



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO NA REDE NORDESTE DE
BIOTECNOLOGIA RENORBIO**

RODRIGO FREITAS MONTE BISPO

**EFEITOS DO EXTRATO ETANÓLICO DA *HIMANTHUS BRACTEATUS* E
OCOTEA LONGIFOLIA NAS FIBRAS ELÁSTICAS E TÚNICA MÉDIA DA AORTA
DE CAMUNDONGOS C57BL6J EM UM MODELO DE ATHEROSCLEROSE
EXPERIMENTAL**

**MACEIÓ
2016**

RODRIGO FREITAS MONTE BISPO

EFEITOS DO EXTRATO ETANÓLICO DA *HIMANTHUS BRACTEATUS* E
OCOTEA LONGIFOLIA NAS FIBRAS ELÁSTICAS E TÚNICA MÉDIA DA AORTA
DE CAMUNDONGOS C57BL6J EM UM MODELO DE ATEROSCLEROSE
EXPERIMENTAL

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação da
RENORBIO da Universidade Federal de
Alagoas, como requisito para obtenção do
grau de Doutor em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Benjamin
Brandão Pitta

MACEIÓ

2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Helena Cristina do Vale Pimentel

B622e Bispo, Rodrigo Freitas Monte.
Efeitos do extrato e tanálico de *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* nas fibras elástica e túnica média da aorta de camundongos C5BL6J em modelo de aterosclerose experimental / Rodrigo Freitas Monte Bispo. - 2016.
90 f. : il.

Orientador: Guilherme Benjamin Brandão Pitta.
Tese (Doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO Maceió, 2016.

Bibliografia. f. 59-64.

Apêndice: f.65-74

Anexo: f. 65-89.

1. Aterosclerose. 2. Camundongos. 3. *Himatanthus bracteatus*.
4. *Ocotea longifolia*. 5. Fibras elásticas Aterosclerose. 6. Hiperplasia miointimal. I. Título. CDU: 547.21:616-073.7

RODRIGO FREITAS MONTE BISPO

“Efeitos do extrato etanólico da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* nas fibras elásticas e túnica média da aorta de comundongos C57BL6J em um modelo de aterosclerose experimental”.

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 Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 01/04/2016.

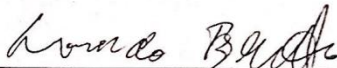
BANCA EXAMINADORA



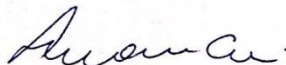
Prof. Dr. Guilherme Benjamim Brandão Pitta (Orientador/Presidente UNCISAL)
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas -UNCISAL



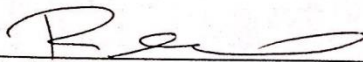
Prof. Dr. Célio Fernando de Sousa Rodrigues
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof. Dr. Leonardo Broetto
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof.^a. Dr.^a. Luciana Aparecida Corá
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas – UNCISAL



Prof. Dr. Pedro de Lemos Menezes
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas – UNCISAL

Dedico esse doutorado a ao Nosso Deus, a minha Família e minha companheira Sthephanny Barbalho Gomes por terem me dado forças, saúde mental e física, além de perseverança para superar os muitos obstáculos, que surgiram, e por terem me protegido e aos meus colegas durante nossas viagens em busca do conhecimento. Peço a Deus que continue me iluminando e aumentando minha fé e que o conhecimento por mim adquirido sirva à ciência e à população.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, especialmente, à minha companheira, STEPHANNY BARBALHO GOMES, pela paciência, compreensão, dedicação e força dela para com ela mesma e para comigo. Essa vitória é nossa.

Ao professor, Doutor CÉLIO FERNANDO DE SOUSA RODRIGUES, meu muito obrigado por ter permitido utilizar o laboratório de pesquisa em arteriosclerose da UNCISAL.

Ao Professor, Doutor GUILHERME BENJAMIN BRANDÃO PITTA, por ter sido meu orientador, pelo seu excelente trabalho de ensinar e de nunca parar com esse ideal tão bonito que é a pesquisa e a docência e sofrimento nesse país, que não dá o devido valor à educação.

Ao Professor, Mestre ALDEMAR ARAÚJO CASTRO, pela transmissão dos conhecimentos de informática, estatística e metodologia científica. Além da amizade cultivada e incentivos.

Aos meus amigos da FITS, UNCISAL, UFAL e pós-graduação pela amizade e troca de conhecimentos.

RESUMO

A aterosclerose é responsável pelo maior índice de morbidade e mortalidade que ocorre no mundo. Esta doença ocorre inicialmente através do acúmulo de colesterol e proliferação de células musculares lisas no endotélio, que leva a sua inflamação, endurecimento e espessamento da parede das artérias. No Brasil, o Ministério da Saúde regulamentou a proposta de Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde, que incentiva a pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos a partir de plantas medicinais. A *Himatanthus bracteatus* pesquisas mostraram ação no ácido araquidônico em ratos e uma potente atividade analgésica e antiinflamatória e antitumoral, já a *Ocotea longifolia* foram encontradas evidências de atividade antimicrobiana com eficácia na inibição COX-1, COX-2. Sendo assim é relevante verificar a eficácia dos extratos etanólicos da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* na espessura da túnica média e nas fibras elásticas na parte descendente da aorta de camundongos C57BL6J. Os objetivos foram verificar a espessura da túnica média e percentual de fibras elásticas da parte descendente da artéria aorta de camundongos induzidos a aterosclerose experimental. Foi um estudo experimental em animais por 42 dias. Os animais foram camundongos C57BL6J, submetidos a dieta aterosclerótica (1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico e gordura de 15%). Os animais foram divididos em 7 grupos: grupo C (controle 1mL de soro fisiológico 0,9%, n=7), grupo H (hiperlipidêmico 1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico e gordura de 15%, n=7), grupo HT25 (*Himatanthus bracteatus* 25mg/mL, n=7), grupo HT12,5 (*Himatanthus bracteatus* 12,5mg/mL, n=7), grupo OT25 (*Ocotea longifolia* 25mg/mL, n=7), grupo OT12,5 (*Ocotea longifolia* 12,5mg/mL, n=7) e grupo R (rosuvastatina 0,27mg/mL, n=7) total de 49 animais. As variáveis primárias foram a média da espessura da túnica média e percentual de fibras elásticas da parte descendente da aorta. Variáveis secundárias foram: colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, massa corpórea, peso do coração, glicemia, expressão dos marcadores TNF- α , CD-68 e isoprostano. A análise estatística foi realizada usando como ferramenta software GraphPad Prism (versão 5.0), os dados desta análise foram expressos em média, desvio padrão e erro padrão. Para os resultados que não seguiram a distribuição normal foi utilizado o teste de KRUSKAL-WALLIS e o pós-teste DUNNS. Para comparações entre os grupos será utilizado o ANOVA one-way e o pós-teste de TUKEY para os dados que seguem a distribuição normal. Foi calculado o intervalo de confiança de 95% para cada ponto estimado. Os extratos etanólicos da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* reduziram de forma significativa a espessura da túnica média da parte descendente da aorta, contudo não houve diferença significativa no percentual de fibras elásticas. Os extratos obtiveram redução significativa dos parâmetros sanguíneos: colesterol total, LDL, triglicerídeos e através da análise imunohistoquímica do TNF- α , CD-68 e isoprostano.

Palavras-Chave: Aterosclerose. Camundongos. *Himatanthus bracteatus*. *Ocotea longifolia*. Fibras elásticas.

ABSTRACT

Atherosclerosis accounts for the highest illness and mortality rates throughout the world. This disease begins with the accumulation of cholesterol and the proliferation of smooth muscle cells in the endothelium, which leads to its inflammation as well as the hardening and thickening of arterial walls. The Brazilian Health Ministry issued the National Policy of Integrative and Complementary Practices in the public healthcare system, which encourages phytotherapeutic research and development based on the use of medicinal plants. Studies involving *Himatanthus bracteatus* have demonstrated action on arachidonic acid in rats as well as analgesic, anti-inflammatory and antimicrobial/antibacterial properties. Evidence of antimicrobial/antibacterial activity has also been found in *Ocotea longifolia*, with effective COX-1 and COX-2 inhibition. It is therefore important to determine the effect of alcoholic extracts of *Himatanthus bracteatus* and *Ocotea longifolia* on the thickness of the tunica media and elastic fibers in the descending portion of the aorta in C57BL6J mice. The aim of the present study was to determine the thickness of the tunica media and percentage of elastic fibers in the descending portion of the aorta of mice in which experimental atherosclerosis was induced. A 42-day experimental animal study was conducted in which C57BL6J mice were submitted to an atherosclerotic diet (1.25% cholesterol, 0.5% cholic acid and 15% fat). Forty-nine mice were divided into seven groups: C group (control – one mL of 0.9% saline solution; n = 7), H group (hyperlipidemic - 1.25% cholesterol, 0.5% cholic acid and 15% fat; n = 7), HT25 group (*Himatanthus bracteatus* [25 mg/mL]; n = 7), HT12.5 group (*Himatanthus bracteatus* [12.5 mg/mL]; n = 7), OT25 group (*Ocotea longifolia* [25 mg/mL]; n = 7), OT12.5 (*Ocotea longifolia* [12.5 mg/mL]; n = 7) and R group (rosuvastatin [0.27 mg/mL]; n = 7). The primary variables were mean thickness of the tunica media and percentage of elastic fibers in the descending portion of the aorta. The secondary variables were total cholesterol, HDL, LDL, triglycerides, body mass, heart mass, blood sugar concentration and expression of the markers TNF- α , CD-68 and isoprostan. Statistical analysis was performed with the aid of the GraphPad Prism program (version 5.0). The data were expressed as mean, standard deviation and standard error. The Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test were used for data with non-normal distribution. One-way analysis of variance and Tukey's post hoc test were used for data with normal distribution. A 95% confidence interval was calculated for each estimated point. The alcoholic extracts of *Himatanthus bracteatus* and *Ocotea longifolia* led to a significant reduction in the thickness of the tunica media of the descending portion of the aorta. However, no significant change occurred in the percentage of elastic fibers. The extracts also led to significant reductions in total cholesterol, LDL and triglycerides. Moreover, the immunohistochemical analysis revealed significant changes in the expression of TNF- α , CD-68 and isoprostane.

Keywords: Atherosclerosis. Mice. *Himatanthus bracteatus*. *Ocotea longifolia*. Elastic fibers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Imagem demonstrando a mensuração dos 4 pontos ortogonais da parte descendente da aorta do animal 3 (IMAGE-PRO PLUS 4.5) grupo *Himatanthus bracteatus* 25mg/mL. Coloração fucsina-resorcina. Corte transversal. Objetiva 10x..... 32
- Figura 2 – Imagem demonstrando a mensuração de fibras elásticas de 53,99% da área da parte descendente da aorta do animal 3 (IMAGE-PRO PLUS 4.5) grupo controle. Coloração fucsina-resorcina. Corte transversal. Objetiva 40x.....33
- Figura 3 – Imagem demonstrando as fibras elásticas da parte descendente da aorta do animal 3 (IMAGE-PRO PLUS 4.5) grupo *Himatanthus bracteatus* 25mg/mL. Coloração fucsina-resorcina. Corte transversal. Objetiva 40x..... 39
- Figura 4 – Imagem demonstrando o limite entre as túnicas externa e média da parte descendente da aorta do animal 1 (IMAGE-PRO PLUS 4.5) grupo hiperlipidêmico. Coloração picrosirius que é empregada na histologia como específica para colágeno. Corte transversal. Objetiva 40x..... 40
- Figura 5 – O marcador TNF – α foi positivamente expresso na parte descendente da aorta (musculatura lisa da túnica média e íntima): (A) grupo C, (B) grupo H, (C) grupo HT25, (D) grupo OT25. A intensidade de maior expressão foi para o (B) grupo H. Corte transversal. Objetiva de 40x..... 48
- Figura 6 – O marcador CD-68 foi positivamente expresso na parte descendente da aorta (musculatura lisa da túnica médi e íntima): (A) grupo C, (B) grupo H, (C) grupo HT25, (D) grupo OT25. A intensidade de maior expressão foi para o (B) grupo H. Corte transversal. Objetiva

de 40x..... 49

Figura 7 – O marcador isoprostano foi positivamente expresso na parte descendente da aorta (musculatura lisa da túnica média e íntima): grupo C, (B) grupo H, (C) grupo HT25, (D) grupo OT25. A intensidade de maior expressão foi para o (B) grupo H. Corte transversal. Objetiva de 40x..... 50

Figura 8 – Imagem demonstrando o limite entre as túnicas externa e média da parte descendente da aorta. Coloração picosirius: (A) grupo C, (B) grupo H, (C) grupo HT25, (D) grupo OT25. Corte transversal. Objetiva de 40x..... 51

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – A espessura da túnica média da parte descendente da aorta durante a administração dos extratos da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* (25mg/ML e 12,5mg/mL)..... 37
- Gráfico 2 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo não houve diferença significativa entre todos os grupos comparados. Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos $p= 0,1134$ 38
- Gráfico 3 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo houve diferença significativa entre o grupo H hiperlipidêmico comparado com todos os grupos testados $p<0.0001$41
- Gráfico 4 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo houve diferença significativa entre o grupo H hiperlipidêmico comparado com todos os grupos O25 *Ocotea longifolia* 25mg/mL e o grupo O12,5 *Ocotea longifolia* 12,5mg/mL testados $p<0.0001$41
- Gráfico 5 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo houve diferença significativa entre o grupo H hiperlipidêmico comparado com os grupos O12,5 *Ocotea longifolia* 12,5mg/mL, H12,5 *Himatanthus bracteatus* 12,5mg/mL e rosuvastatina 0,27mg/mL testados $p<0.0001$ 42
- Gráfico 6 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo houve diferença significativa entre o grupo H hiperlipidêmico comparado com os grupos: O25 *Ocotea longifolia* 25mg/mL, O12,5 *Ocotea longifolia* 12,5mg/mL, H12,5 *Himatanthus bracteatus* 12,5mg/mL e rosuvastatina 0,27mg/mL testados $p<0.0001$, exceto comparado como grupo H25 *Himatanthus bracteatus* 25mg/mL.....43

Gráfico 7 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo não houve diferença significativa no peso inicial dos grupos.....	44
Gráfico 8 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo não houve diferença significativa no peso dos animais ao término do experimento.....	45
Gráfico 9 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo não houve diferença significativa no peso do coração comparado entre os grupos.....	45
Gráfico 10 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo não houve diferença significativa na glicemia dos animais no início do experimento.....	46
Gráfico 11 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo não houve diferença significativa na glicemia dos animais no dia 21 do experimento.....	46
Gráfico 12 – Conforme demonstrado no gráfico acima houve diferença significativa na glicemia dos animais do grupo <i>Himatantus bracteatus</i> 25mg/mL ao término do experimento.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Família: Apocynaceae Gênero: <i>Himatanthus</i>	21
Quadro 2 – Atividades Farmacológica.....	23
Quadro 3 – Quadro resumo de uso de ocotea longifolia Kunth.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ECM	Matriz extracelular
et al.	E colaboradores (do latim, <i>et alii</i>)
HDL	Lipoproteína de alta Densidade
DL50	Concentração de um composto necessária para reduzir o crescimento populacional de organismos, animais, incluindo células eucarióticas, em 50 %, <i>in vivo</i>
LDL	Proteína de Baixa Densidade
mg/d	Miligramas por dia (massa por tempo)
µg/g	Micrograma por grama (massa por peso)
µg/ML	Micrograma por mililitro (massa por volume)
mg/mL	Micrograma por mililitro
µm	Micrômetro (unidade de comprimento)
OMS	Organização Mundial de Saúde
RENORBIO	Rede Nordeste de Biotecnologia
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UNCISAL	Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

LISTA DE SÍMBOLOS

® Marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Hipótese.....	17
1.2	Objetivos.....	17
1.2.1	Objetivo geral.....	17
1.2.2	Objetivos específicos.....	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Aterosclerose e elastina.....	19
2.2	<i>Himatanthus bracteatus</i>	21
2.3	<i>Ocotea longifolia</i>	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Tipo de estudo.....	27
3.2	Local.....	27
3.3	Amostra.....	27
3.4	Procedimentos.....	27
3.5	Variáveis.....	34
3.5.1	Variável primária.....	34
3.5.2	Variáveis secundárias.....	35
3.6	Método estatístico.....	35

3.6.1	Cálculo do tamanho da amostra.....	35
3.6.2	Análise estatística.....	36
4	RESULTADOS.....	37
4.1.	Variáveis primárias.....	37
4.2	Variáveis secundárias.....	40
5	DISCUSSÃO.....	52
6	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	APÊNDICE – Tabelas com valores de média, desvio padrão e erro padrão.....	65
	ANEXOS.....	75
	ANEXO A – Comprovante Comitê de Ética da UNCISAL.....	76
	ANEXO B – Comprovante de compra da dieta (ração).....	77
	ANEXO C – Patente depositada no INPI.....	78
	ANEXO D – Protocolo Colesterol total.....	79
	ANEXO E – Protocolo HDL.....	83
	ANEXO F – Protocolo triglicerídeos.....	87

1 INTRODUÇÃO

Cada cultura apresenta um conjunto de conhecimentos e práticas para o reconhecimento e o diagnóstico de doenças, meios para o tratamento e para manutenção da saúde, formando o que se conhece como “sistemas médicos”, os quais são passados entre gerações e muitos pesquisadores tem utilizado dos conhecimentos etnobotânicos para por a prova a eficácia do uso de plantas medicinais usando pesquisas experimentais. Os efeitos de várias substâncias têm sido difundidas para o tratamento das doenças como diabetes, hipertensão, problemas hepáticos, obesidade e redução do colesterol (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

O excesso de peso e as dislipidemias já estão estabelecidos na literatura científica como fatores determinantes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. No Brasil, estas doenças constituem a principal causa de morbimortalidade e a hiperlipidemia é uma das principais causas da aterosclerose (CARVALHO et al., 2007).

