinemias dos tipos IIa, IIb e III.

Níveis diminuídos são encontrados no hipertireoidismo, doenças consumptivas e desnutrição crônica.

Além do nível do colesterol sérico, a hipertensão e o fumo constituem fatores de risco de aterosclerose e DAC.

Observações

1. A limpeza e secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

2. A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, deve ter resistividade ≥ 1 megaohm ou condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L (água tipo II). Para o enxágüe da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade $\geq 0,1$ megaohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens.

No enxágüe final utilizar água tipo II. Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre a produção de água alcalina com liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.





3. Para uma revisão das fontes fisiopatológicas e medicamentosas de interferência nos resultados e na metodologia sugere-se consultar Young DS. *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests*, 3ª edição, Washington: AACC Press, 1990.

Referências

- Alain CA, Poon LS, Cahn CSG, Richmond W, Fu PC. Clin Chem 1974;20:470.
- Bergmeyer HU. Methods of Enzymatic Analysis, 3ª edição, Verlag Chemie:Weinheim, 1984;8:141-8.
- Bull Org Mond Santé. 1970;43:891.
- Fredrickson DS, Levy RJ, Lee RS. New Engl J Med 1967; 276:24, 94, 148, 215, 276.
- Good NE, Winger GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM. Biochemistry 1966;5:467.
- Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH. Handbook of lipoprotein testing. AACC Press: Washington, 1997:75-97.
- Tonks DB. Quality Control in Clinical Laboratories, Warner-Chilcott Laboratories, Diagnostics Reagents Division, Scarborough, Canada, 1972.
- Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. Clin Chem 1981;27:493-501.

9. Leite PF, Martinez TLR, Halpern A, Cendoroglo MS, Novazzi JP, Fonseca FAH, Dias JCA. Risco cardiovascular: fatores metabólicos e nutricionais: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Loyola, 1994. P.56.
10. Executive Summary of the Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001;285:2486-97.
11. Labtest: Dados de arquivo.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo
Colesterol Liquiform	76-2/100	 2 X 100 mL
		 1 X 5 mL
	76-2/250	 2 X 250 mL
		 1 X 5 mL

Estão disponíveis aplicações **para sistemas automáticos**.

O número de testes **em aplicações automáticas depende dos parâmetros de programação**.

Informações ao consumidor

[Termos e Condições de Garantia]

A **Labtest Diagnóstica** garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções sejam seguidos corretamente.



Labtest Diagnóstica S.A.

CNPJ: 16.516.296 / 0001 - 38
Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Vista Alegre - CEP 33400-000
Lagoa Santa - Minas Gerais Brasil - www.labtest.com.br

Serviço de Apoio ao Cliente | 0800 031 34 11 (Ligação Gratuita)
e-mail: sac@labtest.com.br

Revisão: Julho, 2014
Ref.: 041114

Copyright by Labtest Diagnóstica S.A.
Reprodução sob prévia autorização

COLESTEROL HDL

Instruções de Uso

Ref.: **13**
MS 10009010026

Finalidade . Sistema para determinação do Colesterol HDL através da precipitação seletiva das lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL), por reação de ponto final.

[Somente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio . As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são quantitativamente precipitadas e, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (Colesterol HDL) é determinado no sobrenadante.

Características do sistema . Na seleção de um sistema para dosar o Colesterol HDL, a Labtest optou pelo ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio, que precipitando seletiva e quantitativamente as VLDL e LDL, permitem a obtenção de resultados comparáveis aos do método de referência.

Após centrifugação, o Colesterol HDL é determinado no sobrenadante utilizando o sistema enzimático Colesterol Liquiform Labtest (Ref. 76).

O sistema de medida colorimétrica é facilmente adaptável à maioria dos analisadores automáticos capazes de medir uma reação de ponto final em 500 nm.

Metodologia . Labtest.

Reagentes

1. [R1] - Precipitante - Armazenar entre 2 - 8 °C.

Contém ácido fosfotúngstico 1,5 mmol/L e cloreto de magnésio 54 mmol/L.

2. [CAL] - Padrão 20 mg/dL - Armazenar entre 2 - 30 °C.

Contém colesterol 0,52 mmol/L e azida sódica 14,6 mmol/L. Armazenar bem vedado para evitar evaporação.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos à contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Precauções e cuidados especiais

Não utilizar o Reagente 1 - Colesterol Liquiform - Labtest (Ref.76) quando sua absorbância, medida contra a água em 500 nm, for igual ou maior que 0,300 ou quando mostrar-se turvo ou com sinais de contaminação.

O padrão contém azida sódica que é tóxica. Deve-se tomar cuidado para evitar a ingestão e no caso de contato com os olhos, deve-se lavar imediatamente com grande quantidade de água e procurar auxílio médico.

A azida pode formar compostos altamente explosivos com tubulações de chumbo e cobre. Portanto, utilizar grandes volumes de água para descartar o reagente.

