

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**RODRIGO FREITAS MONTE BISPO**

**EFEITOS DA LEUCOANTOCIANIDINA DE UVA SOBRE A CAMADA  
SUBENDOTELIAL ARTERIAL EM COELHOS ALBINOS (*Oryctolagus cuniculos*)  
SUBMETIDOS À ARTERIOSCLEROSE EXPERIMENTAL**

Maceió

2011

**RODRIGO FREITAS MONTE BISPO**

**EFEITOS DA LEUCOANTOCIANIDINA DE UVA SOBRE A CAMADA  
SUBENDOTELIAL ARTERIAL EM COELHOS ALBINOS (*Oryctolagus cuniculos*)  
SUBMETIDOS À ARTERIOSCLEROSE EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde para Obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Célio Fernando de Sousa Rodrigues.

Maceió  
2011

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

- B622e Bispo, Rodrigo Freitas Monte.  
Efeitos da leucoantocianidina de uva sobre a camada subendotelial arterial em coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculos*) submetidos à arteriosclerose experimental / Rodrigo Freitas Monte Bispo. – 2011.  
94 f. : il.
- Orientador: Célio Fernando de Sousa Rodrigues.  
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências da Saúde. Maceió, 2011.
- Bibliografia: f. 79-85.  
Apêndices: f. 86-89.  
Anexos: f. 90-94.
1. Leucoantocianidina. 2. Arteriosclerose. 3. Estudo experimental.  
4. Coelhos. I. Título.

CDU: 616.13-004.6



Universidade Federal de Alagoas  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Praça Afrânio Jorge, s/n. Prado  
CEP 57.010-020. Maceió-AL  
(82) 3223-5613; 3336-0757  
e-mail: [pgcs@propep.ufal.br](mailto:pgcs@propep.ufal.br)

Defesa da Dissertação de Mestrado do aluno Rodrigo Freitas Monte Bispo, intitulado: "EFEITO DA LEUCOANTOCIANIDINA DE UVA SOBRE A CAMADA SUBENDOTELIAL ARTEIAL EM COELHOS ALBINOS (*Oryctolagus cuniculus*) SUBMETIDOS À ARTERIOSCLEROSE EXPERIMENTAL", orientado pelo Prof. Dr. Célio Fernando de Sousa Rodrigues, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 7 de outubro de 2011.

Os membros da Banca Examinadora consideraram o candidato APROVADO

Banca Examinadora:

Prof.<sup>a</sup> Dra. Daniele Gonçalves Bezerra – (UFAL)

Prof. Dr. Euclides Maurício Trindade Filho - (UNCISAL)

Profa. Dra. Quitéria Maria Wanderley Rocha – (UNCISAL)

O mundo é um lugar perigoso de se viver, não por causa daqueles que fazem o mal, mas sim por causa daqueles que observam e deixam o mal acontecer.

Albert Einstein

A Deus.

A minha família que sempre ajudou de todas as formas.

Um agradecimento especial à minha noiva, Karina Torres Alucio a quem devo todo o apoio e entusiasmo que me foram decisivos no mestrado. Agradeço ao meu amigo pela sua grande força, estímulo e seus ensinamentos: Prof. Dr. Célio Fernando de Sousa Rodrigues.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Alagoas, que através de seus professores conseguiram implantar o mestrado.

Ao orientador, professor Dr. Célio Fernando de Sousa Rodrigues, com extrema competência, sabedoria e atenção com que me orientou para o meu engajamento no meio experimental.

Todos os membros do grupo de pesquisa em arteriosclerose: José André, Acácia Maria, Josefa Sileda e Amanda que de uma forma ou de outra acrescentaram muito neste trabalho.

Aos professores Antonio José Casado Ramalho, Katharina Jucá, José André, Walter Toledo de Lima, Fernando Wagner, Davi Moraes que contribuíram muito para consolidar minha pesquisa experimental e que muitas vezes me substituíram na minha ausência no trabalho.

A Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde –FCBS –CESMAC, que através da permissão para realização dos experimentos no biotério da instituição.