A aterosclerose ocorre inicialmente através do acúmulo de colesterol e proliferação de células musculares lisas no endotélio, que leva a sua inflamação, endurecimento e espessamento da parede das artérias sendo a principal causa para o espessamento da túnica média arterial e hiperplasia miointimal (CORREA-CAMACHO; DIAS-MELICIO; SOARES, 2007; ENGELHORN et al., 2006).

O aumento do complexo médio-intimal (túnica média e hiperplasia miointimal) da artéria está relacionado com a maioria dos fatores de risco cardiovasculares: sexo masculino, história familiar de acidente vascular cerebral ou infarto agudo do miocárdio, tabagismo, diabetes melito, dislipidemia, hipertrofia do ventrículo esquerdo, hiper-homocisteinemia e idade. O espessamento médio-intimal arterial ajuda a estabelecer com mais precisão o risco cardiovascular. (ENGELHORN et al., 2006).

No Brasil, o Ministério da Saúde regulamentou a proposta de Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, que incentiva a pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos a partir de plantas medicinais. O objetivo desta política é garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo a utilização sustentável

da biodiversidade e o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BARROS; SIEGEL; SIMONI, 2007).

Realizamos uma pesquisa em várias bases de dados sobre artigos publicados com as plantas *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* e a maioria dos trabalhos publicados verificavam a atividade antinociceptiva, estudos taxonômicos, capacidade antifúngica e antitumoral, encontrou-se poucos artigos verificando o efeito dos extratos etanólicos das plantas *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* na aterosclerose, o que fez indagar seu efeito nas fibras elásticas, túnica média arterial e perfil lipídico em camundongos. Assim, é relevante responder à pergunta de pesquisa: qual o efeito da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* nas fibras elásticas e túnica média de camundongos C57BL6J submetidos um modelo de arteriosclerose experimental?

1.1 Hipótese

A hipótese é que o extrato etanólico da *Himatanthus bracteatus* e da *Ocotea longifolia* são eficazes na redução do espessamento da túnica média, aumento do percentual de fibras elásticas da parte descendente da aorta de camundongos C57BL6J submetidos a um modelo de aterosclerose experimental.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Verificar a eficácia dos extratos etanólicos da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* na redução do espessamento da túnica média e no aumento do percentual de fibras elásticas da aorta torácica de camundongos C57BL6J submetidos a um modelo de arteriosclerose experimental.

1.2.2 Objetivos específicos

Determinar:

- ✓ espessura da túnica média;
- ✓ percentual de fibras elásticas;
- ✓ colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, massa corpórea, peso do coração e glicemia dos camundongos;

- ✓ expressão de marcadores inflamatórios TNF- alfa e CD-68;
- ✓ - a expressão do marcador de estresse oxidativo isoprostano.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aterosclerose e elastina

A aterosclerose e suas complicações constituem o predominate causa de morte em todo o mundo. Até hoje, a regressão das lesões ateroscleróticas continua sendo o padrão ouro para a maior parte da indústria farmacêutica ou estratégias terapêuticas. Alternativamente, um crescente corpo de evidências descreve a importância clínica da composição das lesões ateroscleróticas. A composição da placa está intimamente associada com a tradicional (por exemplo, dislipidemia, hipertensão) e não-tradicionais (por exemplo, marcadores inflamatórios, metaloproteinases de matriz) fatores de risco cardiovascular. A modificação dos fatores de risco tem sido cada vez mais apontado como o alvo de todas as intervenções terapêuticas (MOUSTARDAS et al., 2014).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica multifatorial, complexa doença que afeta artérias de grande porte. Descobertas recentes têm estabelecido um papel fundamental para a inflamação na mediação de diferentes estágios desta doença, revelando uma diversidade de atrativos do potenciais alvos que podem ser explorados no tratamento dessa patologia. Durante as etapas iniciais da doença inflamatória associada à idade, encontramos infiltração de monócitos-macrófagos, produzindo citocinas que mantem um ambiente pró-inflamatório no espaço subendotelial, o que resulta na progressão da estria gordurosa. Nos últimos anos, em particular a atenção tem sido dada ao papel de elastina degradação em processos fisiopatológicos associados com a aterosclerose (GAVRAL et al., 2014).

Doenças proliferativas vasculares fazem parte de um grupo heterogêneo de desordens que incluem aterosclerose, restenose coronária, falha de enxerto e arteriopatia transplante que levam a estreitamento arterial, a restrição do fluxo de sangue e de tecidos isquêmicos. Estas doenças surgem a partir de uma complexa resposta fisiopatológica à injúria por múltiplos fatores, incluindo hipercolesterolemia, diabetes, tabagismo, hipertensão e lesão mecânica (força de cisalhamento). Embora suas etiologias são diversas, esses transtornos todos compartilham uma característica patológica comum: a acumulação de células de músculo liso vascular e tecido conjuntivo fibroso na íntima entre o endotélio e a túnica média da parede arterial. Esta patologia fibrocelular, conhecida como a formação da neointima,

resulta da ativação, proliferação e migração de células de músculo liso arterial (KARNIK et al., 2003).

A elastina é a proteína da matriz extracelular dominante depositada na parede arterial e pode contribuir com até 50% de o seu peso seco. O produto protéico do gene da elastina é sintetizado pelas células musculares lisas vasculares e secretada como um monômero, tropoelastina. Depois de pós-tradução modificação, tropoelastina é reticulada e organizadas em polímeros elastina que formam anéis concêntricos de lamelas elásticas ao redor do lúmen arterial. Cada lamela elástica alterna com um anel de músculo liso, e fornece a comprimento que as artérias precisam absorver e transmitir força hemodinâmica (KARNIK et al., 2003).

A parte descendente da aorta é uma grande artéria com função de regulação da pressão arterial sistólica, recebendo o quantitativo de sangue de ejeção através da expansão e manutenção pressão arterial diastólica. Conseqüentemente, funcionamento normal da aorta requer consistentes propriedades mecânicas que incluem conformidade e contractilidade, comprimento, colágeno e elastina, sendo as duas últimas responsáveis por fornecer a parede da aorta resistência à tração e recolhimento elástico e contribuir para manter a conformidade propriedades da aorta. Contractilidade é referida pela a força contrátil gerada principalmente pelas células musculares lisas e fornece o componente de tensão ativa dentro da aorta. Juntos, o meio extracelular e celular componentes regulam as propriedades mecânicas no interior da aorta e participam intimamente da fisiopatologia vascular na aterosclerose. Com o avançar da idade o envelhecimento promove mudanças na geometria da aorta humana e dependente do aumento do diâmetro e espessura da aorta. Além disso, o envelhecimento foi associado com fibrose numa número de órgãos incluindo o aorta. Tem sido relatado a quantidade de elastina possui uma semelhança em indivíduos jovens, no entanto, há uma redução em indivíduos mais velhos. Os papéis precisos destas mudanças relacionadas à idade em alterar a função mecânica da aorta não são bem compreendidos (WHEELER, 2015).

Usando modelos transgênicos Wang et al. (2013) verificaram a correlação entre e placa aterosclerótica e composição num modelo de camundongo induzidos a aterosclerose experimental usando dieta. Verificaram defeitos genéticos que modificam a elastina podem levar a modificações na adesão da placa. A metaloelastase de macrófagos é conhecida por ser importante na degradação da

elastina, promovendo a expansão da lesão e desestabilização da placa aterosclerótica

2.2 *Himatanthus bracteatus*

A utilização de plantas medicinais como alternativa terapêutica vem atingindo um público cada vez maior, este crescimento requer dos pesquisadores um maior empenho no sentido de fornecer informações relativas à correta identificação, do sistema produtivo destas plantas e preparo adequado de medicamentos. A família Apocynaceae (família da *Himatanthus bracteatus*) pode ser considerada uma das maiores fontes vegetais de constituintes químicos de utilidade na medicina moderna. Várias substâncias têm sido isoladas a partir de espécies desta família. Muitas delas representam protótipos de classes farmacológicas distintas de fármacos e fazem parte da história da farmacologia e da terapêutica. O isolamento de alcalóides de plantas pertencentes aos gêneros *Rauvolfia*, *Vinca*, *Catharanthus* e *Alstonia* são exemplos. Na literatura não há relatos para a presença deste composto para *H. sucuuba*. Entretanto, são comprovadas as atividades gastroprotetivas para os alcalóides indólicos de *H. lancifolius* (LUZ et al., 2014).

Himatanthus bracteatus é uma espécie nativa do bioma Mata Atlântica, ocorrendo frequentemente no Nordeste e Sudeste brasileiro, apresentando grande potencial paisagístico e para o reflorestamento de áreas degradadas. Popularmente conhecida como “Janaúba”, é habitualmente encontrada em margens de matas, exposta à luminosidade e ao vento (PUGAS; PIGOZZO; NEVES, 2009). Seguem as plantas do gênero *Himatanthus*:

Quadro 1 – Família: Apocynaceae Gênero: *Himatanthus*

Sub-gênero: <i>Obovatae</i>	Sub-gênero: <i>Lanceolatae</i>
<i>H. obovatus</i>	<i>H. stenophyllus</i>
<i>H. drasticus</i>	<i>H. lancifolius</i>
<i>H. fallax</i>	<i>H. phagedaenicus</i>
<i>H. articulatus</i>	<i>H. speciosus</i>
<i>H. sucuuba</i>	<i>H. bracteatus</i>
<i>H. tarapotensis</i>	<i>H. semilunatus</i>
	<i>H. attenuatus</i>

Fonte: Plumel (1990)

O homem tem utilizado diferentes formas de terapia para o alívio da dor, e inflamação, entre elas, o uso de plantas. A planta denominada papoula (*Papaver somniferum* L.) é um exemplo disto; dela foi isolada em 1806 a morfina, utilizada até hoje nos tratamentos da dor, e tem papel importante para os pacientes terminais diagnosticados com vários tipos de câncer, por amenizar as dores intensas peculiares a estas enfermidades (RODRIGUES; DUARTE-ALMEIDA; PIRES, 2010).

Segundo França (2011) a janauba é uma planta do gênero *Himatanthus*, da família das Apocináceas. Esse gênero encontra-se distribuído nos trópicos e subtropicais da América do Sul, possui 13 espécies, compreendendo 8 variedades. Estudos químicos revelaram a presença de depsídeos, iridóides e triterpênos em *Himatanthus sucuuba*. Atualmente, estudos farmacológicos evidenciaram as atividades anti-inflamatória e analgésica dos iridóides presentes na casca de seu caule e no látex, o efeito cicatrizante e uma baixa toxicidade reprodutiva e teratogênica em ratas, indicando que seu consumo é seguro na espécie humana no tratamento de gastrites e hemorróidas.

Segundo Baratto (2010) existem poucas citações na literatura sobre a constituição química e as propriedades biológicas das espécies de *Himatanthus*, o gênero destaca-se principalmente pela presença de alcalóides, iridóides e ésteres triterpênicos, isolados principalmente na casca e caule, mas também presentes em menor quantidade nas folhas e raízes. Com relação a atividades farmacológicas as espécies do gênero *Himatanthus* possuem diversas indicações populares para o tratamento de várias doenças, porém foram pouco estudadas cientificamente a fim de comprovar seus efeitos terapêuticos. Segue um quadro com as atividades farmacológicas:

Quadro 2 – Atividades Farmacológica.

Espécie	Parte utilizada	Ação farmacológica ou indicação popular	Referência
<i>H. attenuatus</i>	folhas	Citotoxicidade contra células tumorais de leucemia promielocítica aguda; inibição da glucose-6-fosfatase em microsomos; diminuição da pressão arterial sem alteração da frequência cardíaca; letalidade significativa contra larvas <i>Artemia salina</i> .	Suffredini et al. (2002) Jiménez et al. (2001)
<i>H. bracteatus</i>	Folhas	Indicação indígena como antipirético;	Castillo et al. (2007)
<i>H. drasticus</i>	Látex	Indicação popular para tratamento de casos inoperáveis de câncer de pulmão e linfático, vermes intestinais, febre, menstruação irregular, infertilidade feminina e úlceras gástricas.	Lorenzi e Matos (2008)
<i>H. obovatus</i>	Raízes Folhas e caules	Leishmanicida contra promastigotas de <i>Leishhmania donovani</i> ; Inibição da replicação de células sanguíneas mononucleares periféricas.	Mesquita et al. (2005) Souza-Fagundes et al. (2002)

Quadro 2 – Atividades Farmacológica.

Espécie	Parte utilizada	Ação farmacológica ou indicação popular	Conclusão
			Referência
H. succuba	Cascas do caule Látex Cascas da raiz	Indicação popular para tratamento de gastrites, hemorróidas e anemia; tratamento de feridas externas; antibacteriana contra cepas de <i>Clostridium histolyticum</i> e <i>Bacterioides fragilis</i> ; aumento da permeabilidade capilar; citotóxica contra linhagens de células tumorais; inibição da MAO; anti-inflamatória (redução da formação do edema); inibição da produção de óxido nítrico (NO) macrófagos e de INF.	Endo et al. (1994) Neto et al. (2002) Villegas et al. (1997) Wood et al (2001) Miranda et al. (2000) Souza et al (2006)

Fonte: Baratto (2010)

2.3 *Ocotea longifolia*

A família Lauraceae (família da planta *Ocotea longifolia*) pertence à ordem Laurales, possui distribuição pantropical sendo bem representada na América, Ásia tropical, Austrália e Madagascar pouco expressiva no sul da África. No Brasil, a família é reconhecida por 23 gêneros e 434 espécies, dos quais 18 gêneros e 125 espécies foram citados para a região Nordeste do Brasil (SANTOS; ALVES, 2012).

Possui nome científico *Ocotea longifolia*, família Lauraceae, nomes vulgares caneleira-de-cheiro, louro-de-cheiro, preciosa-de-caxiuanã (Pará); canela-de-cheiro, louro, louro-abacate, louro-alcatrão, louro-de-capoeira. Árvore grande de raminhos sulcados, obtuso-angulosos. Possui folhas pecioladas de até 30cm de comprimento. Flores branco-amareladas ou esverdeadas, fruto ovóide, amarelado. Planta nativa da Amazônia, sendo mais comumente encontrada nos estados do Amazonas e Pará (CORRÊA, 1984).

É utilizada para várias finalidades dentre elas: cosmético, usado na fabricação de sabonetes, dentifrícios, artigos de perfumaria. Também usada como fungicida, inseticida e uso medicinal para reumatismo, artrismo (FERRARI, 1979). Segue um quadro a parte da planta e seu uso, bem como imagem de suas folhas:

Quadro 3 – Quadro resumo de uso de *ocotea longifólia* Kunth.

Quadro resumo de uso de *Ocotea longifolia* Kunth. :

Parte da planta	Forma	Categoria do uso	Uso
-	Óleo	Cosmético	Fabricação de sabonetes, dentifrícios, artigos de perfumaria e cosméticos.
-	Extrato	Fungicida	Possui atividade contra alguns fungos.
Caule	-	Fungicida	O composto isolado da casca, asaricina, possui atividade fungicida.
Caule	-	Inseticida	O composto isolado da casca, asaricina, possui atividade inseticida.
Caule	Óleo	Medicinal	Da casca perfurada escorre um óleo tido como um poderoso resolvente.
Fruto	Óleo	Medicinal	Extraído via destilação, substitui o óleo essencial de limão, muito útil para combater reumatismo, artrismo, paralisias e o beribéri.
Fruto	Ungüento	Medicinal	O óleo dos frutos pode ser utilizado em unguentos contra o reumatismo; os frutos amassados com banha de porco, também na forma de unguentos, possuem efeito contra o beribéri.

Fonte: Corrêa (1984); Ferrari (1979).

Ocotea longifólia



Fonte: CHICAGO (USA). Field Museum.

Ocotea é constituída por cerca de 350 espécies distribuídas na América tropical e subtropical, desde o México até a Argentina, ocorrendo também em Madagascar, na África e nas Ilhas Canárias. Algumas das espécies que ocorrem no Estado do Rio de Janeiro foram agrupadas, em complexos, que muitas vezes reúnem um grande número táxons, sendo que alguns destes, necessitam de estudos mais aprofundados com análise de exemplares tipo, bem como, o maior número possível de material botânico, para melhor delimitação da amplitude morfológica e da distribuição geográfica dessas espécies. São reconhecidas para o Estado do Rio de Janeiro até o momento 52 espécies com base na literatura (QUINET, 2005)

Costa et al. (2015) verificaram a eficácia de algumas espécies deste gênero (Lauraceae) onde foram observadas atividades anti-bacteriana, anti-inflamatória com inibição da COX-1, inibidores de COX-2. O objetivo deste estudo foi investigar compostos fitoquímicos da planta espécie *Ocotea notata* usando extrato bruto, sendo avaliada para a atividade antimicobacteriana. O extrato foi analisado quimicamente por HPLC e revelou maior presença de flavonóides (afzelina e isoquercitrina), estes foram isolados e se mostraram capazes de inibir a produção de óxido nítrico pelos macrófagos.

Yamaguchi, Alcantara e Veiga Junior (2012) avaliaram os extratos obtidos em etanol de galhos e folhas de 20 espécies de Lauraceae (rico em alcalóides) foram coletados em uma Reserva Florestal e avaliados quanto as atividades antioxidante frente ao radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila e inibidora da enzima acetilcolinesterase. O extrato da *Ocotea minor* foram os mais ativos na inibição da enzima acetilcolinesterase, apresentando também pronunciada atividade antioxidante.