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação dos reagentes.

Materiais necessários e não fornecidos

1. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
2. Fotômetro capaz de medir, com exatidão, a absorbância entre 490 e 540 nm.
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.
5. Centrifuga com capacidade superior a 3500 rpm.
6. Reagente para determinação de colesterol.

Influências pré-analíticas . As concentrações do colesterol HDL medidas em um mesmo indivíduo e em diferentes ocasiões podem flutuar consideravelmente devido às variações biológicas e também às variações do método analítico. As concentrações no sangue são fortemente influenciadas por fatores tais como dieta recente, ingestão de álcool, variações do peso corporal, atividades físicas e hábito tabagista. Os hormônios e outras medicações também produzem variações na concentração do colesterol HDL.

Considera-se que a variação biológica seja em torno de 7,5%. Assim, em uma série de repetições da dosagem em um mesmo indivíduo, dois terços dos resultados estarão entre $\pm 7,5\%$ do valor médio. Portanto, a variação biológica se constitui no fator mais importante da variabilidade total do colesterol HDL. Os efeitos da variação biológica podem ser controlados até certo ponto através da padronização das condições de preparo do paciente e da colheita da amostra, mas o colesterol HDL não pode ser estimado com confiança através de um ensaio de uma única amostra. Várias amostras devem ser obtidas e a média dos resultados pode ser considerada como a concentração usual do colesterol HDL ou, mais exatamente, pode ser considerada a faixa usual de resultados para o indivíduo.

Amostra

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para colheita, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

Usar soro ou plasma (heparina-lítio e EDTA). Amostras com citrato ou oxalato não devem ser usadas porque produzem resultados falsamente diminuídos.

As amostras de soro ou plasma não devem permanecer entre 15 - 30 °C por mais de 14 horas. Quando as medições não são completadas dentro de 14 horas, as amostras devem ser armazenadas entre 2 - 8 °C por 7 dias e por 30 dias a 20 °C negativos. Deve-se armazenar em temperaturas ≤70 °C negativos quando houver necessidade de preservação por períodos maiores de tempo. Evitar congelamentos e descongelamentos repetidos. Amostras descongeladas devem ser bem misturadas antes da utilização. Não usar vórtex ou similar. Não usar amostras com sinais de contaminação microbiana.

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras de sangue não transmitem infecções, todas elas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las deve-se seguir as normas estabelecidas para biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

Concentrações de bilirrubina até 5 mg/dL, hemoglobina até 180 mg/dL e triglicérides até 750 mg/dL não produzem interferências significativas.

Concentrações de bilirrubina acima de 5 mg/dL produzem resultados falsamente diminuídos.

Concentrações de triglicérides acima de 750 mg/dL produzem resultados falsamente elevados.

Para avaliar a concentração aproximada da hemoglobina em uma amostra hemolisada pode-se proceder do seguinte modo: diluir 0,05 mL da amostra em 2,0 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) e medir a absorbância em 405 ou 415 nm acertando o zero com água deionizada ou destilada.

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} \cong \text{Absorbância}_{405} \times 601$$

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} \cong \text{Absorbância}_{415} \times 467$$

Limitações do método . Manter sempre a relação Amostra/Precipitante igual a 1:1.

Após a centrifugação, remover o sobrenadante límpido dentro de 15 minutos para evitar resultados falsamente elevados.

Amostras lipêmicas e, ocasionalmente, amostras não lipêmicas podem apresentar o sobrenadante turvo. Neste caso, diluir a amostra 1:2 com NaCl 150 mmol/L e repetir a precipitação. Multiplicar o resultado final por 2. Caso o sobrenadante permaneça ainda turvo a amostra não pode ser utilizada para determinar o colesterol HDL.

Algumas amostras, principalmente lipêmicas, podem apresentar o sobrenadante límpido com uma camada na sua superfície que não deve ser pipetada, para evitar resultados falsamente elevados.

Procedimento

Ver limitações do método.

Precipitação das VLDL e LDL.

Em um tubo 12 x 75, adicionar:

Soro: 0,25 mL
Precipitante: 0,25 mL

Agitar vigorosamente durante 30 segundos. A agitação sugerida é fundamental para obtenção de resultados consistentes. Centrifugar a 3.500 rpm por pelo menos 15 minutos para obter um sobrenadante límpido. Pipetar o sobrenadante límpido imediatamente após a centrifugação, tomando o cuidado para não ressuspender o precipitado, a fim de evitar resultados falsamente elevados.

Colorimetria . Ver observações 1, 2 e 3.

Utilizar com o Reagente 1 - Colesterol Liquiform - Labtest (Ref. 76).

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Sobrenadante	----	0,1 mL	----
Padrão (nº2)	----	----	0,1 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e incubar em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 540) acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado.

Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculo se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

Cálculos . Devido a diluição 1:2 aplicada às amostras durante o procedimento de precipitação das VLDL e LDL, o valor do Padrão para cálculo dos resultados deve ser corrigido para 40 mg/dL.

$$\text{Colesterol HDL (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 40$$

Exemplo

Absorbância do Teste = 0,290
Absorbância do Padrão = 0,320

$$\text{Colesterol HDL (mg/dL)} = \frac{0,290}{0,320} \times 40 = 36$$

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia, pode-se utilizar o método do fator.

$$\text{Fator de Calibração} = \frac{40}{\text{Absorbância do Padrão}}$$

$$\text{Colesterol HDL (mg/dL)} = \text{Absorbância do Teste} \times \text{Fator}$$

Exemplo

$$\text{Fator} = \frac{40}{0,320} = 125$$

$$\text{Colesterol HDL (mg/dL)} = 0,290 \times 125 = 36$$

Unidades Convencionais: mg/dL

Unidades SI (mmol/L) = Unidades Convencionais x 0,026

Rastreabilidade do sistema . A calibração do sistema é rastreável ao Standard Reference Material (SRM) 911 do National Institute of Standards and Technology (NIST).

Linearidade

O resultado da medição é linear até 200 mg/dL. Quando for obtido um valor igual ou maior que 200 mg/dL, diluir a amostra 1:2 com NaCl 150 mmol/L (0,85%), realizar nova medição e multiplicar o resultado pelo fator de diluição.

Controle interno da qualidade . O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações da qualidade e limites de controle, ações corretivas e registro das atividades. Materiais de controle devem ser utilizados para avaliar a imprecisão e/ou desvios da calibração.

Sugere-se procurar atender como limites máximos de controle as especificações propostas por NCEP¹⁰ para coeficiente de variação $\leq 4,00\%$, erro sistemático (bias) $\leq 5,00\%$, erro total $\leq 12,8\%$.

Valores desejáveis ou recomendados . Estes valores devem ser usados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça, na população atendida, sua própria faixa de valores de referência.

Os valores desejáveis ou recomendados substituem os valores de referência e são determinados a partir de dados epidemiológicos, calculados estatisticamente, que relacionam os níveis do colesterol com a prevalência de doença coronariana isquêmica (DCI).

Classificação ATP III de Colesterol Total, LDL e HDL (mg/dL):

Crianças e Adolescentes⁹

Colesterol Total (mg/dL)	
Idade: 2 a 19 anos	
Desejável	<170
Limítrofe	170 - 199
Elevado	≥ 200

Colesterol LDL (mg/dL)	
Idade: 2 a 19 anos	
Desejável	<110
Limítrofe	110 - 129
Elevado	≥ 130

Colesterol HDL (mg/dL)		
<10 anos	Desejável	≥ 40
10 a 19 anos	Desejável	≥ 35

Adultos¹⁰

Colesterol Total (mg/dL)	
Desejável	<200
Limiar elevado	200 - 239
Elevado	≥ 240

Colesterol LDL (mg/dL)	
Ótimo	<100
Limiar ótimo	100 - 129
Limiar elevado	130 - 159
Elevado	160 - 189
Muito Elevado	≥ 190

Colesterol HDL (mg/dL)	
Baixo	<40
Elevado (Desejável)	≥ 60

Características do desempenho¹¹

Exatidão . Em duas amostras com concentrações de colesterol HDL iguais a 28 e 54 mg/dL foram adicionadas quantidades diferentes do analito, obtendo-se recuperações entre 95 e 100%. O erro sistemático proporcional médio obtido em um valor de 60 mg/dL foi igual a 1,2 mg/dL ou 2,0%.

Especificidade . O método proposto foi comparado com um método similar utilizando 80 amostras com valores situados entre 7 e 86 mg/dL. A comparação resultou na equação da regressão: $y = 1,337 + 0,932x$ e um coeficiente de correlação (r) igual a 0,993. O erro sistemático total (constante e proporcional) verificado no nível de decisão (60 mg/dL) foi igual a 2,74 mg/dL ou 4,5%.

Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e pacientes hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada.

Repetitividade - Imprecisão intra-ensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	40	0,60	1,5
Amostra 2	20	59	0,49	0,8

Reprodutibilidade - Imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	40	0,83	2,0
Amostra 2	20	58	0,99	1,7

Sensibilidade metodológica . Uma amostra protéica não contendo colesterol HDL foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio tendo sido encontrado um valor igual a 0,40 mg/dL, equivalente à média de 20 ensaios mais dois desvios padrão. Utilizando-se a absorvância do padrão como parâmetro, o limite de detecção fotométrica é de 0,12 mg/dL, correspondendo a uma absorvância igual a 0,001.

Efeitos da diluição da matriz . Uma amostra com valor igual a 92 mg/dL foi utilizada para avaliar a resposta do sistema nas diluições da matriz com NaCl 150 mmol/L (0,85%). Usando fatores de diluição que variaram de 1,2 a 2,0 encontraram-se recuperações entre 93 e 103%.