A todos os meus colegas do laboratório de Anatomia Humana e Animal do CESMAC: Carlos, Júnior, Girleide, Nazaré, Anacleto e Petrúcio por terem me ajudado, tanto no reforço positivo como no material para dissecação dos animais.

Ao senhor, Valdir e aos meus orientandos: Junior, Glenda e Gabriela (do curso de Biomedicina) obrigado por ter me ajudado tanto durante os experimentos. Ao Maciel do laboratório de histologia do Hospital Universitário pelos ensinamentos, atenção e ajuda nos preparos das lâminas histológicas. A farmacêutica Daniele (da À Fórmula farmácia de manipulação) pela ajuda na manipulação do fitofármaco. A todos os meus professores de Pós-graduação, muito obrigado pela dedicação, interesse, seus conhecimentos e experiências compartilhadas nas aulas.

A Faculdade Integrada Tiradentes – FITS, na pessoa do prof. Dario Arcanjo de Santana que sempre apoiou a capacitação docente e que nos momentos difíceis tive seu apoio incondicional.

## RESUMO

Produtos vegetais antioxidantes auxiliam o corpo na resistência as várias condições patológicas, especialmente aquelas associadas com o envelhecimento, câncer e as doenças cardiovasculares, e por isso são classificados como agentes quimioprotetores. As propriedades antioxidantes de alguns compostos fenólicos como a leucoantocianidina já tem ação comprovada no que diz respeito na redução do colesterol, no entanto, na quantificação da redução da aterosclerose não encontramos relatos. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo analisar efeito da leucoantocianidina de uva na redução de placa aterosclerótica experimental em coelhos. Foram utilizados coelhos da Nova Zelândia (n=27) adultos entre 7 a 8 meses de idade divididos em 3 grupos: grupo controle com ração 200 g e água *ad libitum* (G1); o grupo com ração 200g, 1,5 g de colesterol + 10mL de gema (G2); grupo com ração 200g, 1,5 g de colesterol + 10mL de gema e tratado com 50mg/kg da leucoantocianidina de uva (G3). Todos os grupos foram alimentados durante o período de 100 dias, tendo como objetivo reproduzir o modelo de indução de aterosclerose em coelhos albinos Nova Zelândia; Verificar os efeitos da leucoantocianidina de uva sobre o: colesterol total, LDL, HDL, VLDL, lipídios totais, triglicerídeos; Quantificar os efeitos da leucoantocianidina de uva sobre a camada subendotelial arterial utilizando o Programa IMAGE-PRO-PLUS 4.5. A coleta de sangue para as dosagens do perfil lipídico dos animais aconteceram nos momentos 0, 33, 66 e 99 dias. Ao término do período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia. Segmentos do arco aórtico, da artéria carótida e artéria femoral (direitas e esquerdas) foram coletados para análise histopatológica. Como esperado o grupo G1 não observou alteração, o grupo G2 verificamos um espessamento severo da camada subendotelial, o grupo G3 houve espessamento da camada subendotelial, no entanto, numa forma menos grave comparado com o grupo G2. Ao microscópio, foram observadas células espumosas no arco aórtico e sem alterações nas artérias: femoral e carótida e espessamento de endotélio no grupo G2 de forma significativa comparando-os ao G1. A leucoantocianidina de uva foi capaz de reduzir 4,35 % do espessamento da camada subendotelial, foi capaz de reduzir forma significativa a esteatose hepática (macrovesicular e microvesicular), bem como o tamanho dos xantomas que surgiram distribuídos nos corpo dos animais. A leucoantocianidina de uva não modifica, no presente modelo experimental de aterosclerose em coelhos, os níveis de colesterol total, LDL, VLDL, HDL, triglicerídeos e lipídeos totais de forma significativa.

Palavras-chave: Leucoantocianidina. Aterosclerose. Coelho.