Brotto, Cervi e Santos (2013) descrevem que apesar da grande importância a família Lauraceae é insuficientemente conhecida no Paraná. Os primeiros estudos taxonômicos referidos para o estado são relativos aos gêneros *Ocotea*. Desde então uma lacuna de 30 anos separou-os dos estudos mais recentes. Na lista de espécies da flora do Brasil, reconhecem para o estado do Paraná 66 espécies de Lauraceae, distribuídas em 12 gêneros. *Ocotea* está representada por 30 espécies, das quais 29 ocorrem no bioma Mata Atlântica e dez no Cerrado. A falta de um trabalho taxonômico atualizado sobre o gênero *Ocotea* no Paraná, a escassez de coletas e as determinações equivocadas dos espécimes, têm dificultado a identificação.

3 MATERIAL E MÉTODO

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas - UNCISAL, Maceió, sob o número 60-A (anexo).

3.1 Tipo de estudo

Estudo experimental por 42 dias

3.2 Local

Biotério da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas - UNCISAL, Maceió.

3.3 Amostra

Foram usados 49 camundongos C57BL6J machos idade de 3 meses, oriundos do biotério da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas – UNCISAL e foram distribuídos em 7 grupos, os animais pesavam entre 30,90g e 24,82g. Respeitaram-se as leis:

- ✓ Lei 6638, de 8 de maio de 1979 - Normas para a Prática Didático-Científica da Vivissecção de Animais;
- ✓ Declaração Universal dos Direitos do Animal, UNESCO, 15 de Outubro de 1978;
- ✓ Lei de crimes ambientais (Lei nº 9.605/1998);
- ✓ As normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA, em 1991, sobre os Princípios Éticos na Experimentação Animal.

3.4 Procedimentos



Os animais foram randomizados, enumerados (de 1 a 49) e depois distribuídos em cada grupo como demonstra a tabela a seguir:

Tabela 1 – Animais randomizados, enumerados (de 1 a 49)

N°	Grupo Controle (n=7) Peso (g)	Grupo Hiperlipidêmico (n=7) Peso (g)	Grupo Ocotea longifolia 12,5mg/mL (n=7) Peso(g)	Grupo Ocotea longifolia 25mg/mL (n=7) Peso(g)	Grupo Himatanthus bracteatus 12,5mg/mL (n=7) Peso(g)	Grupo Himatanthus bracteatus 25mg/mL (n=7) Peso(g)	Grupo Rosuvastatina 0,27mg/mL (n=7) Peso (g)
1	30,90	30,81	30,15	30,18	29,79	29,81	30,45
2	29,68	28,96	28,88	28,88	28,71	28,85	28,89
3	28,48	28,41	28,21	28,24	28,08	28,16	28,33
4	28,02	27,87	27,56	27,49	27,43	27,55	27,68
5	27,17	27,12	26,92	26,96	26,77	26,86	26,97
6	26,75	26,56	26,33	26,36	25,98	26,25	26,48
7	25,52	25,40	25,06	25,29	24,82	24,85	25,36

Fonte: Elaborada pelo autor.

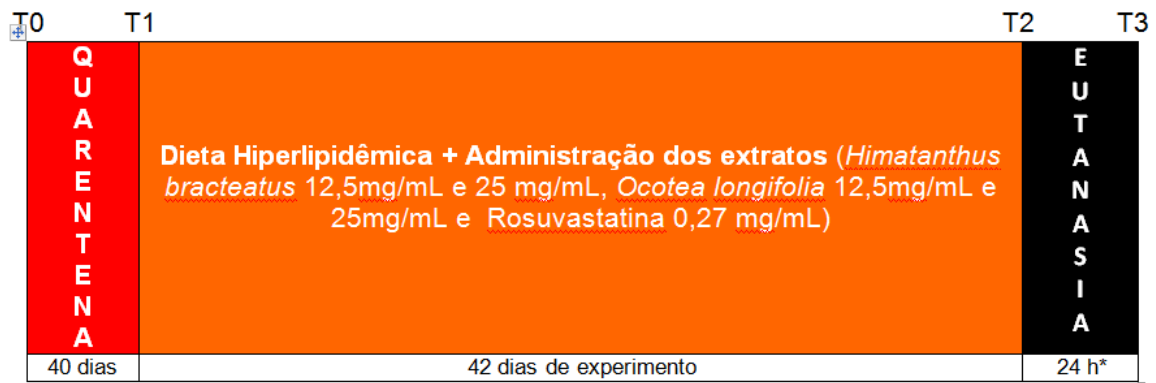
Os animais foram distribuídos em gaiolas individuais e a identificação do animal foi feita por meio de escrita à tinta azul indelével na cauda, com caneta tipo piloto permanente (*permanent mark*®), seguindo as marcações do quadro abaixo visando melhor identificação da numeração do animal:

O camundongo é marcado pela cauda, então para melhor identificação foi realizado esse processo de marcação com caneta permanente de cores azul ou preta, onde são pintados em formas de listras finas e grossas, então as listras , que são finas, equivale a **1**, e as listras mais grossas, equivale a **3**, sendo assim faz o somatório para identificar os animais. 

➤ Manejo dos animais

Optou-se pelo manejo fechado dos animais e a experimentação foi realizada no próprio biotério da UNCISAL, onde se dispunha de ambiente propício para os mesmos, com sistema de ventilação exaustão forçado, períodos de luminescência controlada, temperatura média de 20°C, ruído mínimo e umidade em torno de 50%. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas e individualizadas. A dieta foi constituída de água e ração comercial granulada para o grupo controle (Presence® ratos e camundongos) *ad libitum*, durante os 42 dias do experimento.

Os camundongos foram pesados no início e término do experimento. para avaliação de seu estado nutricional, em balança digital de precisão. A calibragem foi feita antes da pesagem de cada um dos animais. Iniciou-se e concluiu-se a pesquisa com 49 animais. Segue o quadro abaixo onde demonstra o período de quarentena, período experimental e eutanásia:



- Identificação:

- ✓ T0 - tempo inicial;
- ✓ T1 - início da dieta hiperlipidêmica e o tratamento com os extratos;
- ✓ T2 - término da dieta hiperlipidêmica e o tratamento com os extratos;
- ✓ T2 a T3 é o início e término da eutanásia.

➤ **Preparo e administração da dieta aterogênica**

A ração ofertada *ad libitum* ao grupo controle foi a de marca PRESENCE® (ratos e camundongos) e para os outros 6 grupos foi confeccionada na PRAGSOLUÇÕES® (biociências), a dieta aterosclerótica (1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico e gordura de 15%) conforme descrito no laboratório Jackson (<https://www.jax.org/>) seguem os outros componentes da dieta:

Produto
Amido de milho
Caseína
Amido dextrinizado
Sacarose
Banha
Óleo de soja
Celulose
Minerais
L cistina
Bitartarato de colina
Colesterol
Ácido cólico

- Substâncias e grupos:

O grupo controle (C) recebeu a ração PRESENCE® (ratos e camundongos) *ad libitum* e diariamente 1mL de soro fisiológico a 0,9% com o auxílio de uma seringa acoplada a uma agulha de gavagem por via oral.

O grupo hiperlipidêmico (H) recebeu a ração confeccionada na PRAGSOLUÇÕES® (biociências), a dieta aterosclerótica (1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico e gordura de 15%) ofertada *ad libitum* durante 42 dias (SHIMIZU et al., 2014).

Foi realizado um procedimento piloto (antes do experimento) para encontrar a DL-50 (dose letal), assim separamos alguns camundongos C57BL6J e dividimos em grupos de 5 animais (cada grupo com uma concentração diferente) e administramos 1mL de cada extrato (*Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia*) nas concentrações: 1,25µg/mL, 2,5µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL, 20µg/mL, 12,5mg/mL, 25mg/mL e 50mg/mL, sendo a de 50mg/mL a concentração onde todos os animais entraram em óbito em até 24h. Assim, optamos por realizar o experimento com as concentrações de 12,5mg/mL e 25mg/mL em ambos os extratos, diariamente antes da administração o foi ofertado pela manhã 1mL da solução por gavagem durante os 42 dias de experimento, sendo assim os grupos dos extratos foram *Himatanthus bracteatus* (HT 25mg/mL e HT 12,5mg/mL) e *Ocotea longifolia* (OT 25mg/mL e OT 12,5mg/mL).

O grupo rosuvastatina foi utilizado como grupo controle positivo e esta foi confeccionada pela farmácia de manipulação A Fórmula® em forma de suspensão na concentração de 0,27mg/mL, calculada levando em consideração a média do peso dos camundongos no início do experimento (27, 73g) e administrados 1mL por dia por gavagem.

➤ Preparação do Extrato

As espécies *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* foram identificadas pela botânica Rosângela Pereira de Lira Lemos do Instituto do Meio Ambiente de Maceió – IMA e confeccionados pelo prof. Dr. Thiago Barros da UFAL (Campus de Viçosa) e coletados em maio de 2015 no município de Rio Largo-AL, o caule 3,5 Kg após seco a temperatura ambiente por 5 dias foi triturado e colocado em álcool

etílico para produção do extrato Hidroalcolico a 10%;Foi administrado a cada animal 1mL da solução.

➤ **Eutanásia**

As substâncias foram administradas por um período de 6 semanas (42 dias), término no qual os animais foram anestesiados usando ketamina e Xilasina e coletado amostra de cerca de 1mL sangue através de punção cardíaca para dosagem do perfil lipídico. Foram coletados por via transabdominal, na seguinte ordem: artéria aorta e coração.

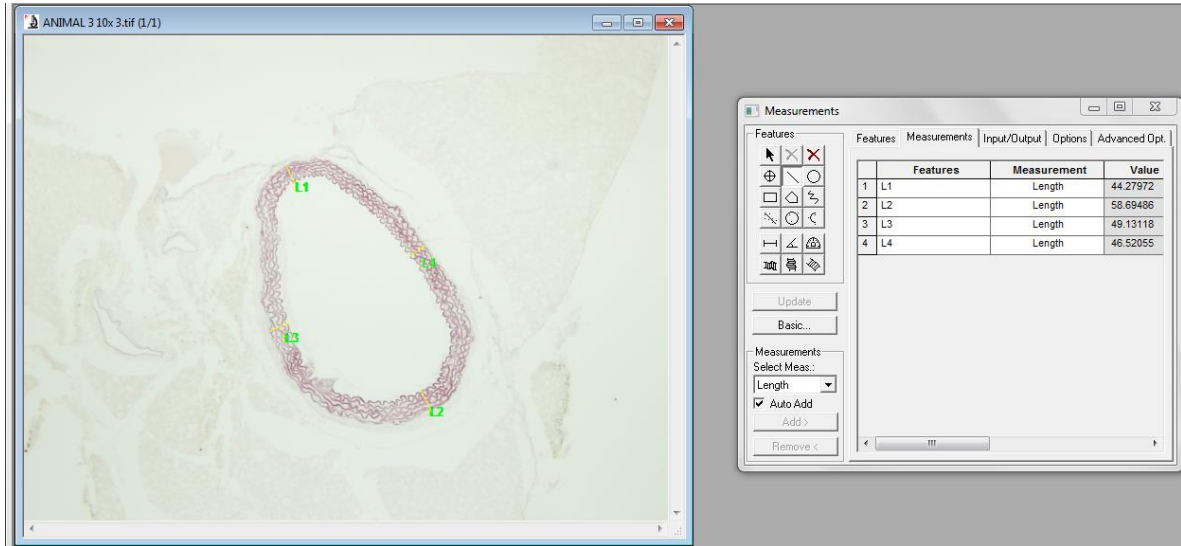
➤ **Análise histológica e morfométrica**

A aorta foi retirada desde o arco até a bifurcação das artérias ilíacas e juntamente com o coração foram fixados em formol a 10% (para microscopia óptica) por no mínimo 24h e a parte descendente da aorta foi clivada e foi fixada em formol a 10% (para análise imunohisquímica) e em seguida levados para o preparo rotineiro de lâminas histológicas para microscopia óptica: desidratação gradativa e crescente de álcool a 70% até o álcool absoluto – diafanização em xilol crescentes e embebição em parafina líquida a 60°C, e preparação dos blocos de parafina.

Os blocos de parafina foram cortados no micrótomo com espessura de 3 (três) µm e os cortes montados em lâminas de vidro extra-finas (76 x 25 mm), em seguida, foram coradas com fucsina-resorcina e em seguida montadas com lamínulas e entelan para estudo das fibras elásticas e espessura da túnica média da aorta torácica, outras laminas (usando lâminas silanizadas) foram preparadas para imunohistoquímica.

Nesta análise usaram-se cortes não-consecutivos perpendiculares ao eixo da parte descendente da aorta e corados com fucsina-resorcina (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). Cinco imagens digitais aleatórias por animal foram adquiridas (formato TIFF, 36-bit color, 1.280 x 1.024 pixels, com câmera LC Evolution e microscópio Olympus BX51) analisadas com o programa Image-Pro Plus versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). Para estimar espessura da túnica média da parte descendente da artéria aorta, quatro medidas por imagem foram obtidas em 0, 90, 180 e 270 graus. Como demonstra a imagem abaixo

Figura 1 – Imagem demonstrando a mensuração dos 4 pontos ortogonais da aorta descendente do animal 3 (IMAGE-PRO PLUS 4.5) grupo *Himatanthus bracteatus* 25mg/mL. Coloração fucsina-resorcina. Corte transversal. Objetiva 10x

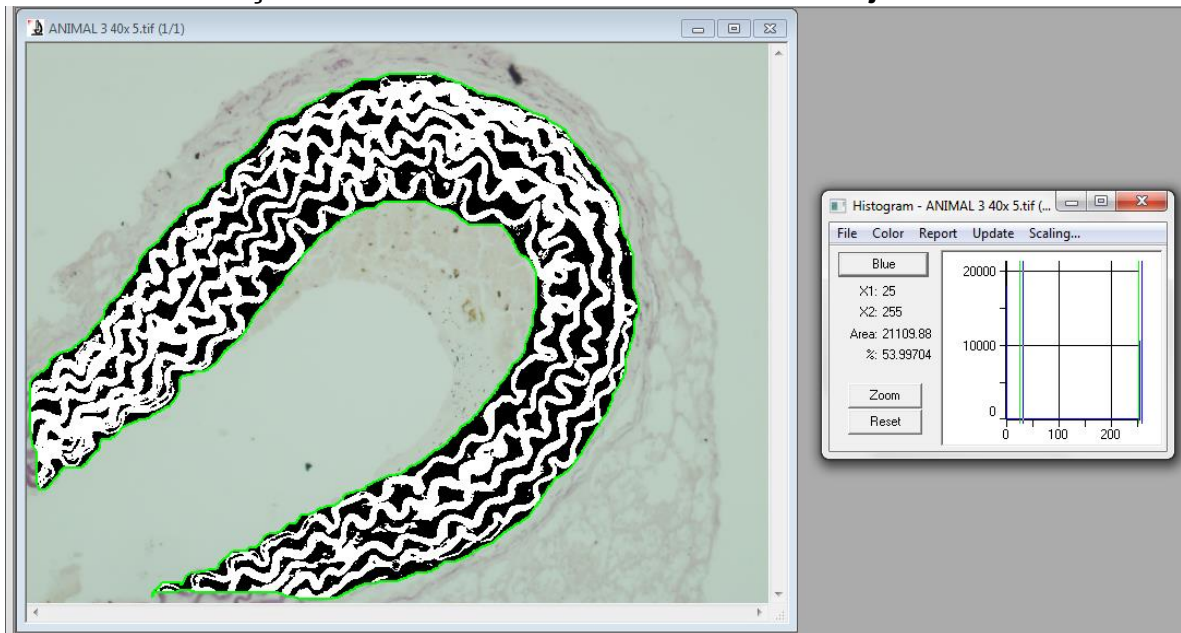


Fonte: Elaborada pelo autor.

➤ Fibras elásticas

O estudo foi realizado em imagens digitais de cortes da parte descendente da artéria aorta e corados com fucsina-resorcina para fibras do sistema elástico, obtidas usando o mesmo equipamento descrito previamente. Inicialmente, selecionando as áreas da parede da aorta e usando a ferramenta de “*threshold*” segmentou-se a imagem de modo a obter o percentual de fibras elásticas na área total da parede, como demonstra a imagem a seguir:

Figura 2 – Imagem demonstrando a mensuração de fibras elásticas de 53,99% da área da aorta descendente do animal 3 (IMAGE-PRO PLUS 4.5) grupo controle. Coloração fucsina-resorcina. Corte transversal. Objetiva 40x



Fonte: Elaborada pelo autor.

Estas medidas foram obtidas de cinco cortes não consecutivos da aorta por animal. A quantidade total de fibras elásticas nas secções da aorta foi calculada pelo IMAGE-PRO PLUS 4.5 em μm (micrometros).

➤ **Imunohistoquímica**

Amostras da parte descendente da aorta foram fixadas em formol e processadas de acordo com os procedimentos histológicos de rotina, embebidas em parafina e cortadas em espessura de $3\mu\text{m}$. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados durante o procedimento de imuno-histoquímica: CD68 (1:100, Abcam), TNF-ALFA (1:100, Santa Cruz Biotechnology) e Isoprostano (1:100, oxfordbiomed). A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato em banho maria à 60°C (CD68 e TNF-ALFA) ou com tripsina 37°C (Isoprostano). A inibição da peroxidase endógena tecidual foi realizada com peróxido de hidrogênio à 10% e, após os cortes serem lavados em tampão fosfato salino, os mesmos foram incubados com os respectivos anticorpos primários à 4°C *overnight*. A reação foi amplificada com um sistema de complexo biotina estreptavidina (K0679, Kit LSAB, Universal DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), e a imunorreatividade foi determinada após incubação com 3,3'-diaminobenzidina tetracloreto (K3466, Dako Cytomation

Universal, Glostrup, Dinamarca). As secções foram coradas com hematoxilina para identificar os núcleos das células e, em seguida, as lâminas foram montadas e analisadas. Os controles negativos foram obtidos através da não utilização do anticorpo primário no corte escolhido

➤ **Glicemia sanguínea**

A medida da glicemia de jejum foi realizada nos dias 1, 21 e 42 do experimento. Após 12h de jejum amostras de sangue foram coletadas a partir de uma pequena incisão da cauda dos animais. Ao término do experimento a medida da glicemia de jejum feita 1h antes da eutanásia. As amostras de sangue foram colhidas de acordo com as recomendações dos fabricantes usando um glucômetro (Roche, São Paulo, SP, Brasil).