Significado clínico . Não há dúvida de que o colesterol é um fator de risco para DCI e que ele marcha - junto com o fumo, hipertensão e intolerância à glicose - como um dos quatro grandes fatores de DCI. Estudos prospectivos e retrospectivos não deixam dúvidas da existência de uma interrelação curvilínea entre os níveis de colesterol sérico, mais especificamente LDL e VLDL, e a incidência de DCI.

Em 1977 ficou demonstrado que o Colesterol HDL tem um efeito protetor contra a DCI. Os estudos de Framingham revelaram que os níveis do Colesterol HDL são inversamente proporcionais à prevalência de DCI.

Está bem estabelecido que níveis elevados de Colesterol LDL estão associados ao risco aumentado de DCI. Também, não há dúvida de que tanto o Colesterol Total quanto as frações LDL e VLDL podem ser diminuídas com dieta ou medicamento. A redução de 1% no valor do Colesterol Total diminui a prevalência de DCI em aproximadamente 2%.

As concentrações do Colesterol Total e do Colesterol HDL dependem de metabolismos distintos e não se deve fazer qualquer tentativa de buscar correlação entre seus níveis de concentração.

Como calcular a concentração do colesterol VLDL e LDL . As concentrações do Colesterol VLDL e LDL podem ser calculadas utilizando a equação de Friedewald, que é exata para amostras cujas concentrações de triglicérides não ultrapassem 400 mg/dL e não pertençam a pacientes portadores de lipoproteinemia do Tipo III.

Equação de Friedewald

Colesterol VLDL = Triglicérides / 5

Colesterol LDL = Colesterol Total - (HDL + VLDL)

Observações

1. A limpeza e secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

2. O laboratório clínico tem como objetivo fornecer resultados exatos e precisos. A utilização de água de qualidade inadequada é uma causa potencial de erros analíticos.

A água deionizada ou destilada utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes, usar nas medições e para uso no enxágue final da vidraria, deve ter resistividade ≥ 1 megaohm.cm ou condutividade ≤ 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L. Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre produção de água alcalina com liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

3. Para uma revisão das fontes fisiopatológicas e medicamentosas de interferência nos resultados e na metodologia sugere-se consultar www.fxol.org/

Referências

- III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq Bras Cardiol 2001;77(suppl III):1-48.
- Tonks DB. Quality Control in Clinical Laboratories, Warner-Chilcott Laboratories, Diagnostic Reagents Division, Scarborough, Canada, 1972.
- Virella MFL, Stone P, Ellis S, Colwell G. Clin Chem 1977; 23:882-884.
- Warnick RG, Naguyent T, Albers AA. Clin Chem 1985; 2:217-222.
- Warnick RJ. Handbook of lipoprotein testing. Washington: AAC Press, 1997.
- Warnick RG, Wood PD. Clin Chem 1995; 41: 1427-33.
- NCEP - Detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). NIH Publication 02-5215, Bethesda, MD, 2002.
- Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Growth T. 1981;27:493-501.
- Leite PF, Martinez TLR, Halpern A, Cendoroglo MS, Novazzi JP, Fonseca FAH, dias JCA. Risco cardiovascular: fatores metabólicos e nutricionais: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Loyola, 1994. p.56.
- Executive Summary of the Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001;285:2486-97.
- Labtest. Dados de Arquivo.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo
Colesterol HDL	13-25	R1 1 X 25 mL
		CAL 1 X 5 mL
	13-50	R1 1 X 50 mL
		CAL 1 X 5 mL

Estão disponíveis aplicações **para sistemas automáticos**.

Informações ao consumidor

[Termos e Condições de Garantia]

A **Labtest Diagnóstica** garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções sejam seguidos corretamente.

Labtest Diagnóstica S.A.

CNPJ: 16.516.296 / 0001 - 38

Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Vista Alegre - CEP 33400-000

Lagoa Santa . Minas Gerais Brasil - www.labtest.com.br

Serviço de Apoio ao Cliente | 0800 031 34 11 (Ligação Gratuita)

e-mail: sac@labtest.com.br

Revisão: Março, 2014
Ref.: 201114

Copyright by Labtest Diagnóstica S.A.
Reprodução sob prévia autorização

LDL Liquiform

Instruções de Uso

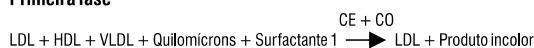
Ref.: 111
MS 10009010136

Finalidade . Sistema para determinação homogênea direta do colesterol LDL em soro e plasma.