## ABSTRACT

Vegetable products, antioxidants help the body resistance in various pathological conditions, especially those associated with aging, cancer and cardiovascular diseases, and so are classified as agent quimioprotetores. The antioxidant properties of some phenolic compounds such as leucoantocianidina already have a proven action in respect of the reduction of cholesterol, however, to quantify the reduction of atherosclerosis were no reports. Thus, this study aims to examine the effectiveness of grape leucoantocianidina reduction in experimental atherosclerotic plaque in rabbits. We used New Zealand rabbits (n = 27) adults from 7 to 8 months of age divided into 3 groups: control group with 200 g feed water *ad libitum* (G1), group with feed 200g, 1.5 g cholesterol + 10 ml of yolk (G2), group with feed 200g, 1.5 g cholesterol + 10 ml of yolk and treated with 50mg/kg of leucoantocianidina grape (G3). All groups were fed during 100 days, aiming to replicate the model of induced atherosclerosis in New Zealand albino rabbits; assess the effects of grape leucoantocianidina for: total cholesterol, LDL, HDL, VLDL, total lipids, triglycerides; leucoantocianidina Quantifying the effects of grape on the arterial subendothelial layer using the Program IMAGE-PRO-PLUS 4.5. Blood samples for measurements of lipid profiles of animals occurred at 0, 33, 66 and 99 days. At the end of the experiment, the animals were euthanized. Segments of the aortic arch, carotid artery and femoral artery (right and left) were collected for histopathological analysis. As expected the G1 did not observe change, G2 found a severe thickening of the subendothelial layer, the group G3 was thickening of the subendothelial layer, however, a less severe form compared to G2. Under the microscope, foam cells were observed in the aortic arch and no changes in the arteries, femoral and carotid artery thickening and endothelial G2 significantly compared to the G1. Leucoantocianidina grape was able to reduce 4.35% of the thickening of the subendothelial layer, was able to significantly reduce hepatic steatosis (macrovesicular and microvesicular), as well as the size of xanthomas arising distributed in the body of animals. Leucoantocianidina The grape does not change, in this experimental model of atherosclerosis in rabbits, the levels of total cholesterol, LDL, VLDL, HDL, triglycerides and total lipids significantly.

Keywords: Leucoantocianidina. Atherosclerosis. Rabbit.

## LISTA DE FIGURAS

- Figuras 1 – Coelho identificado na face interna auricular - coelho 4V grupo G3 – (Ração, 10mL de Gema e 1,5g de Colesterol + leucoantocianidina de uva) ..... 36**
- Figura 2 – Artéria auricular esquerda central (No coelho grupo 1 - Seta)..... 38**
- Figura 3 – Aspecto histológico corado com tricrômio de masson do arco aórtico (corte longitudinal) ao estereoscópico identificando os 6 pontos de medição no Programa IMAGE-PRO PLUS 4.5..... 40**
- Figura 4 – Mensuração e identificação dos valores em milímetros dos espessamentos da camada subendotelial do arco aórtico no Programa IMAGE-PRO PLUS 4.5..... 41**
- Figura 5 – Fígado normal (ausência de esteatose) (G1 – Grupo Controle)..... 43**
- Figura 6 – Fotomicrografia do fígado normal ausência de esteatose, Hepatócito (seta) corado com Tricrômio de Gomori 40X (G1 – Grupo Controle)..... 44**
- Figura 7 – Fotomicrografia do arco da aorta ausência de espessamento da camada subendotelial corado com Tricrômio de Masson 10X (G1 – Grupo Controle)..... 44**
- Figura 8 – Observa-se área infartada (seta) próximo ao ápice do coração. (grupo G2 – 1,5g de colesterol e 10mL de gema)..... 45**
- Figura 9 – Fígado com esteatose hepática (G2 – Grupo Ração, 1,5g de colesterol e 10mL de gema de ovo)..... 46**
- Figura 10 – Fotomicrografia do fígado com esteatose hepática macrovesicular, hepatócito aumentado (seta) corado com Tricrômio de Gomori 40X(G2 – Ração,1,5g de colesterol e 10mL de gema)..... 46**
- Figura 11 – Acúmulo de gordura subcutânea na face interna da pata Direita xantoma seta (Grupo G2 – Ração,1,5g de colesterol e 10mL de gema)..... 47**
- Figura 12 – Fotomicrografia do xantoma corado com hematoxilina e eosina 10X, macrófagos espumosos e acúmulo de lipídeos na derme (seta) (Grupo G2 – Ração,1,5g de colesterol e 10mL de gema).... 47**
- Figura 13 – Fígado com esteatose hepática (Grupo G3 – Ração, 1,5g de colesterol, 10mL de gema de ovo e leucoantocianidina de uva).... 48**