➤ **Lipidograma**

Ao fim da coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas, a 5000 (cinco mil) rotações por minuto para separação do soro sanguíneo, e encaminhadas para o laboratório de análise do CPML/UNCISAL foi realizado o lipidograma. Para análise dos lipídeos plasmáticos foram determinadas as concentrações do colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicerídeos (TG), lipoproteína de baixa densidade (LDL) a partir do soro isolado por centrifugação de cada animal. As determinações do lipidograma foram realizadas pelo método enzimático colorimétrico (FOSSATI; PRENCIPE, 1982), utilizando *kit* enzimático da Labtest® e analisador colorimétrico automático.

3.5 Variáveis

3.5.1 Variável primária

A média da espessura da túnica média e percentual de fibras elásticas da parte descendente da aorta de cada grupo: está diretamente relacionada capacidade da artéria responder a dieta hiperlipidêmica ou ao tratamento com os extratos: *Himatanthus bracteatus* (nas concentrações 25mg/mL e 12,5mg/mL) e *Ocotea longifolia* (nas concentrações 25mg/mL e 12,5mg/mL).

3.5.2 Variáveis secundárias

- ✓ **Colesterol total:** Foi medido por teste enzimático colorimétrico e medido em mg/dL.
- ✓ **HDL:** Foi medido por teste enzimático colorimétrico e medido em mg/dL.
- ✓ **LDL:** essa lipoproteína de baixa densidade e os valores representados em mg/dL.
- ✓ **Triglicérideo:** foi medido por teste enzimático colorimétrico e medido em mg/dL.
- ✓ **Massa corpórea do animal:** Pesados no início e término do experimento.
- ✓ **Peso do coração:** peso do órgão molhado.
- ✓ **Glicemia:** jejum de 12h.
- ✓ **TNF – alfa :** fator de necrose tumoral (marcador inflamatório imunohistoquímico)
- ✓ **CD – 68 (Conjunto de Diferenciação 68):** é uma glicoproteína que se liga a lipoproteína de baixa densidade. É expresso em monócitos / macrófagos (marcador inflamatório imunohistoquímico).
- ✓ **ISOPROSTANO:** produto específico da lipoperoxidação (marcador de estresse oxidativo).

3.6 Método estatístico

3.6.1 Cálculo do tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi arbitrado em 49 (trinta) camundongos C57BL6J, sendo 7 (sete) para cada grupo estudado; uma vez que na literatura, há trabalhos, que comprovem resultados estatísticos aceitáveis com número menor de animais no experimento com modelo animal semelhante, tais como Brasselet, 2008 e outros Cortelekoglu et al., 2006; Santos, 2008 (ALESSI et al., 2010; BRASSELET et al., 2008; CORTELEKOGLU et al., 2006; EFENDY et al., 1997; GUZELOGLU et al., 2012; KWON et al., 2003; LIDDELL et al., 2005; NOGUEIRA, 2012; PLATE et al., 1989; ROLIM, 2012; SANTOS, 2008; STADIUS et al., 1994; WAKSMAN et al., 2008; YASUDA, S. et al., 2002).

3.6.2 Análise estatística

Os dados foram analisados através da estatística descritiva usando como ferramenta software GraphPad Prism (versão 5.0). Os dados desta análise foram expressos em média, desvio padrão e erro padrão. Primeiramente foi feito o teste de normalidade em cada grupo para verificar se os dados seguem ou não a distribuição normal. Para comparações entre os grupos será utilizado o ANOVA one-way e o pós-teste de TUKEY para os dados que seguem a distribuição normal. Para os resultados que não seguirem a distribuição normal será utilizado o teste de KRUSKAL-WALLIS e o pós-teste DUNNS. Para saber se existem ou não diferença significativa entre as médias foi adotada o nível significância de 0,05.

4 RESULTADOS

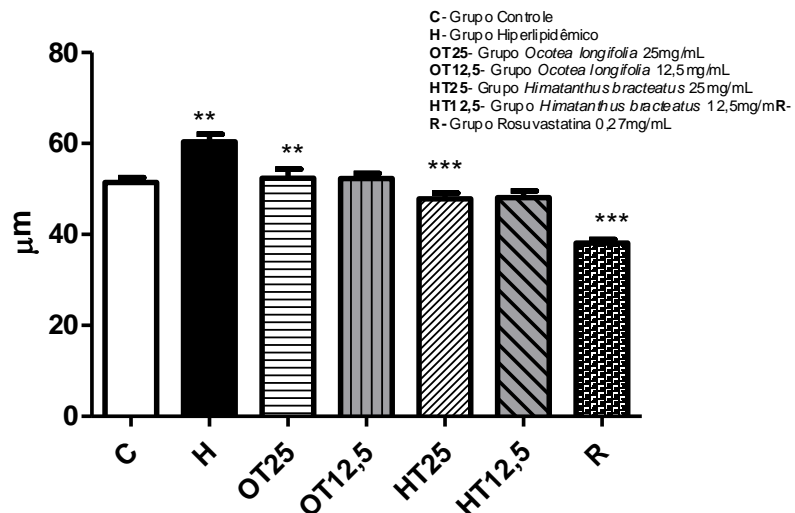
Os resultados estão indicados pela média, desvio padrão e erro padrão. Foram utilizados tabelas e gráficos para a apresentação dos dados e os valores foram apresentados com até duas casas decimais

4.1 Variáveis primárias

➤ TÚNICA MÉDIA

Animais tratados com os extratos da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* nas duas concentrações obtiveram na redução da espessura da túnica média com redução de cerca de 13% para a *Ocotea longifolia* e 20% da *Himatanthus bracteatus* quando comparadas com a média do grupo hiperlipidêmico, como podemos verificar no gráfico abaixo:

Gráfico 1 – A espessura da túnica média da parte descendente da aorta durante a administração dos extratos da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* (25mg/mL e 12,5mg/mL).



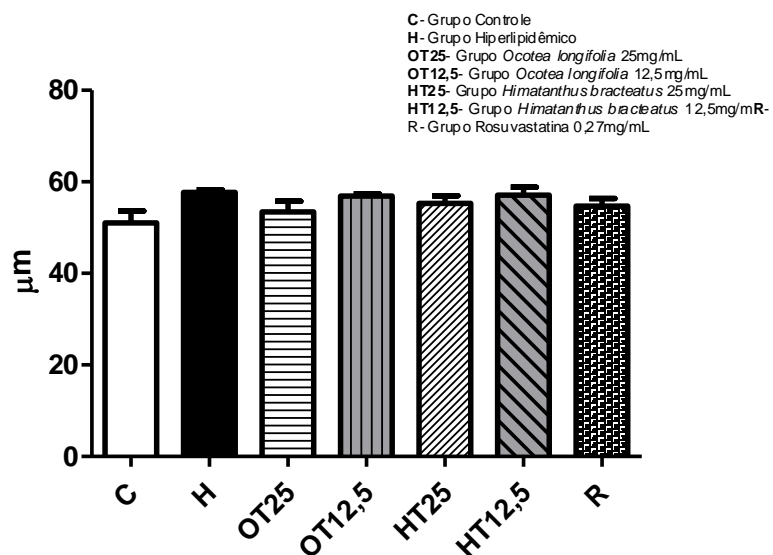
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Após a administração dos extratos a espessura da túnica média diminui juntamente com o grupo Rosuvastatina de forma significativa, observa-se que não houve diferença significativa quando comparado com o grupo controle (não tratado). Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o teste ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos $P < 0.0001$.

➤ PERCENTUAL DE FIBRAS ELÁSTICAS DA AORTA DESCENDENTE

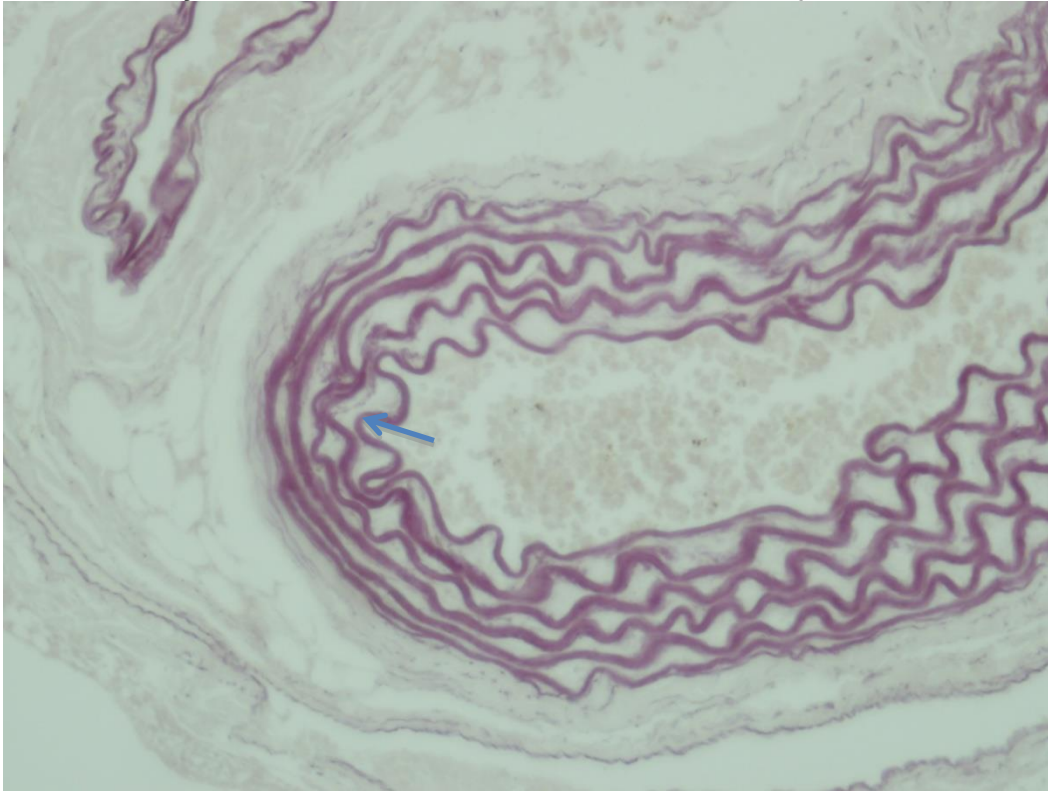
Animais tratados com os extratos da *Ocotea longifolia* e *Himatanthus bracteatus* nas concentrações de 12,5mg/mL e 25mg/mL não alteraram de forma significativa no percentual de fibras elásticas quando comparadas com as médias dos grupos controle e hiperlipidêmico, contudo a média da espessura do grupo hiperlipidêmico foi maior (57,69 μ m) que a dos demais grupos onde podemos evidenciar no gráfico abaixo, bem como nas figuras 3 e 4 onde demonstram as fibras elásticas e o limite entre túnica externa e média arterial

Gráfico 2 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo não houve diferença significativa entre todos os grupos comparados. Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos $p= 0,1134$.



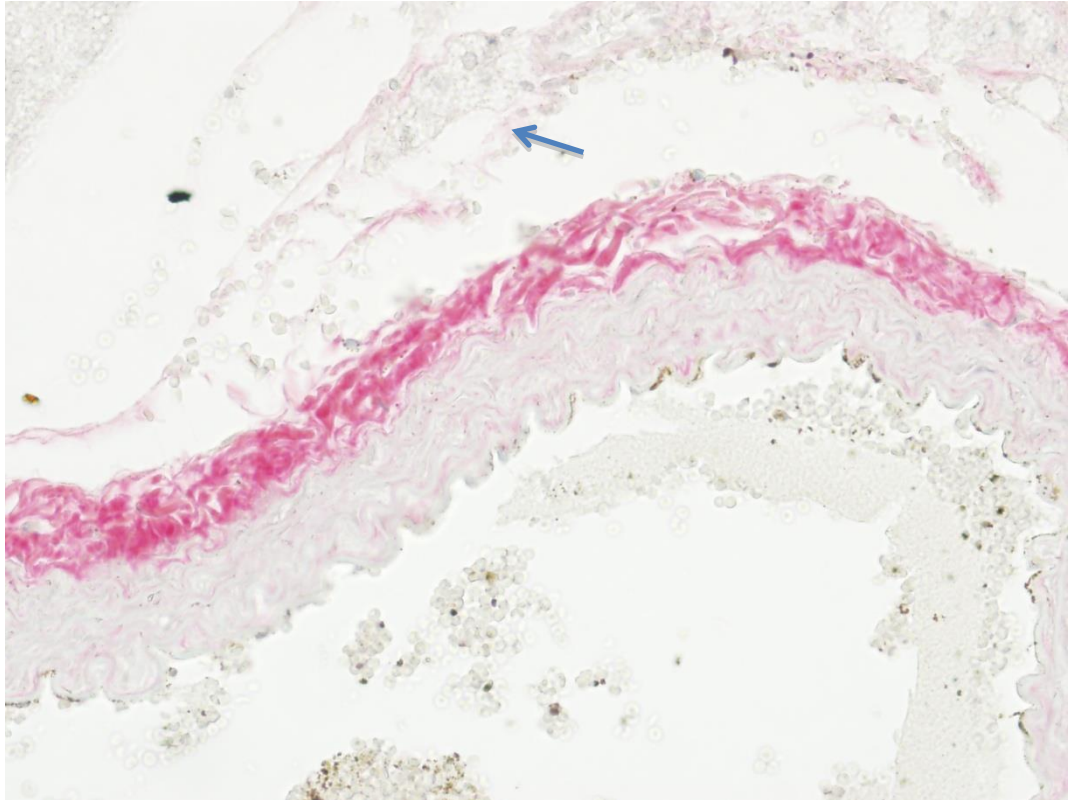
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 – Imagem demonstrando as fibras elásticas da parte descendente da aorta do animal 3 (IMAGE-PRO PLUS 4.5) grupo *Himatanthus bracteatus* 25mg/mL. Coloração fucsina-resorcina. Corte transversal. Objetiva 40x.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4 – Imagem demonstrando o limite entre as túnica externa e média da parte descendente da aorta do animal 1 (IMAGE-PRO PLUS 4.5) grupo hiperlipidêmico. Coloração picosirius que é empregada na histologia como específica para colágeno. Corte transversal. Objetiva 40x.

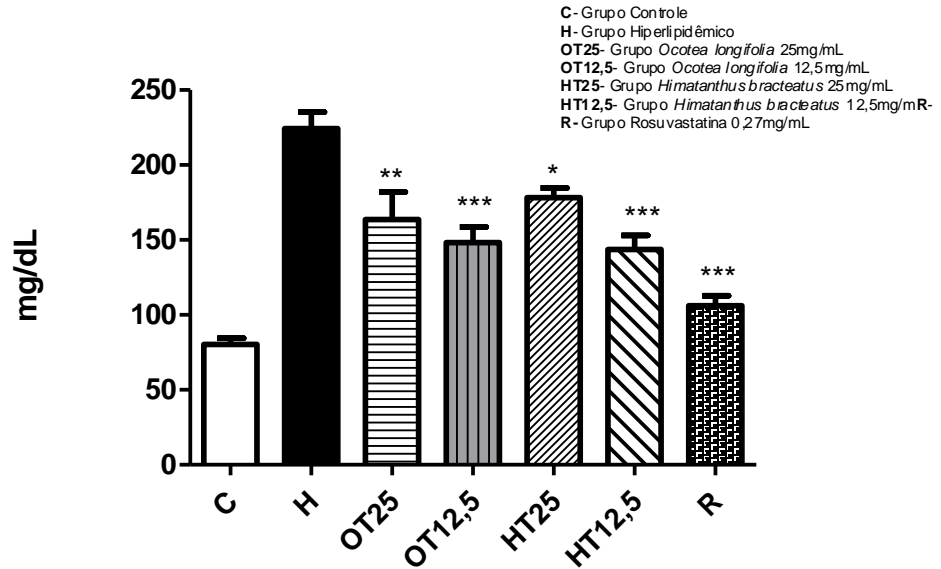


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Variáveis secundárias

- **Colesterol total** de todos os grupos do experimento medido em mg/dL.

Gráfico 3 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo houve diferença significativa entre o grupo H hiperlipidêmico comparado com todos os grupos testados $p < 0.0001$.

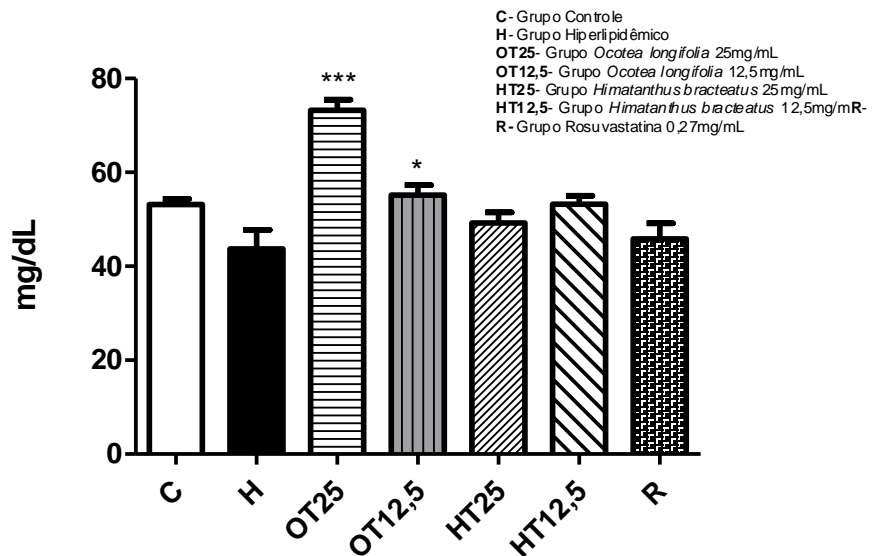


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos.