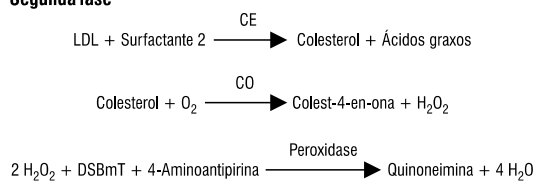
[Somente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio . Na primeira fase da reação, um surfactante específico presente no Reagente 1 solubiliza os quilomicrons, as lipoproteínas de alta densidade e as lipoproteínas de muito baixa densidade (HDL e VLDL). O colesterol solubilizado é consumido pela ação da colesterol esterase (CE) e colesterol oxidase (CO) em uma reação não formadora de cor. Na segunda fase, um surfactante presente no Reagente 2 solubiliza o colesterol da LDL, que é hidrolisado pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e disulfobutilmetatoluidina sódica (DSBmT), catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina que tem máximo de absorbância em 546 nm. A intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração de colesterol LDL na amostra.

Primeira fase



Segunda fase



Características do sistema . O procedimento para determinação do colesterol LDL, que combina a ultracentrifugação com precipitação química, baseado no método de referência (MR) do Centers for Disease Control And Prevention (CDC) é intensivo em tempo e operações e tem aplicação limitada no laboratório clínico¹.

O sistema LDL Liquiform da Labtest é um método homogêneo líquido para medição direta do colesterol LDL e consiste em um processo simples e de fácil execução. Possui equivalência com o método de referência e apresenta características de precisão e exatidão que superam significativamente os requisitos de desempenho propostos pelo Programa Nacional de Educação em Colesterol (NCEP), em vigor desde 1998¹.

O sistema LDL Liquiform é certificado pelo Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN). O programa de certificação do CRMLN utiliza métodos de referência ou métodos designados de comparação que são rigorosamente padronizados pelos métodos de referência do CDC.

A especificidade é conseguida pela ação seletiva do surfactante presente no Reagente 1 que possibilita o consumo do colesterol presente nas partículas não LDL.

Valores de triglicérides até 1293 mg/dL, bilirrubina até 20 mg/dL, hemoglobina até 500 mg/dL, ácido ascórbico até 50 mg/dL e gamaglobulinas até 5000 mg/dL não interferem significativamente na reação.

A flexibilidade do método torna-o facilmente aplicável em analisadores automáticos capazes de processar reação de ponto final com dois reagentes.

Metodologia . Surfactante Seletivo.

Reagente

1. [R1] - Reagente 1 - Armazenar entre 2 - 8 °C. Não congelar.
Reagente líquido pronto para uso. Armazenar entre 2 - 8 °C. Não congelar. Contém tampão pH 6,3; colesterol esterase <1500 U/L; colesterol oxidase <1500 U/L, peroxidase <1300 U/L, 4-aminoantipirina <0,1%; ascorbato oxidase <3000U/L e surfactante <1,0%.

2. [R2] - Reagente 2 - Armazenar entre 2 - 8 °C. Não congelar.
Reagente líquido pronto para uso. Contém tampão pH 6,3; surfactante <1,0% e DSBmT <1,0 mM.

3. [CAL] - Calibrador - Armazenar entre 2 - 8 °C.
Reagente liofilizado. Concentração no rótulo do frasco. Após reconstituição é estável 2 semanas entre 2 - 8 °C. Preparação contendo colesterol LDL humano e azida sódica \leq 0,1%.

Os reagentes não abertos quando armazenados nas condições indicadas são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo.

Os Reagentes 1 e 2, quando mantidos em bandeja refrigerada no equipamento, são estáveis por 4 semanas. Este período de estabilidade pode ser modificado em função das características e condições de manutenção do equipamento. Portanto, sugere-se que o controle da qualidade seja utilizado para monitorar o desempenho dos reagentes. Os reagentes após abertos quando armazenados bem vedados entre 2 e 8 °C e não submetidos a contaminações química ou microbiana, são estáveis até a data de validade indicada no rótulo.

Precauções e cuidados especiais

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação dos reagentes, que não devem ser pipetados com a boca.

Os reagentes devem ser protegidos da luz.

O Calibrador contém derivados de sangue humano e apresentou resultados negativos para a presença de HBsAg e anticorpos HCV e HIV utilizando testes aprovados. Entretanto, nenhum teste conhecido pode assegurar que produtos derivados de sangue humano não transmitam doenças infecciosas. Portanto, recomenda-se manuseá-lo como sendo potencialmente infectante, seguindo as normas estabelecidas para biossegurança.

O Calibrador contém azida sódica que é tóxica. Não ingerir e, no caso de contato com os olhos lavar imediatamente com grande quantidade de água e procurar auxílio médico. A azida pode formar compostos altamente explosivos com tubulações de chumbo e cobre. Portanto, utilizar grandes volumes de água para descartar o Calibrador.

Concentrações de triglicérides até 1293 mg/dL não interferem nos resultados de colesterol LDL.

Amostras com triglicérides > 1293 mg/dL não devem ser diluídas.