<b>Figura 14 – Fotomicrografia do fígado com esteatose hepática Microvesicular hepatócito moderadamente aumentado (seta) corado com Tricrômio de Gomori 40X(Grupo G3 – Ração,1,5g de colesterol, 10mL de gema e leucoantocianidina de uva).....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 15 – Fotomicrografia com ausência de espessamento da camada subendotelial do arco aórtico G1 (controle-ração), corante Tricrômio de Masson 20X .....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 16 – Fotomicrografia com presença de espessamento da camada subendotelial do arco aórtico G3 (leucoantocianidina de uva), corante Tricrômio de Masson 10X.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 17 – Fotomicrografia com presença de espessamento da camada subendotelial do arco aórtico G2 (1,5 g de colesterol c/ 10mL de gema), corante Tricrômio de Masson 10X. Fotomicrografia com presença de espessamento da camada subendotelial do arco aórtico G2 (1,5 g de colesterol c/ 10mL de gema), corante Tricrômio de Masson 10X.....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 – Média, desvio padrão do CT (Colesterol Total), conforme o dia e grupo experimental.....</b>	<b>56</b>
<b>Tabela 2 – Média, desvio padrão da LDL, conforme o dia e grupo experimental.....</b>	<b>58</b>
<b>Tabela 3 – Média, desvio padrão do VLDL, conforme o dia e grupo experimental.....</b>	<b>61</b>
<b>Tabela 4 – HDL média e desvio padrão conforme o dia e grupo experimental.....</b>	<b>63</b>
<b>Tabela 5 – TRIGLICERÍDEOS – média e desvio padrão conforme o dia e grupo experimental.....</b>	<b>67</b>
<b>Tabela 6 – LIPÍDEOS TOTAIS – média e desvio padrão conforme o dia e grupo experimental.....</b>	<b>69</b>
<b>Tabela 7 – MENSURAÇÃO DA PLACA ARTERIOSCLERÓTICA – média e desvio padrão ao término do experimento.....</b>	<b>70</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1 – Representação de evolução do peso dos animais durante o experimento dos grupos: G1, G2 e G3, durante os 100 dias de experimento. Observa-se que não houve diferença significativa entre os pesos dos animais em todos os tempos do experimento, <math>p=0,7895</math>.....</b>	<b>53</b>
<b>Gráfico 2 – Valores de CT dos animais em todo o experimento e seus respectivos grupos: G1, G2 e G3, e dia: zero, 33, 66 e 99 com a dieta de 200g de ração por animal/dia.....</b>	<b>54</b>
<b>Gráfico 3 – Valores de LDL dos animais em todo o experimento e seus respectivos grupos: G1, G2 e G3 e dias: zero, 33, 66 e 99.....</b>	<b>56</b>
<b>Gráfico 4 – Valores de VLDL dos animais em todo o experimento e seus respectivos grupos: G1, G2 e G3 e dias: zero, 33, 66 e 99.....</b>	<b>59</b>
<b>Gráfico 5 – Valores de HDL dos animais em todo o experimento e seus respectivos grupos: G1, G2 e G3 e dias: zero, 33, 66 e 99.....</b>	<b>61</b>
<b>Gráfico 6 – Evolução de LDL e HDL.....</b>	<b>64</b>
<b>Gráfico 7 – Valores de triglicerídeos dos animais em todo o experimento e Seus respectivos grupos: G1, G2 e G3 e dias: zero, 33, 66 e 99...</b>	<b>65</b>
<b>Gráfico 8 – Valores de lipídeos totais dos animais em todo o experimento e seus respectivos grupos: G1, G2 e G3 e dias: zero, 33, 66 e 99..</b>	<b>67</b>
<b>Gráfico 9 – Mensuração da camada subendotelial .....</b>	<b>70</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Acetil CoA</b>	Acetilcoenzima A
<b>CT</b>	Colesterol total
<b>DAC</b>	Doenças aterocoronarianas
<b>DIA ZERO</b>	Início do experimento