- HDL de todos os grupos do experimento medido em mg/dL

Gráfico 4 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo houve diferença significativa entre o grupo H hiperlipidêmico comparado com todos os grupos O25 *Ocotea longifolia* 25mg/mL e o grupo O12,5 *Ocotea longifolia* 12,5mg/mL testados $p < 0.0001$.

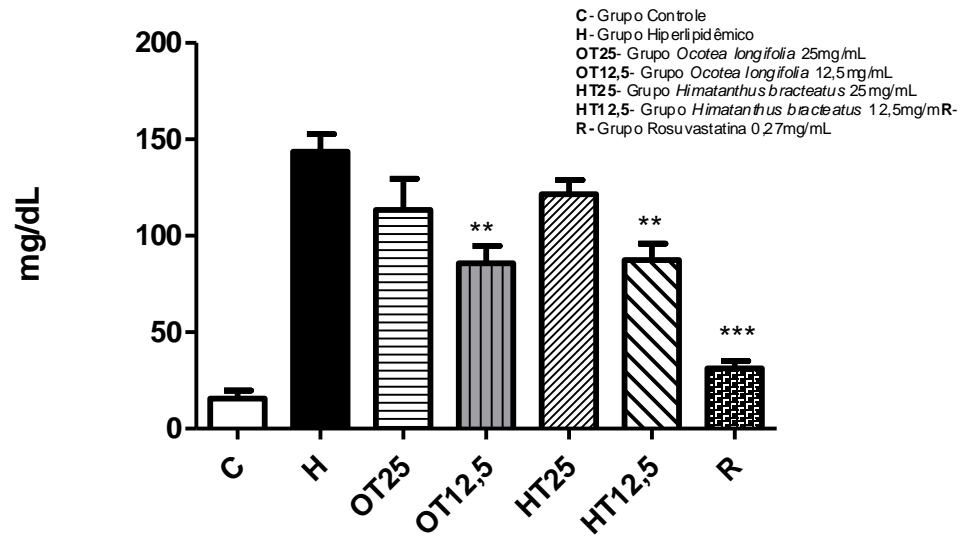


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos.

- **LDL:** essa lipoproteína de baixa densidade e os valores representados em mg/dL.

Gráfico 5 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo houve diferença significativa entre o grupo H hiperlipidêmico comparado com os grupos O12,5 *Ocotea logifolia* 12,5mg/mL, H12,5 *Himatanthus bracteatus* 12,5mg/mL e rosuvastatina 0,27mg/mL testados $p < 0.0001$.

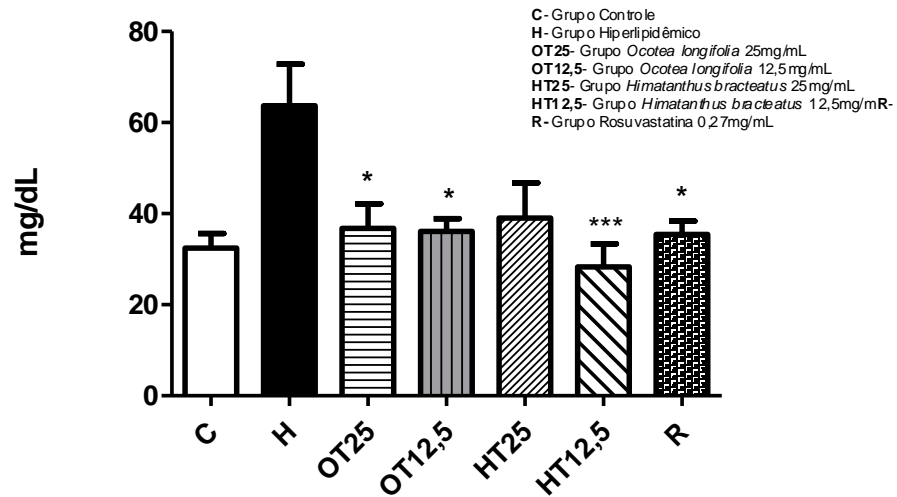


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos

- **Triglicerídeo:** foi medido por teste enzimático colorimétrico e medido em mg/dL.

Gráfico 6 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo houve diferença significativa entre o grupo H hiperlipidêmico comparado com os grupos: O25 *Ocotea longifolia* 25mg/mL, O12,5 *Ocotea longifolia* 12,5mg/mL, H12,5 *Himatanthus bracteatus* 12,5mg/mL e rosuvastatina 0,27mg/mL testados $p < 0.0001$, exceto comparado como grupo H25 *Himatanthus bracteatus* 25mg/mL.

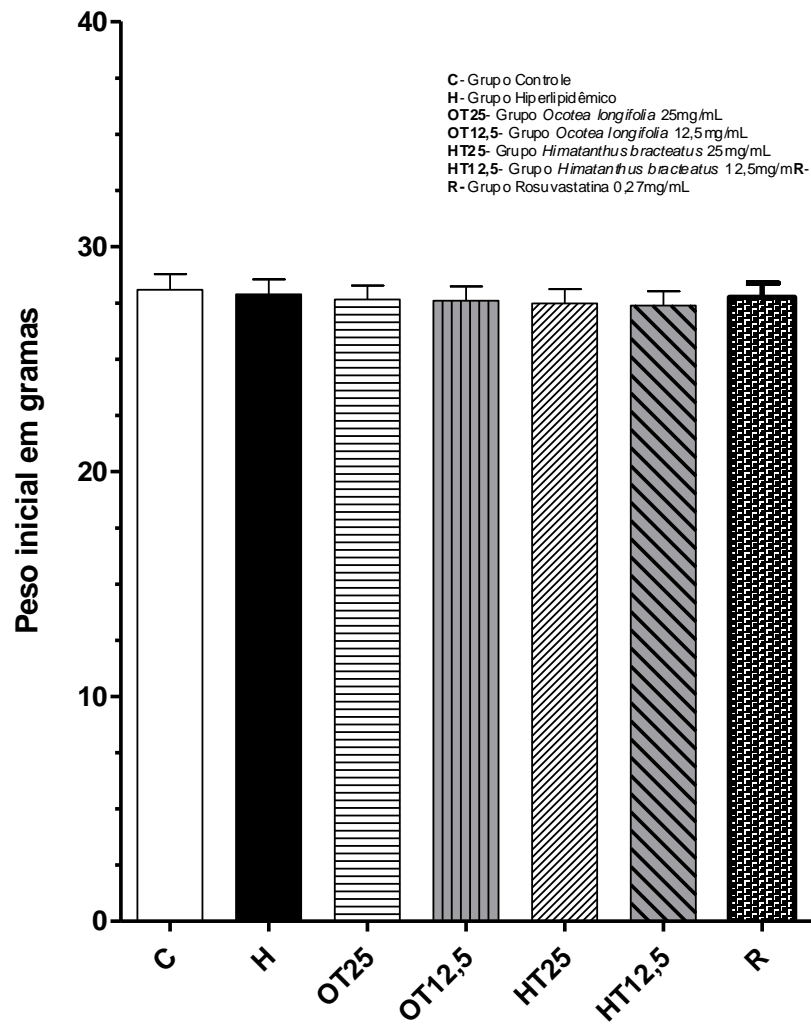


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Os resultados não seguiram a distribuição normal, assim foi feito o teste KRUSKAL-WALLIS e pós teste de DUNNS comparando todos os grupos.

- **Massa corpórea do animal**, animais pesados no início e término do experimento.

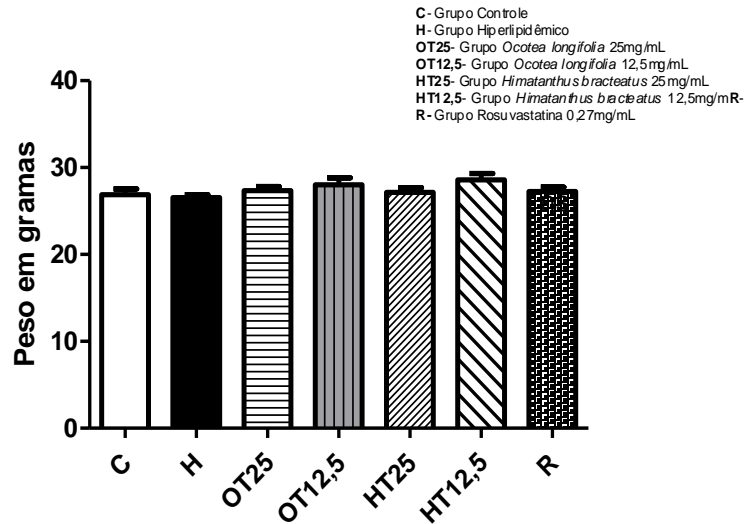
Gráfico 7 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo não houve diferença significativa no peso inicial dos grupos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos

Gráfico 8 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo não houve diferença significativa no peso dos animais ao término do experimento.

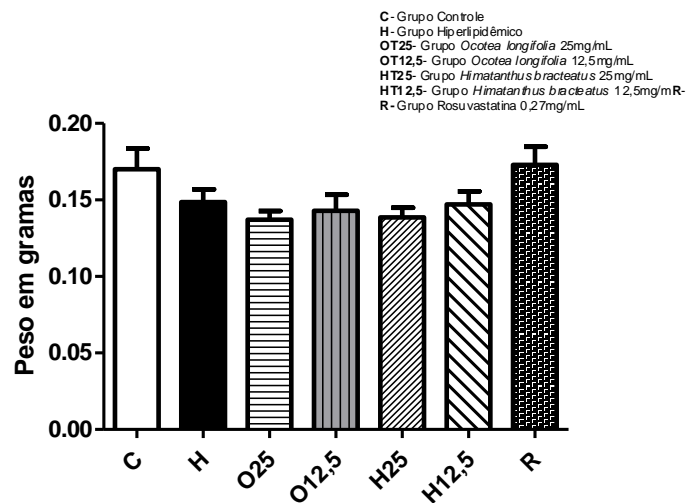


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos.

- **Peso do coração**

Gráfico 9 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo não houve diferença significativa no peso do coração comparado entre os grupos.

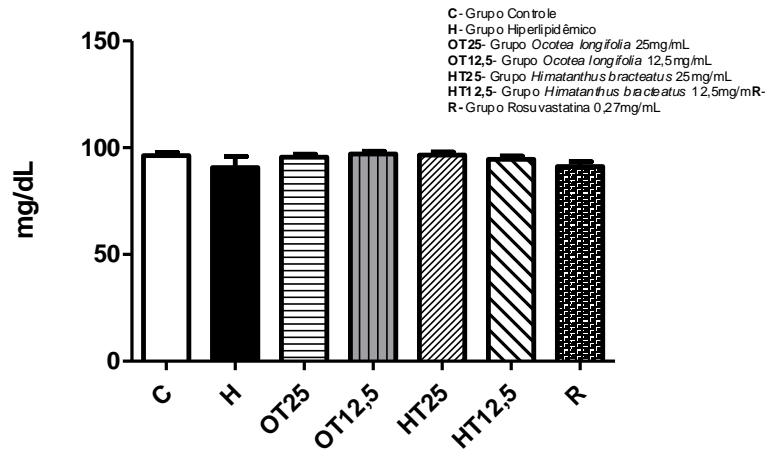


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos.

- Glicemia:

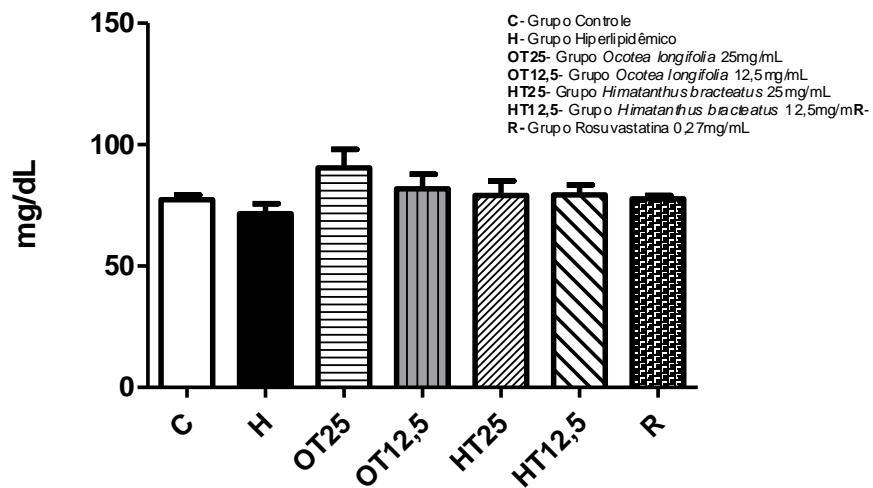
Gráfico 10 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo não houve diferença significativa na glicemia dos animais no início do experimento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos.

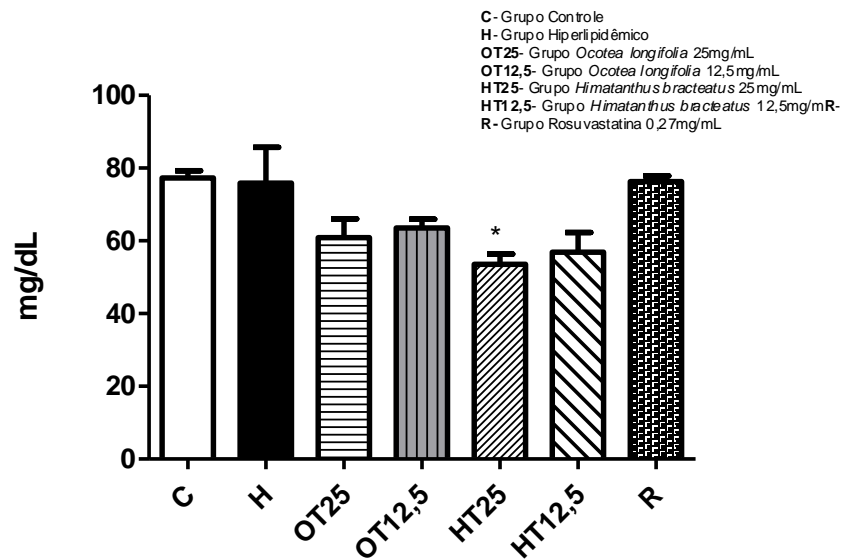
Gráfico 11 – Conforme demonstrado no gráfico abaixo não houve diferença significativa na glicemia dos animais no dia 21 do experimento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos.

Gráfico 12 – Conforme demonstrado no gráfico acima houve diferença significativa na glicemia dos animais do grupo *Himatanthus bracteatus* 25mg/mL ao término do experimento.

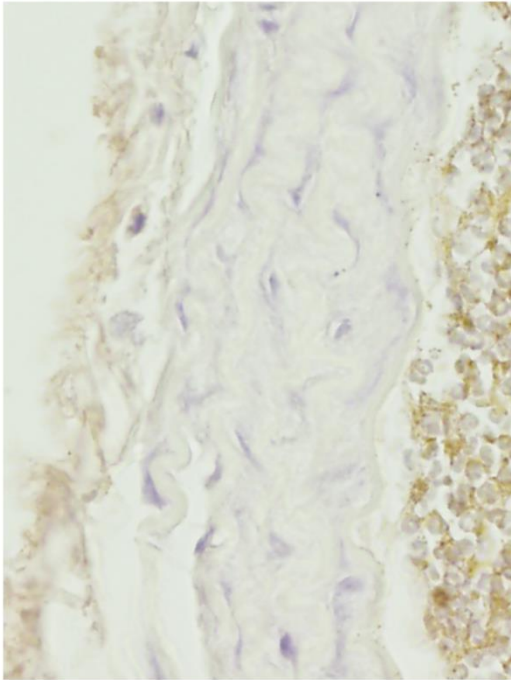
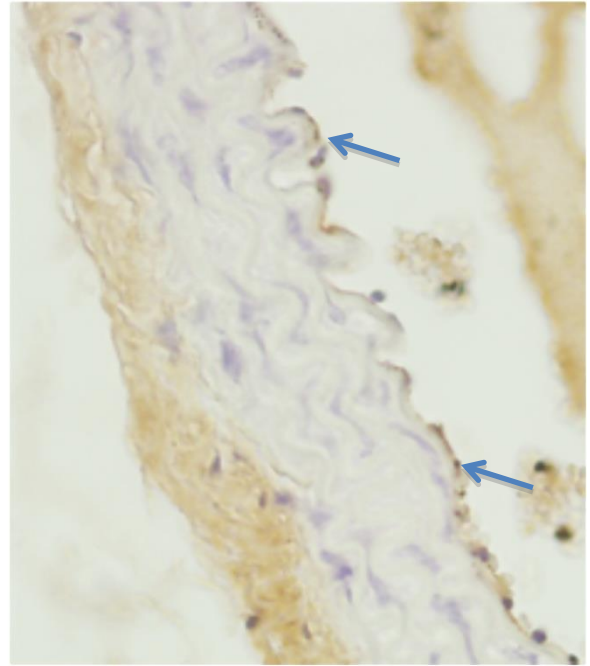
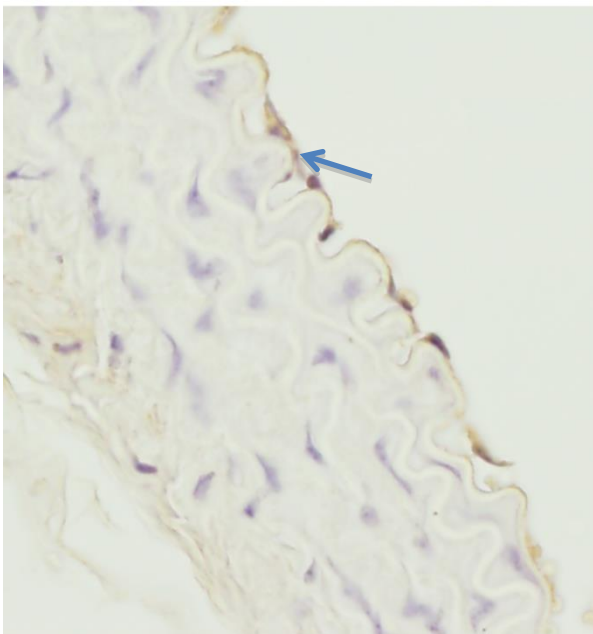
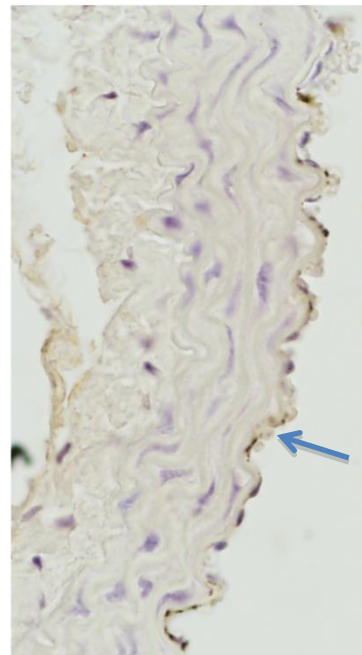


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos, $p = 0,0029$

- **TNF - alfa** : fator de necrose tumoral (marcador inflamatório imunohistoquímico).