Materiais necessários e não fornecidos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorvância entre 540 e 550 nm.
2. Incubador ou banho-maria a 37 °C.
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

Amostra

Usar soro ou plasma (heparina-lítio e EDTA). Amostras com citrato ou oxalato não devem ser usadas porque produzem resultados falsamente diminuídos.

As amostras de soro ou plasma podem permanecer entre 15 - 30 °C por até 14 horas. Quando as medições não forem completadas dentro de 14 horas, as amostras podem ser armazenadas entre 2 - 8 °C por 5 dias e por 30 dias a 20 °C negativos. Deve-se armazenar em temperatura ≤80 °C negativos quando houver necessidade de preservação por períodos maiores de tempo. Evitar congelamentos e descongelamentos repetidos. Amostras descongeladas devem ser bem homogeneizadas antes da utilização. Não usar vórtex ou similar. Não usar amostras com sinais de contaminação microbiana.

Amostras de sangue devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las deve-se seguir as normas estabelecidas para biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

Concentrações de bilirrubina total até 20 mg/dL, hemoglobina até 500 mg/dL, ácido ascórbico até 50 mg/dL, gamaglobulinas até 5000 mg/dL e triglicérides até 1293 mg/dL não interferem significativamente na reação.

Amostras com concentração de triglicérides > 1293 mg/dL não devem ser diluídas.

Amostras com bilirrubina, hemoglobina, ácido ascórbico e gamaglobulina em concentrações maiores que as acima referidas devem ser diluídas em NaCl 150 mmol/L (0,85%) antes de se realizar os ensaios. Multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

Para uma revisão das fontes fisiopatológicas e medicamentosas de interferência nos resultados e na metodologia sugere-se consultar: www.fxol.org/aaccweb/

Preparo do calibrador . Adicionar 1,0 mL de água deionizada ou destilada ao conteúdo do frasco do Calibrador. Deixar em repouso durante 5 minutos. Misturar por inversão suave evitando a formação de espuma. Estável 2 semanas entre 2 - 8 °C em recipiente hermeticamente fechado para evitar evaporação do solvente.

Procedimento

A metodologia em formato bi-reagente deve ser necessariamente realizada em dois tempos. Este procedimento não se aplica em analisadores semi-automáticos que utilizam unicamente cubeta de fluxo.

Rotular 2 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Teste	Calibrador
Amostra	0,01 mL	-----
Calibrador	-----	0,01 mL
Reagente 1	0,75 mL	0,75 mL

Homogeneizar e incubar a 37 °C durante 5 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias A_1 do teste e do Calibrador em 546 nm (540 - 550), acertando o zero com água deionizada.

Reagente 2	0,25 mL	0,25 mL
------------	---------	---------

Homogeneizar e incubar a 37 °C durante 5 minutos. Determinar as absorvâncias A_2 do teste e do Calibrador em 546 nm (540 - 550), acertando o zero com água deionizada. As absorvâncias são estáveis por 15 minutos.

Cálculos

. Ver linearidade.

A primeira leitura da absorvância (A_1) deve ser corrigida para o volume final da reação obtendo-se $A_{1\text{cor}}$, antes de realizar o cálculo da concentração de LDL.

$$A_{1\text{cor}} = A_1 \times 0,75$$

$$\text{Colesterol LDL (mg/dL)} = \frac{\text{Teste } (A_2 - A_{1\text{cor}})}{\text{Calibrador } (A_2 - A_{1\text{cor}})} \times \text{CC}$$

CC: concentração do Calibrador

Exemplo

Teste: $A_1 = 0,004$ $A_{1cor} = 0,003$ $A_2 = 0,192$
 Calibrador: $A_1 = 0,002$ $A_{1cor} = 0,0015$ $A_2 = 0,154$

Concentração do Calibrador: 113 mg/dL

$$\text{Colesterol LDL (mg/dL)} = \frac{0,192 - 0,003}{0,154 - 0,0015} \times 113 = 140$$

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia, o método do fator pode ser empregado.

$$\text{FATOR} = \frac{CC}{\text{Calibrador } (A_2 - A_{1cor})}$$

$$\text{Colesterol LDL (mg/dL)} = \text{Teste } (A_2 - A_{1cor}) \times \text{Fator}$$

Exemplo

$$\text{Fator} = \frac{113}{0,154 - 0,0015} = 741$$

$$\text{Colesterol LDL (mg/dL)} = (0,192 - 0,003) \times 741 = 140$$

Calibração . O Calibrador é rastreável ao método de referência do CDC.

Calibrações manuais

Obter o fator de calibração ao usar novo lote de reagentes ou quando o controle interno da qualidade indicar.

Sistemas automáticos

Branco de reagentes: água ou solução de cloreto de sódio 150 mmol/L (0,85%);
 Padrão: usar o calibrador do produto;

Intervalos de calibração;

Calibração de 2 pontos ao mudar de lote;
 Calibração de 2 pontos quando o controle da qualidade indicar.