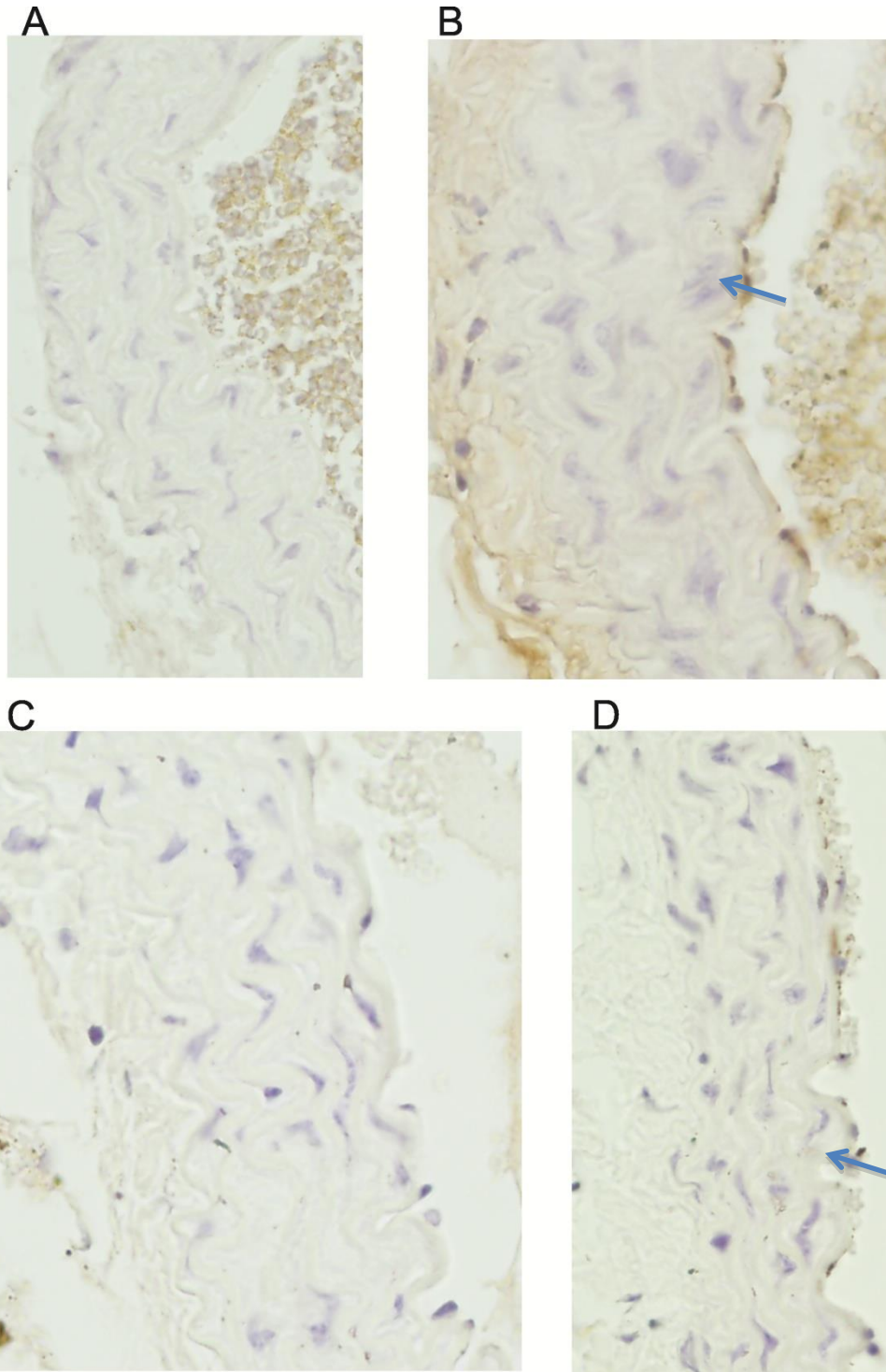
Figura 5 – O marcador TNF – ALFA foi positivamente expresso na parte descendente da aorta (musculatura lisa da túnica média e íntima): (A) grupo C, (B) grupo H, (C) grupo HT25, (D) grupo OT25. A intensidade de maior expressão foi para o (B) grupo H. Corte transversal. Objetiva de 40x.

A**B****C****D**

Fonte: Elaborada pelo autor.

- **CD – 68 (Conjunto de Diferenciação 68):** é uma glicoproteína que se liga a lipoproteína de baixa densidade. É expresso em monócitos / macrófagos (marcador inflamatório imunohistoquímico).

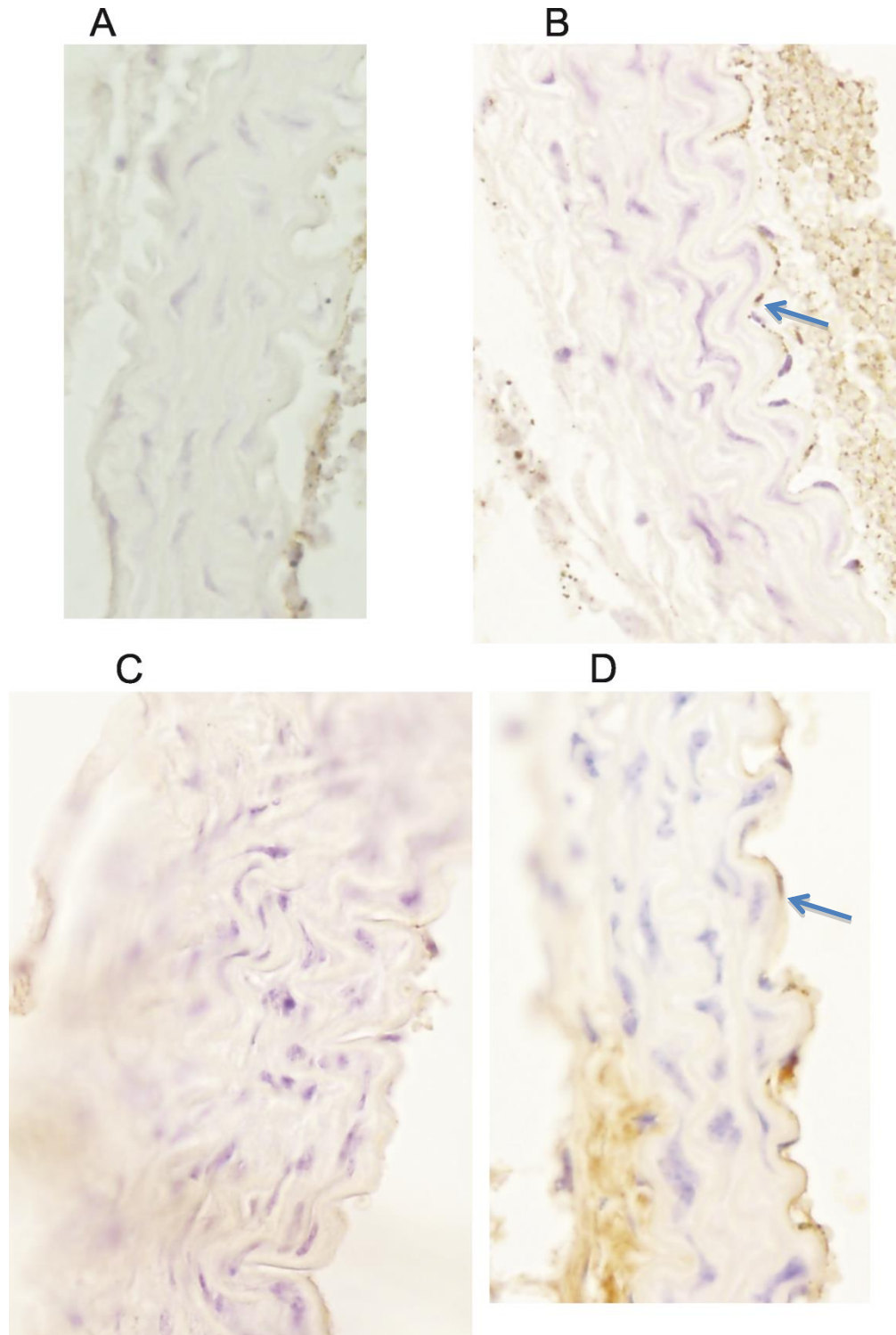
Figura 6 – O marcador CD-68 foi positivamente expresso na parte descendente da aorta (musculatura lisa da túnica média e íntima): (A) grupo C, (B) grupo H, (C) grupo HT25, (D) grupo OT25. A intensidade de maior expressão foi para o (B) grupo H. Corte transversal. Objetiva de 40x.



Fonte: Elaborada pelo autor.

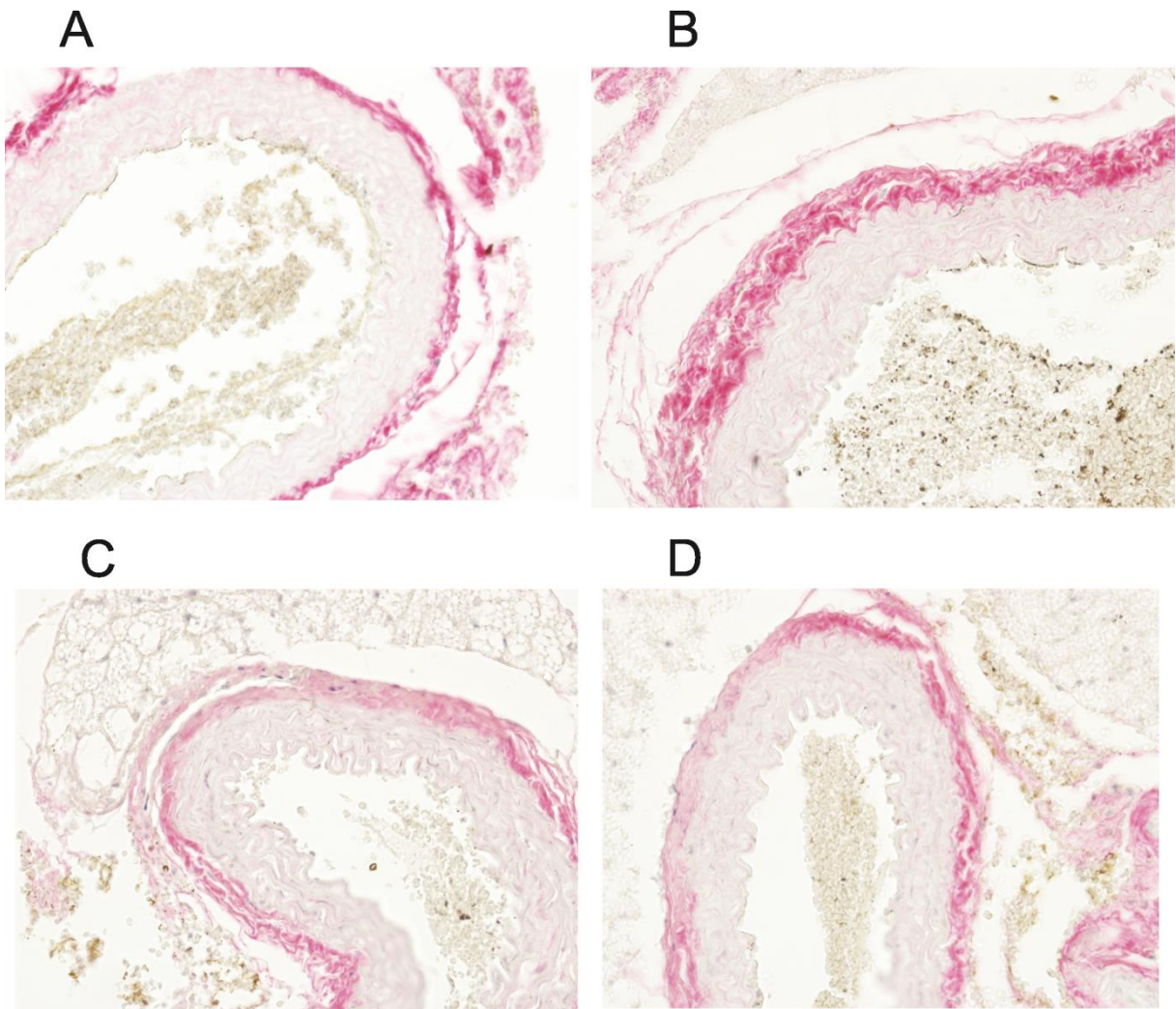
- **ISOPROSTANO:** produto específico da lipoperoxidação (marcador de estresse oxidativo).

Figura 7 – O marcador isoprostano foi positivamente expresso na parte descendente da aorta (musculatura lisa da túnica média e íntima): (A) grupo C, (B) grupo H, (C) grupo HT25, (D) grupo OT25. A intensidade de maior expressão foi para o (B) grupo H. Corte transversal. Objetiva de 40x.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 8 – Imagem demonstrando o limite entre as túnica externa e média da parte descendente da aorta. Coloração picosirius: (A) grupo C, (B) grupo H, (C) grupo HT25, (D) grupo OT25. Corte transversal. Objetiva de 40x



Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, utilizou-se um protocolo de indução de aterosclerose experimental descrito por SHIMIZU et al (2014) onde induziu hiperlipidemia e aterosclerose administrando dieta com 1,25% de colesterol, 0,5% de ácido fólico e 15% de gordura durante 6 semanas (42 dias) em camundongos C57BL6J, modelo que está documentado na literatura.

A *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* (em ambas as concentrações) reduziram de forma significativa a espessura da túnica média dos animais tratados (gráfico 1), isto se deve pelo fato de ambos os extratos possuírem em sua composição alcalóides que podem inibir a inflamação provocada pelo aumento do colesterol total, triglicerídeos e LDL (lipoproteína de baixa densidade) na parede arterial, diminuindo assim a espessura da túnica média da parte descendente da aorta dos camundongos, isso concorda com o estudo onde descrevem que o espessamento da túnica média e íntima arterial são importantes parâmetros para caracterizar a doença aterosclerótica generalizada, principalmente da doença arterial coronariana precoce. O aumento da espessura da túnica média e íntima da artéria carótida por exemplo está relacionado com a maioria dos fatores de risco cardiovasculares em humanos. A espessura da artéria ajuda a estabelecer com mais precisão o risco cardiovascular em pacientes hipertensos sem lesão em órgão-alvo evidenciada pelos exames de rotina, como o eletrocardiograma (ENGELHORN et al., 2006).

Conforme demonstrado nos resultados do gráfico 2, onde observamos que ambas as plantas e concentrações (*Ocotea longifolia* e *Himatanthus bracteatus*) obtiveram resultados significantes na redução do espessamento da túnica média. Isso é corroborado pelo experimento realizado em ratos utilizando a *Himatanthus succuba* verificou-se a atividade antiinflamatória e analgésica do látex, onde este obteve sucesso utilizando as frações do látex contra o edema de pata de rato induzido por carragenina e nos testes de constrição do rato induzido por ácido acético. A fração de hexano inibiu a formação do edema por 35,9%, numa dose de 200 mg / kg. Os triterpenos presentes na fração de hexano foram identificados como acetato de lupeol, alfa-amirina e lupeol cinamato. A fração contendo somente cinamatos inibiu o edema e as constrições abdominais por 50-40% e 57,9%, respectivamente (DE MIRANDA et al., 2000). Em estudos químicos revelaram a

presença de depsídeos, terpênos e iridoides em *Himatanthus succuba*. Atualmente, estudos farmacológicos evidenciaram as atividades anti-inflamatória e analgésica dos iridoides presentes na casca de seu caule e no látex, o efeito cicatrizante e uma baixa toxicidade reprodutiva, indicando que seu consumo é seguro na espécie humana no tratamento de gastrites e hemorróidas (FRANÇA et al., 2011).

A ação antiinflamatória da *Himatanthus bracteatus* se deve principalmente por causa da presença de alcalóides (analgésicos opióides) sugerindo que estes participam da inibição da formação de citocinas pró-inflamatórias (LUCETTI et al., 2010).

Pesquisas feitas usando a *Ocotea bullata* (*Lauraceae*) a casca do caule que são usadas pela população para curar dores de cabeça, distúrbios urinários e problemas de estômago o extrato dessa planta foi capaz de inibir a ciclooxigenase-1 e inibição da 5-lipoxigenase. O Extrato hexano da casca exibiram atividade moderada na inibição da inflamação. (ZSCHOCKE et al., 2000).

A *Himatanthus bracteatus* e *Himatanthus drasticus* possuem em sua composição triterpenos que têm ação antiinflamatória e analgésica comprovada. Isso é sustentado pela pesquisa realizada para testar o extrato da casca da planta *Himatanthus succuba* que tem na sua composição triterpenos (acetato de lupeol, alfa-amirina e lupeol cinamatos) e iridóides, o presente extrato teve obteve redução do edema provocado em ratos (LUCETTI et al., 2010; DE MIRANDA et al., 2000).

A *Ocotea notata* (análise química por HPLC revelou a presença de importantes flavonóides: afzelina e isoquercitrina) foi testada na atividade antimicrobiana sendo capazes de inibir a produção de NO (óxido nítrico) por macrófagos e possuindo ação sobre inibição da COX-1, COX-2 e 5-LOX, (COSTA et al., 2015). Assim no presente experimento a *Ocotea longifolia* (12,5mg/mL e 25mg/mL) teve efeitos benéficos na redução da espessura da túnica média da parte descendente da aorta em camundongos.

Observa-se que na quantificação das fibras elásticas no presente estudo não houve diferença significativa entre os grupos de animais tratados com os extratos da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* (nas concentrações de 25mg/mL e 12,5mg/mL). Alguns pesquisadores verificaram a influência da elastina na modulação das células da musculatura lisa vascular, propuzeram que a elastina é um regulador autócrino potente do músculo liso vascular e da atividade das células musculares e que esta regulação é importante para prevenção de patologia

fibrocelular (aterosclerose). Achados indicam que a elastina estabiliza a estrutura arterial pela indução de um estado contrátil do músculo liso arterial (KARNIK et al., 2003). Perturbação de elastina é suficiente para induzir a proliferação de músculo liso subendotelial e pode contribuir para doença obstrutiva arterial. Assim, elastina tem uma função reguladora inesperada durante o desenvolvimento arterial, o controle da proliferação de músculo liso e estabilizar a estrutura arterial (LI et al., 1998).

Os níveis sanguíneos de péptidos de elastina são usualmente baixos, mas podem aumentar durante as doenças cardiovasculares, tais como aterosclerose, aneurisma da aorta e diabetes com complicações vasculares. Geralmente, os péptidos elastina são derivados da degradação dos polímeros elásticos insolúveis. As atividades biológicas dos peptídeos de elastina são: efeito pró-inflamatório sobre a indução de migração de monócitos e um efeito protector sobre a promoção da vasodilatação (QIN, 2015).

No que diz respeito aos parâmetros sanguíneos colesterol total, LDL e triglicerídeos os extratos da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* obtiveram resultados significantes na redução destes parâmetros sanguíneos, exceto a *Himatanthus bracteatus* 25mg/mL não reduziu de forma significante os triglicerídeos.

O aumento do colesterol total, LDL e triglicerídeos provoca disfunção endotelial até a ruptura de lesões na parede vascular, pode-se observar a participação ativa da LDL (lipoproteína de baixa densidade) como um agente pró-aterogênico. Inicialmente, os lipídios oxidados da partícula atuam como agressores ao endotélio e a resposta compensatória à injúria altera sua homeostase (SIQUEIRA; ABDALLA; FERREIRA, 2006), e isto pode ser evidenciado na figura 7 (B) onde o marcador isoprostano que é um marcador de estresse oxidativo que expressou positivamente no grupo hiperlipidêmico e com menor intensidade nos grupos tratados com os extratos da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* (ambas na concentração de 25mg/mL) e isso sugere que as substâncias existentes nos extratos (alcalóides e flavonóides) o estresse oxidativo e oxidação do LDL provocado pelo processo de aterosclerose e contribuindo assim para redução do colesterol total, LDL e triglicerídeos.

Houve aumento significante do HDL no grupo *Ocotea longifolia* (25mg/mL e 12,5mg/mL) o que sugere que os flavonóides presentes no extrato contribuíram para o aumento do HDL (conforme demonstrado no gráfico 5) e redução da glicemia ao

término do experimento (conforme demonstrado no gráfico 13) e isso é sustentado por Rodrigues da Silva et al. (2015) onde relatam que os flavonóides são um grupo de substâncias naturais com estrutura fenólica variável, e portanto, de considerável interesse científico e terapêutico e possuem compostos que têm o potencial de modificar a biossíntese de eicosanóides (resposta anti-prostanoide e antiinflamatória); de proteger o colesterol-LDL da oxidação (inibindo formação de placa aterosclerótica); de prevenir a agregação plaquetária tendo efeitos anti-trombóticos.

A escolha da rosuvastatina como controle positivo foi decorrente do seu efeito mais eficaz na redução do colesterol LDL do que outras estatinas em doses comparáveis, bem como pelo motivo de possuir um maior número de interações ao se ligar com a HMG – Co A redutase (AQUINO, 2011), isto pode ser comprovado pela redução significativa do colesterol total, triglicerídeos e LDL no presente experimento.

Lua et al. (2011) e Gronros et al (2008) em pesquisa realizada usando a rosuvastatina em um modelo de arteriosclerose em camundongos por 6 semanas (42 dias) obteve sucesso na redução no depósito de lipídeos e deposição e aumento de colágeno, a rosuvastatina também pode reduzir as respostas inflamatórias decorrentes da lesão aterosclerótica.

Nicholls et al. (2008) estudou os avanços tecnológicos no processamento de imagens da parede arterial no indivíduo vivo utilizando ultrassonografia, verificou o impacto benéfico da rosuvastatina em todo espectro cardiovascular, níveis plasmáticos, HDL e marcadores inflamatórios na arteriosclerose, nesse estudo de Nicholls a rosuvastatina aumentou o HDL o que não aconteceu de forma significativa no presente trabalho.

Shimizu et al. (2014) verificaram a eficácia da rosuvastatina e atorvastatina em camundongos C57BL6J submetidos a dieta arteriosclerótica (0,5% de colesterol + 10% de óleo de coco) durante 6 semanas, não houve alterações significativas nos níveis de colesterol de HDL no plasma entre os grupos, resultados não significativos foram encontrados no presente experimento relacionando o grupo rosuvastatina comparado com o grupo controle em relação ao HDL lipoproteína de alta densidade, que desempenha um papel importante no transporte reverso do colesterol in vivo.

A massa corpórea dos animais e o peso coração não sofreu alteração significativa durante os 42 dias de experimento, isto é sustentado por Fernandes et

al. (2013) quando verificou o efeito da dieta hiperlipídica e do treinamento aeróbico na aterosclerose em camundongos apoE^{-/-}, onde não houve alteração da massa corpórea dos animais, bem como do peso dos órgãos.

O início e a progressão do processo aterosclerótico são regulados por mecanismos inflamatórios e está relacionada ao aumento na circulação sanguínea de marcadores inflamatórios, caracterizando um estado de inflamação crônica. A etapa inicial da aterosclerose é o recrutamento de monócitos e células T para a parede do vaso. As moléculas de adesão são proteínas de superfície celular que são expressas em pequenas quantidades pelas células endoteliais e sua expressão está muito aumentada na presença de citocinas inflamatórias. Assim, monócitos e linfócitos expressam moléculas de adesão em resposta à expressão endotelial, são ativados, sofrem rolamento seguido de adesão, transmigram para a camada íntima arterial perpetuando a resposta inflamatória. Os macrófagos expressam receptores para lipoproteínas modificadas, englobando partículas minimamente oxidadas (BAHIA et al., 2006).

O marcador inflamatório TNF- α expressou positivamente no grupo hiperlipidêmico (conforme figura 5 B) e com menor intensidade para os grupos tratados com a *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* (25mg/mL) e isso é corroborado por Zhao et al. (2016) onde estes testaram o extrato da folhas da *Alstonia sholaris* da mesma família da *Himatanthus bracteatus* (Apocynaceae) no tratamento da inflamação das vias respiratórias e obteve sucesso na inibindo a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α .

O tecido adiposo secreta citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e interleucina-6. A expressão de TNF- α está aumentada pode contribuir para a disfunção endotelial. O TNF- α causa dano à via de sinalização de insulina. O TNF- α também pode inibir a captação de glicose através de um aumento na expressão da forma induzida da óxido nítrico-sintase (iNOS) no músculo. Ao nível vascular, o TNF- α reduz a biodisponibilidade do NO em cultura de células endoteliais e impede a vasodilatação endotélio-dependente. O TNF- α pode também contribuir para a apoptose da célula endotelial. (BAHIA et al., 2006; CARVALHO; COLACO; FORTES, 2006).

O CD-68 é uma glicoproteína que se liga a lipoproteína de baixa densidade e é expresso em macrófago e monócitos. O presente marcador expressou positivamente no presente experimento no grupo hiperlipidêmico (conforme figura 6

B) e expressou com menor intensidade nos grupos tratados com a *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* ambas na concentração de 25mg/mL.

Durante o processo de expansão da resposta inflamatória estimulando a migração de monócitos para a túnica íntima e a diferenciação local dessas células em macrófagos, que têm como primeira função fagocitar a LDL oxidada, transformando-se em células espumosas. Vários receptores de LDL oxidada estão envolvidos na fagocitose dessa lipoproteína oxidada pelos macrófagos e na conseqüente transformação dessas células em células espumosas, como por exemplo o CD36, CD-68 e CD163 (CORRÊA-CAMACHO et al.,2007).

Isoprostanos são um grupo recém-descoberto de isômeros de prostaglandina. Os resultados de estudos anteriores sugerem que eles podem ser utilizados como marcadores de estresse oxidativo, sendo assim, no presente experimento o isoprostano expressou positivamente no grupo hiperlipidêmico (conforme figura 7 B). Em virtude de doenças cardiovasculares, pulmonares e doenças neurológicas seus níveis em amostras biológicas aumentam consideravelmente. Verificou-se que as pessoas que sofrem de diabetes, obesidade, hipercolesterolemia familiar homozigótica, hipercolesterolemia moderada, e os fumantes têm níveis mais elevados de isoprostanos na urina (CZERSKA; ZIELIŃSKI; GROMADZIŃSKA, 2016).

No estresse oxidativo vascular tem-se uma superprodução de O₂, que diminui a atividade do óxido nítrico (dilatador endógeno). De acordo com a hipótese de modificação oxidativa da aterogênese, metabólitos do oxigênio contribuem para a progressão do processo aterosclerótico, modificando oxidativamente a lipoproteína de baixa densidade (LDL). A ativação das células inflamatórias resulta no aumento dos leucócitos no sangue, o que favorece a aterogênese, promovendo a oxidação do LDL. Além disso, é razoável que o aumento da regulação dos sistemas antioxidantes desencadeie um contínuo processo inflamatório, o que conduz a uma diminuição na capacidade antioxidante. (SILVA; CERCHIARO; HONORIO, 2011).

Os biomarcadores que podem ser utilizados para avaliar oxidativo estresse in vivo têm atraído interesse em recente anos, porque a medição exata de tais estresse é necessário investigar seu papel no estilo de vida doenças como a aterosclerose ou também para avaliar o sucesso do tratamento (CZERSKA; ZIELIŃSKI; GROMADZIŃSKA, 2016).

6 CONCLUSÕES

Os extratos etanólicos da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* reduziram de forma significativa a espessura da túnica média da parte descendente da aorta.

Os extratos obtiveram redução significativa dos parâmetros sanguíneos: colesterol total, LDL, triglicérides e através da análise imunohistoquímica do TNF- α , CD-68 e isoprostano.

REFERÊNCIAS

- ALESSI, A. et al. Rosiglitazone and vascular injury in hypercholesterolemic rabbits: neointimal formation assessment. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 95, n. 3, p. 283-288, Sep. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abc/v95n3/en_aop09410.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2016.
- ALBUQUERQUE, U. P. de; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 16, supl., p. 678-689, dez. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v16s0/a15v16s0.pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2016.
- BAHIA, L. et al. O endotélio na síndrome metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 291-303, abr. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abem/v50n2/29312.pdf>>. Acesso em: 28 mar. 2016.
- BARATTO, L. C. **Estudo químico-analítico e morfoanatômico de espécies medicinais brasileiras da família Apocynaceae: *Himatanthus lancifolius* (MÜLL. ARG.) Woodson e *Rauvolfia sellowii* MÜLL. ARG.** 2010. 157 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010. Disponível em: <<http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/23500/dissertacao%20leopoldo%20baratto%20versao%20final.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 25 mar. 2016.
- BARROS, N. F. de; SIEGEL, P.; SIMONI, C. de. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: passos para o pluralismo na saúde. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 12, p. 3066-3067, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/csp/v23n12/29.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2014.
- BEIRITH, A. et al. Study of the antinociceptive action of the ethanolic extract and the triterpene 24-hydroxytormentonic acid isolated from the stem bark of *Ocotea suaveolens*. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 65, n.1, p. 50-55, Feb. 1999.
- 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.
- BROTTO, M. L.; CERVI, A. C.; SANTOS, É. P. dos. O gênero *Ocotea* (Lauraceae) no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 64, n. 3, p. 495-525, set. 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rod/v64n3/v64n3a04.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2016.

- CARVALHO, D. F. de et al . Perfil lipídico e estado nutricional de adolescentes. **Rev. Bras. Epidemiol.**, São Paulo ,v. 10, n. 4, p. 491-498, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbepid/v10n4/06.pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2016.
- CARVALHO, M. H. C. de; COLACO, A. L.; FORTES, Z. B. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo,v. 50, n. 2, p. 304-312, abr. 2006 . Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abem/v50n2/29313.pdf>>. Acesso em: 28 mar. 2016.
- CHICAGO (USA). Field Museum. **Neotropical Herbarium Specimens**. Disponível em: <<http://fm1.fieldmuseum.org/vrrc/?page=view&id=27495>>. Acesso em: 12 fev. 2016.
- CZERSKA M.; ZIELIŃSKI M.; GROMADZIŃSKA , J. Isoprostanes: a novel major group of oxidative stress markers. **Int. J. Occup. Med. Environ. Health**, Lodz, v. 29, n. 2, p. 179-190, 2016. Disponível em: <<http://ijomeh.eu/Isoprostanes-a-novel-major-group-of-oxidative-stress-markers,58565,0,2.html>>. Acesso em: 28 mar.2016.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. Colaboração de Leonan de A. Penna. Rio de Janeiro: IBDF, 1984. 6 v.
- CORRÊA-CAMACHO, C. R.; DIAS-MELICIO, L. A.; SOARES, A. M. V. C. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. **Arq. Ciênc. Saúde**, São José do Rio Preto, v. 14, n. 1, p. 41-48, jan.-mar. 2007. Disponível em:< http://repositorio-racs.famerp.br/racs_ol/vol-14-1/ID205.pdf >. Acesso em: 28 mar.2016.
- 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, I. F. et al. Antimycobacterial and nitric oxide production inhibitory activities of *Ocotea notata* from Brazilian restinga. **Scientific WorldJournal**, New York, v. 2015, n. 1-9, 2015. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2015/947248/>>. Acesso em: 22 mar. 2016.
- DE MIRANDA, A. L. et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuba*. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 66, n. 3, p. 284-286, Apr. 2000.
- EFENDY, J. L. et al. The effect of the aged garlic extract, 'Kyolic', on the development of experimental atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 132, n. 1, p. 37-42, Jul. 1997.
- ENGELHORN, C. A. et al . Espessamento médio-intimal na origem da artéria subclávia direita como marcador precoce de risco cardiovascular. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo ,v. 87, n. 5, p. 609-614, nov. 2006 . Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abc/v87n5/en_09.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2016.

FERNANDES, S. A. T. et al . Efeito da dieta hiperlipídica e do treinamento aeróbico na aterosclerose em camundongos apoE^{-/-}. **Rev. Bras. Med. Esporte**, São Paulo, v. 19, n. 6, p. 436-441, nov./dez. 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbme/v19n6/12.pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2016.

FERRARI, G. Ricerche sulle lauracee del genere *Ocotea* dell' américa latina. In: SIMPOSIO INTERNAZIONALE SULLA MEDICINA INDIGENA E POPOLARE DELL' AMERICA LATINA, 1977, Roma. **Anais...** Roma: Instituto Ítalo Latino Americano - IILA; Centro Italiano di Storia Ospitaliera - CISO; Associazione Studi Sociali Latinoamericani - ASSLA, 1979. p. 373-386.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clin. Chem.**, Baltimore, v. 28, n. 10, p. 2077-2080, Oct. 1982.

FRANÇA, W. C. S. C. et al. Análisis of the action of *himatanthus drasticus* in progression of urethane-induced lung cancer in mice. **Einstein (São Paulo)**, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 350-353, Sep. 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/eins/v9n3/1679-4508-eins-9-3-0350.pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2016.

GAYRAL, S. et al. Elastin-derived peptides potentiate atherosclerosis through the immune Neu1-PI3K γ pathway. **Cardiovasc. Res.**, Oxford, v. 102, n. 1, p. 118-127, Apr. 2014. Disponível em: <<http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/cardiovascres/102/1/118.full.pdf> >. Acesso em: 25 mar. 2016.

GRÖNROS, J. et al. Effects of rosuvastatin on cardiovascular morphology and function in an ApoE-knockout mouse model of atherosclerosis. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, Bethesda, v. 295, n. 5, H2046-H2053, 2008. Disponível em: <http://ajpheart.physiology.org/content/295/5/H2046.full.pdf+html>. Acesso em: 27 jan. 2016.

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.

KARNIK, S. K. et al. Elastin induces myofibrillogenesis via a specific domain, VGVAPG. **Matrix Biol.**, Amsterdam, v. 22, n. 5, p. 409-425, Sep. 2003.

KWON, M. J. et al. Cholesteryl ester transfer protein activity and atherogenic parameters in rabbits supplemented with cholesterol and garlic powder. **Life Sci.**, Oxford, v. 72, n. 26, p. 2953-2964, May, 2003.