Linearidade

A reação é linear entre 6,6 e 992 mg/dL. Para concentrações superiores a 992 mg/dL, diluir a amostra com NaCl 150 mmol/L (0,85%), realizar nova determinação e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

Controle interno da qualidade . O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações da qualidade e limites de tolerância, ações corretivas e registro das atividades. Materiais de controle devem ser utilizados para avaliar a imprecisão e desvios da calibração. Recomenda-se utilizar um sistema de regras de controle para verificar a estabilidade do sistema de medição².

Valores desejáveis ou recomendados . Os valores a seguir substituem os valores de referência e foram determinados a partir de dados epidemiológicos tratados estatisticamente, que relacionam as concentrações do colesterol com a prevalência de doença arterial coronariana (DAC).

Classificação ATP III - Colesterol Total, LDL e HDL (mg/dL)

Colesterol Total

Adultos ³	
Desejável	<200
Limiar elevado	200 - 239
Elevado	≥240

Colesterol LDL

Adultos ³	
Ótimo	<100
Limiar ótimo	100 - 129
Limiar elevado	130 - 159
Elevado	160 - 189
Muito elevado	≥190

Colesterol HDL

Adultos ³	
Baixo	<40
Elevado (desejável)	≥60

Colesterol Total (mg/dL)

Crianças e Adolescentes ⁴		
Idade: 2 a 19 anos	Desejável	<170
	Limitrofe	170 a 199
	Elevado	≥200

Colesterol LDL (mg/dL)

Crianças e Adolescentes ⁴		
Idade: 2 a 19 anos	Desejável	<110
	Limitrofe	110 a 129
	Elevado	≥130

Colesterol HDL (mg/dL)

Crianças e Adolescentes ⁴		
Idade: <10 anos	Desejável	≥40
Idade: 10 a 19 anos	Desejável	≥35

$$\text{mg/dL} \times 0,0259 = \text{mmol/L colesterol LDL}$$

Características de desempenho⁵

Estudos de recuperação . Em duas amostras com concentrações de LDL iguais a 55,2 mg/dL e 41,5 mg/dL foram adicionadas quantidades diferentes do analito, sendo obtidos os seguintes resultados:

Atividade (mg/dL)

Inicial	Concentração			Recuperação (%)
	Adicionada	Esperada	Encontrada	
55,2	53,3	108,5	110,3	101,7
41,5	43,1	84,6	82,9	98

O erro sistemático proporcional médio estimado é igual a -0,20 mg/dL para o nível de 130 mg/dL e -0,24 mg/L para o nível de 160 mg/dL ou 0,15%, significativamente menor que o erro sistemático analítico especificado pelo National Cholesterol Education Program (NCEP) que é $\leq \pm 4,0\%$.

Estudos de comparação de métodos . A exatidão do método foi verificada por comparação com o método de ultracentrifugação¹ sendo obtidos os seguintes resultados:

	Método Referência (MR)	LDL Liquiform
Número de amostras	54	54
Média (mg/dL)	125,1	122,5
Equação da regressão	LDL Liquiform = $0,96 * (MR) + 3,02$ mg/dL	
Coefficiente de correlação	0,96	

Utilizando a equação da regressão, o erro sistemático (bias) estimado é igual a -1,68% para o nível de 130 mg/dL e -2,11% para o nível de 160 mg/dL. Esses erros são menores que o erro sistemático analítico especificado pelo National Cholesterol Education Program (NCEP) que é $\leq \pm 4,0\%$.

Estudos de precisão . Os estudos de precisão foram realizados utilizando três amostras.

Repetitividade - imprecisão intra-ensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	98,1	0,72	0,73
Amostra 2	20	146,5	0,96	0,66
Amostra 3	20	209,8	1,31	0,62

Reprodutibilidade - imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	40	98,1	2,2	2,27
Amostra 2	40	142,7	2,8	1,95
Amostra 3	40	207,3	3,6	1,73

A imprecisão encontrada atende a especificação no National Cholesterol Education Program (NCEP) que é $\leq 4,0\%$.

O erro total (erro aleatório + erro sistemático) estimado é igual a 5,5% para o nível de 130 mg/dL e 5,9% para o nível de 160 mg/dL. Os resultados indicam que o método atende à especificação do NCEP para erro total ($\leq 12,0\%$).

Sensibilidade metodológica . Uma amostra não contendo colesterol LDL foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio tendo sido encontrado um valor igual a 0,278 mg/dL, equivalente à média de 20 ensaios mais dois desvios padrão.

Efeitos da diluição da matriz . Uma amostra com concentração igual 112,4 mg/dL foi utilizada para avaliar a resposta do sistema nas diluições da matriz com solução de NaCl 150 mmol/L (0,85%). Usando fatores de diluição iguais a 2 e 4 foi encontrada recuperação média de 101% que corresponde a um erro sistemático médio igual a 1%.