LIDDELL, R. P. et al. Endovascular model of rabbit hindlimb ischemia: a platform to evaluate therapeutic angiogenesis. **J. Vasc. Interv. Radiol.**, Reston, v. 16, n. 7, p. 991-998, Jul. 2005.

LI, D.Y. et al. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. **Nature**, London, v. 393, n. 6682, p. 276-280, 1998.

- LUCETTI, D. L. et al. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **J. Inflamm. (Lond)**. [London], v. 7, p. 60, Dec. 2010. Disponível em: < <http://journal-inflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-9255-7-60> >. Acesso em: 22 mar. 2016.
- LUO, R. N. et al. Impact of rosuvastatin on atherosclerosis lesions in apolipoprotein e knockout mice. **Zhonghua Xin Xue Bing Za Zhi**, Beijing, v. 39, n. 8, p. 743-748, 2011. [English abstract].
- LUZ, H. S. et al . Prospecção fitoquímica de *Himatanthus drasticus* Plumel (Apocynaceae), da mesorregião leste maranhense. **Rev. Bras. Plantas Med.**, Botucatu, v. 16, n. 3, supl. 1, p. 657-662, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v16n3s1/04.pdf> >. Acesso em: 27 jan.2016.
- 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. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/aabc/v75n4/a06v75n4.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2016.
- MOUSTARDAS, P. et al. The complementary effects of atorvastatin and exercise treatment on the composition and stability of the atherosclerotic plaques in ApoE knockout mice. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. Sep. 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0108240>>. Acesso em: 27 jan. 2016.
- MONTRUCCHIO, D. P. et al. Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid dicentrine isolated from fruits of *Ocotea puberula*. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 78, n. 14, p. 1543-1548, Sep. 2012.
- NICHOLLS, S. J. Rosuvastatin and progression of atherosclerosis. **Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.**, London, v. 6, n. 7, p. 925-933, 2008.
- NOGUEIRA, M. R. S. **Diferença da média de hiperplasia médio-intimal pós angioplastia na artéria ilíaca de coelhos tratados com extrato seco da Curcuma longa**. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico (Master) em Ciências Cirúrgicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- QIN, Z. Soluble elastin peptides in cardiovascular homeostasis: foe or ally. **Peptides**, New York, v. 67, p. 64-73, 2015.
- 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.
- PLUMMEL, M. M. Répartition géographique du genre *Himatanthus* en Amérique tropicale. **Comptes Rendus de la Société de Biogéographie**, Paris, v. 66, n. 3, p. 103-127, 1990.

PUGAS, R. M.; PIGOZZO, C.M.; NEVES, E. L. das. Morfologia e biologia floral de *Himatanthus Bracteatus* (A. Dc.) Woodson (Apocynaceae) em um remanescente urbano de Mata Atlântica, Salvador. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 60., 2009, Feira de Santana. **Anais...** Brasília, DF, Sociedade Brasileira de Botânica, 2009.

QUINET, A. Sinopse taxonômica da família Lauraceae no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, Belo Horizonte, v. 19, n. 3, p. 563-572, Sep. 2005 . Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abb/v19n3/27371.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2016.

RODRIGUES, E.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PIRES, J. M. Phytochemical and pharmacological profile of plants indicated by caboclos of Jaú National Park (AM) as potential analgesic: part I. **Rev. Bras. Farmacogn.**, Curitiba, v. 20, n. 6, p. 981-991, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v20n6/aop0810.pdf>>. Acesso em: 9 fev. 2016.

RODRIGUES DA SILVA, L. et al . Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta Toxicol. Argent.**, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.org.ar/pdf/ata/v23n1/v23n1a04.pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2016.

ROLIM, J. C. **Diferença da hiperplasia médio intimal em coelhos submetidos a angioplastia e tratados com Moringa oleifera**. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico (Master)) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SANTOS, J. A. B. D. **Estudo da aterosclerose induzida por diferentes tipos de dieta hiperlipídica em coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*)**. 2008. 93 f. (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.

SANTOS, M. G. dos et al . Fatores de risco no desenvolvimento da aterosclerose na infância e adolescência. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 90, n. 4, p. 301-308, abr. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abc/v90n4/v90n4a12.pdf>>. Acesso em: 28 mar. 2016.

SANTOS, S. O.; ALVES, M. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Lauraceae. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 3, p. 689-703, 2012 . Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rod/v63n3/a14v63n3.pdf> >. Acesso em: 27 jan. 2016.

SHIMIZU, T. et al. Rosuvastatin activates ATP-binding cassette transporter A1-dependent efflux ex vivo and promotes reverse cholesterol transport in macrophage cells in mice fed a high-fat diet. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v. 34, n. 10, p. 2246-2253, 2014. Disponível em: <<http://atvb.ahajournals.org/content/34/10/2246.full.pdf+html>>. Acesso em: 28 jan. 2016.

SILVA, D. da C.; CERCHIARO, G.; HONORIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 300-305, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v34n2/24.pdf>>. Acesso em: 28 mar. 2016.

SIQUEIRA, A. F. A.; ABDALLA, D. S. P.; FERREIRA, S. R. G. LDL: da Síndrome metabólica à instabilização da placa aterosclerótica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 50, n. 2, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abem/v50n2/29317.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2016.

STADIUS, M. L. et al. Cell proliferation after balloon injury of iliac arteries in the cholesterol-fed New Zealand White rabbit. **Arterioscler Thromb.**, Dallas, v. 14, n. 5, p. 727-733, 1994.

WAKSMAN, R. et al. Effect of clopidogrel on neointimal formation and inflammation in balloon-denuded and radiated hypercholesterolemic rabbit iliac arteries. **J. Interv. Cardiol.**, New York, v. 21, n. 2, p. 122-128, Apr. 2008.

WANG, Y. et al. Adhesive strength of atherosclerotic plaque in a mouse model depends on local collagen content and elastin fragmentation. **J. Biomech.**, New York, v. 46, n. 4, p. 716-722, 2013.

WHEELER, J. B. et al. Relation of murine thoracic aortic structural and cellular changes with aging to passive and active mechanical properties. **J. Am. Heart Assoc.**, Oxford, v. 4, n. 3, 2015. Disponível em: <<http://jaha.ahajournals.org/content/4/3/e001744.full.pdf+html>>. Acesso em: 27 jan. 2016.

YAMAGUCHI, K. K. de L.; ALCANTARA, J. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. da. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 42, n. 4, p. 541-546, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aa/v42n4/a12v42n4.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2016.

YAMAGUCHI, M. U. Antifungal effects of Ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageninge, v. 99, n. 3, p. 507-14, Mar. 2011.

YASUDA, S. et al. Local delivery of low-dose docetaxel, a novel microtubule polymerizing agent, reduces neointimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery model. **Cardiovasc. Res.**, London, v. 53, n. 2, p. 481-486, Feb. 2002.

ZHAO, Y. L. et al. Effect of total alkaloids from *Alstonia scholaris* on airway inflammation in rats. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 178, p. 258-265, Feb. 2016.

ZSCHOCKE, S. et al. Stereostructure and anti-inflammatory activity of three diastereomers of ocobullenone from *Ocotea bullata*. **Phytochemistry**, London, v. 54, n. 6, p. 591-595, Jul. 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabelas com valores de média, desvio padrão e erro padrão

Espessura da túnica média: de todos os grupos do experimento medido em μm

Grupos	C	H	OT 25mg/mL	OT 12,5mg/mL	HT 25mg/mL	HT 12,5mg/mL	R 0,27mg/mL
Media	51,41	60,34	52,35	52,31	47,83	48,08	38,10
Desvio Padrão	2,92	4,49	5,38	2,93	3,39	3,85	2,04
Erro Padrão	1,10	1,70	2,03	1,10	1,28	1,45	0,77

Fonte: Autor.

Percentual de fibras elásticas

Grupos	C	H	OT 25mg/mL	OT 12,5mg/mL	HT 25mg/mL	HT 12,5mg/mL	R 0,27mg/mL
Media	51,05	57,69	53,43	56,91	55,28	57,11	54,73
Desvio Padrão	6,75	1,35	6,24	1,23	4,44	4,60	4,32
Erro Padrão	2,55	0,51	2,35	0,46	1,67	1,74	1,63

Colesterol total de todos os grupos do experimento medido em mg/dL

Grupos	C	H	OT 25mg/mL	OT 12,5mg/mL	HT 25mg/mL	HT 12,5mg/mL	R 0,27mg/mL
Media	80,32	224,20	163,57	148,14	178,70	143,70	106,14
Desvio Padrão	11,05	29,27	48,92	27,92	18,96	24,39	17,47
Erro Padrão	4,17	11,06	18,49	10,55	7,74	9,21	6,60

HDL de todos os grupos do experimento medido em mg/dL.

Grupos	C	H	OT 25mg/mL	OT 12,5mg/mL	HT 25mg/mL	HT 12,5mg/mL	R 0,27mg/mL
Media	53,19	43,71	73,25	55,19	49,26	53,24	45,85
Desvio Padrão	3,08	10,73	5,87	5,51	5,45	4,69	8,76
Erro Padrão	1,16	4,05	2,22	2,08	2,22	1,77	3,31

LDL: essa lipoproteína de baixa densidade e os valores representados em mg/dL.

Grupos	C	H	OT 25mg/mL	OT 12,5mg/mL	HT 25mg/mL	HT 12,5mg/mL	R 0,27mg/mL
Media	15,62	143,61	113,37	85,72	121,54	87,40	31,28
Desvio Padrão	10,80	24,31	42,82	23,68	21,07	22,36	10,22
Erro Padrão	4,08	9,18	16,18	8,95	8,60	8,45	3,86

Triglicerídeo: foi medido por teste enzimático colorimétrico e medido em mg/dL

Grupos	C	H	OT 25mg/mL	OT 12,5mg/mL	HT 25mg/mL	HT 12,5mg/mL	R 0,27mg/mL
Media	32,42	63,71	36,75	36,08	39,05	28,31	35,42
Desvio Padrão	8,50	24,06	14,27	7,46	18,92	13,39	7,76
Erro Padrão	3,21	9,09	5,39	2,82	7,72	5,06	2,93

Peso do coração

Grupos	C	H	OT 25mg/mL	OT 12,5mg/mL	HT 25mg/mL	HT 12,5mg/mL	R 0,27mg/mL
Media	0,17	0,14	0,13	0,14	0,13	0,14	0,17
Desvio Padrão	0,03	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,03
Erro Padrão	0,01	0,008	0,005	0,01	0,007	0,008	0,01

Glicemia (início do experimento):

Grupos	C	H	OT 25mg/mL	OT 12,5mg/mL	HT 25mg/mL	HT 12,5mg/mL	R 0,27mg/mL
Media	96,28	90,71	95,57	97,00	96,57	94,57	91,14
Desvio Padrão	3,90	13,82	3,59	3,55	3,50	3,82	6,14
Erro Padrão	1,47	5,22	1,36	1,34	1,32	1,44	2,32

Glicemia (21 dias de experimento):

Grupos	C	H	OT 25mg/mL	OT 12,5mg/mL	HT 25mg/mL	HT 12,5mg/mL	R 0,27mg/mL
Media	77,28	71,57	90,42	81,85	79,00	79,28	77,71
Desvio Padrão	5,40	10,87	20,32	15,79	16,08	11,04	3,54
Erro Padrão	2,04	4,11	7,68	5,96	6,07	4,17	1,34

Glicemia (término do experimento):

Grupos	C	H	OT 25mg/mL	OT 12,5mg/mL	HT 25mg/mL	HT 12,5mg/mL	R 0,27mg/mL
Media	77,28	75,85	60,85	63,57	53,57	56,85	76,28
Desvio Padrão	5,40	26,11	13,69	6,39	7,52	14,27	4,27
Erro Padrão	2,04	9,86	5,17	2,41	2,84	5,39	1,61

ANEXOS

ANEXO A – Comprovante Comitê de Ética UNCISAL



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE ALAGOAS – UNCISAL
Transformada pela lei nº 6.660 de 28 de dezembro de 2005
Campus Governador Lamenha Filho
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UNCISAL
Rua Jorge de Lima 113, Trapiche da Barra,
Cep 57.010.300 – Maceió-AL

Protocolo N° 60-A

Título: "Efeitos da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* nas fibras elásticas e túnica média da aorta de camundongos C57BL6J em um modelo de aterosclerose experimental"

Pesquisador Responsável: Rodrigo Freitas Monte Bispo

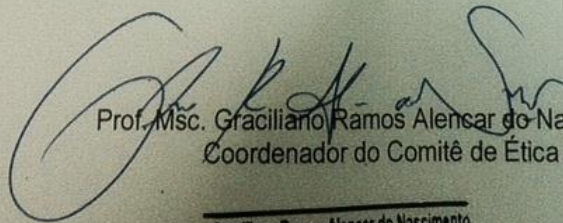
Maceió, 15 de abril de 2014

Sr^(a). Pesquisador(a),

Conforme deliberação em plenária ordinária do CEP/UNCISAL ocorrida no dia 10/04/15 foi de consenso a **aprovação da alteração do título** do protocolo nº 60-A, agora intitulado: "**Efeitos da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* nas fibras elásticas e túnica média da aorta de camundongos C57BL6J em um modelo de aterosclerose experimental**".

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 consubstanciado acerca da pesquisa, seu desenvolvimento, bem como qualquer alteração, problema ou interrupção da mesma.

Atenciosamente,



Prof. Msc. Graciliano Ramos Alencar do Nascimento
Coordenador do Comitê de Ética

Graciliano Ramos Alencar do Nascimento
Coordenador do CEP/UNCISAL

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

ANEXO B – Comprovante de compra da dieta (ração)



Quantidades produzidas de cada substância na fórmula

Pedido
 Cliente Rodrigo Freitas UFAL
 Data 23/09/2015
 Validade 22/12/2015 Em geladeira 21/03/2016 Em freezer
 Manipulador
 Formula Dieta HF 1,25% Col + 0,5% Ac Colico
 Dose (g ou ml) 4.600 1 vezes
 Dose (Kg ou L) 4,60

Cód	Produto	Quantidade prescrita	Fornecedor	Fator correção	Lote	Validade	Quantidade prod. (g/ml)	Pesados prod. (g/ml)	Verif OK
	AMIDO DE MILHO	30,12000%	Ingredion	1	1056717	11/04/17	1.385,520	1.385,520	
	CASEINA	20,00000%	MSI	1	2021T1000	20/07/16	920,000	920,000	
	AMIDO DEXTRINIZADO	13,20000%	Ingredion	1	1051633	27/03/17	607,200	607,200	
	SACAROSE	10,00000%	GA	1	4041582	23/04/16	460,000	460,000	
	BANHA	11,00000%	Estrela	1		12/02/16	506,000	506,000	
	OLEO DE SOJA	4,00000%	Cocamar	1	811512	11/06/2016	184,000	184,000	
	CELULOSE MICROCRISTALINA	5,00000%	Farmos	1	10713146	30/06/18	230,000	230,000	
	MIX MINERAL AIN 93 G	3,50000%	PragSoluções	1	180915	18/09/16	161,000	161,000	
	MIX VITAMINICO AIN 93	1,00000%	PragSoluções	1	020915	02/09/16	46,000	46,000	
	L CISTINA	0,18000%	Farmos	1	104604	03/06/2018	8,280	8,280	
	BITARTARATO DE COLINA	0,25000%	Farmos	1	3006290	30/07/19	11,500	11,500	
	COLESTEROL	1,25000%	Sigma	1	SLBM6235V	31-04-21	57,500	57,500	
	ACIDO COLICO	0,50000%	Sigma	1	SLBB1065V	30/10/2018	23,000	23,000	
	BHT	0,00500%	Oficinallis	1			0,230	0,230	
		100,005%					4.600	4.600	

dilucioes: 1/0000 em sacarose

Manipulado:

Aprovado:

Obs: Produto destinado a pesquisa. Isento de registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

ANEXO C – Patente depositada no INPI

Pedido de Patente sob nº BR 20 2015 003755-0.

ANEXO D – Protocolo Colesterol total.

COLESTEROL Liquiform

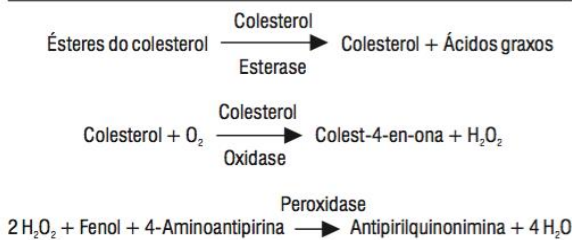
Instruções de Uso

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 absorvidade 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 absorvância 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 frequentemente 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 absorvância 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 absorvâncias 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 como 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 hiperlipoproteïnemias 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.

ANEXO E – Protocolo HDL

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 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.

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 absorvância entre 490 e 540 nm.
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.
5. Centrífuga 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 absorvância em 405 ou 415 nm acertando o zero com água deionizada ou destilada.

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

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 absorvâncias 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.

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

Exemplo

Absorvância do Teste = 0,290
Absorvância 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, MartinezTLR, 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

ANEXO F – Protocolo triglicérides

TRIGLICÉRIDES Liquiform

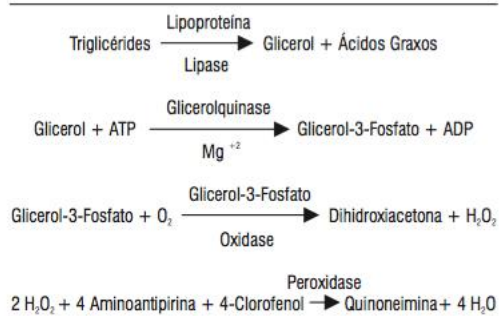
Instruções de Uso

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. [REI] - 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.

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

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

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) x 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 NCEP².

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 desejáveis³.

São causas de elevação dos triglicérides as várias doenças de lípidos 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 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

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