Significado clínico . A LDL é um produto do catabolismo da VLDL. A hidrólise dos triglicérides da VLDL pela lipoproteína lipase (LPL) leva à formação de uma lipoproteína de vida curta, denominada lipoproteína de densidade intermediária (IDL). Esta é, em seguida, catabolizada pela lipase hepática, formando a partícula de LDL, rica em colesterol.

O catabolismo da LDL ocorre no fígado e nos tecidos periféricos, através principalmente da interação desta lipoproteína com receptores de alta afinidade presentes na membrana celular. Após a ligação da LDL com o receptor na superfície celular, a membrana da célula se invagina, interiorizando a lipoproteína e formando vesículas endocíticas, as quais se fundem com lisossomos intracelulares, e a LDL é hidrolisada por enzimas. O componente protéico é hidrolisado a aminoácidos e o colesterol esterificado é hidrolisado a colesterol livre por ação de uma lipase ácida. Este colesterol formado é utilizado na síntese de membranas e na regulação de eventos metabólicos que envolvem a síntese de colesterol endógeno e a esterificação do colesterol livre. O colesterol formado inibe também a síntese dos receptores de LDL, interrompendo a fixação da LDL, evitando assim que as células fiquem sobrecarregadas de colesterol.

Com o aumento dos níveis de LDL no plasma, as células removedoras captam maiores quantidades da lipoproteína circulante para degradação. Um receptor no macrófago liga-se a formas oxidadas da LDL e as internaliza. Na parede arterial, tanto os macrófagos quanto as células de músculo liso, sobrecarregadas de ésteres de colesterol, por terem atuado no mecanismo de remoção descrito acima, transformam-se em células espumosas que são o marco da placa aterosclerótica.

Estudos retrospectivos e prospectivos demonstram claramente uma inter-relação curvilínea entre os níveis do colesterol sérico, mais especificamente o colesterol LDL, e a patogênese da arteriosclerose e da Doença Arterial Coronariana (DAC). Entretanto, observa-se que o colesterol HDL tem um efeito protetor na DAC.

Mesmo com valores de colesterol dentro dos limites desejáveis, valores elevados do colesterol LDL estão associados ao aumento do risco para DAC.

Valores aumentados de LDL podem ser encontrados no diabetes mellitus, no hipotireoidismo, nas hepatopatias, na doença renal crônica, na hipercolesterolemia familiar, na menopausa, em fumantes, em hipertensos, em indivíduos em uso de medicamentos como: atenolol, propranolol, captopril, carbamazepina, furosemida, lacidipina e anticoncepcionais orais.

Tanto o colesterol total quanto as frações LDL e VLDL podem ser diminuídas com dieta ou medicamento. A redução de 1% no valor do Colesterol Total diminui a prevalência de DAC em aproximadamente 2%.

As concentrações do colesterol nas frações LDL e VLDL e na fração HDL dependem de metabolismos distintos e não se deve fazer qualquer tentativa de buscar correlação entre seus valores de concentração.

Observações

1. A limpeza e secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

2. O laboratório clínico tem como objetivo fornecer resultados exatos e precisos. A utilização de água de qualidade inadequada é uma causa potencial de erros analíticos. A água deionizada ou destilada utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes, usar nas medições e para uso no enxágue final da vidraria, deve ter resistividade ≥ 1 megaohm.cm ou condutividade ≤ 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L. Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre produção de água alcalina com liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

Referências

- Bachorik PS, Ross JW. Clin Chem 1995;41:1414-20.
- Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. Clin Chem 1981; 27:493-501.

3. Executive Summary of the Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001;285:2486-97.

4. Leite PF, Martinez TLR, Halpern A, Cendoroglo MS, Novazzi JP, Fonseca FAH, Dias JCA. Risco cardiovascular: fatores metabólicos e nutricionais: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Loyola, 1994. p.56.

5. Labtest: Dados de Arquivo.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo	
LDL Liquiform	111-1/40	R1	1 X 30 mL
		R2	1 X 10 mL
		CAL	1 X 1,0 mL

Estão disponíveis aplicações para sistemas automáticos.

*O número de testes em aplicações automáticas **depende dos parâmetros de programação.**

Informações ao consumidor

[Termos e Condições de Garantia]

A **Labtest Diagnóstica** garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções sejam seguidos corretamente.

Labtest Diagnóstica S.A.

CNPJ: 16.516.296 / 0001 - 38
Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Vista Alegre - CEP 33400-000
Lagoa Santa - Minas Gerais Brasil - www.labtest.com.br

Serviço de Apoio ao Cliente | 0800 031 34 11 (Ligação Gratuita)
e-mail: sac@labtest.com.br

Revisão: Julho, 2011
Ref.: 280113

Copyright by Labtest Diagnóstica S.A.
Reprodução sob prévia autorização