<b>E-SELECTINA</b>	Molécula de adesão celular seletiva
<b>G1</b>	GRUPO 1 Controle 200g de ração
<b>G2</b>	GRUPO 2 Ração 200g, 10mL de GEMA e 1,5 g de colesterol
<b>G3</b>	GRUPO 3 Ração, 10mL de GEMA, COLESTEROL 1,5 g e Fitofármaco leucoantocianidina de uva
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>HMG-CoA redutase</b>	Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase
<b>ICAM 1</b>	Molécula inter-celular de adesão 1
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IM</b>	Intramuscular
<b>IV</b>	Intravenosa
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>LPT</b>	Lipídeos totais
<b>n.s</b>	Não significativa
<b>NFκB</b>	Fator nuclear kappa – B
<b>O.M.S.</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PAI 1</b>	Ativador do plasminogênio-1
<b>PDGF</b>	Fator do crescimento derivado da plaqueta
<b>PGI2</b>	Prostaciclina
<b>P-SELECTINA</b>	Molécula de adesão celular
<b>TNF-alfa</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TRAMBOXANO A2</b>	Membro da família de lipídeos chamada eicosanóides
<b>VCAM 1</b>	Molécula de adesão celular vascular 1
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Aterosclerose</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Fatores de Risco para Aterosclerose</b> .....	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>Formação da Placa Aterosclerótica</b> .....	<b>20</b>
<b>2.4</b>	<b>Modelo Experimental de Aterogênese em Coelhos</b> .....	<b>23</b>
<b>2.5</b>	<b>Lipoproteínas e Aterosclerose</b> .....	<b>25</b>
<b>2.6</b>	<b>Tratamento da Aterosclerose e o Antioxidante Leucoantocianidina de Uva</b> .....	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Amostra</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Randomização da Amostra</b> .....	<b>35</b>
<b>4.3</b>	<b>Preparo e Administração da Dieta Aterogênica</b> .....	<b>37</b>
<b>4.4</b>	<b>Dosagem Bioquímica</b> .....	<b>38</b>
<b>4.5</b>	<b>Eutanásia e Histologia</b> .....	<b>38</b>
<b>4.6</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	<b>39</b>
<b>4.7</b>	<b>Mensuração das Artérias</b> .....	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
<b>5.1</b>	<b>Adaptação à Dieta</b> .....	<b>43</b>
<b>5.2</b>	<b>Análise Histológica</b> .....	<b>49</b>
<b>5.3</b>	<b>Peso dos Animais</b> .....	<b>52</b>
<b>5.4</b>	<b>Valores de Colesterol e suas Frações</b> .....	<b>53</b>

5.4.1	Colesterol Total.....	53
5.4.2	Colesterol LDL.....	56
5.4.3	Colesterol VLDL.....	58
5.4.4	Colesterol HDL.....	61
5.4.5	Gráfico de Evolução LDL e HDL.....	63
5.4.6	Triglicerídeos.....	64
5.4.7	Lipídeos Totais.....	67
5.4.8	Mensuração das artérias.....	69
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>6.1</b>	<b>Formação da Placa Arteriosclerótica.....</b>	<b>72</b>
<b>6.2</b>	<b>Modelo Experimental de Arteriosclerose em Coelhos.....</b>	<b>73</b>
<b>6.3</b>	<b>Efeito da Leucoantocianidina de Uva nos Níveis Séricos Sanguíneos..</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>86</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>90</b>



Os efeitos benéficos do vinho, em doses diárias estão bem difundidos nos meios de comunicação. Ampla também é a divulgação dos seus efeitos benéficos e protetores contra a doença aterosclerótica. Estes efeitos pesquisados e propagados são hoje sabidamente conhecidos devido aos princípios ativos do *Vitis vinifera*, dentre eles a leucoantocianidina de uva (pó liofilizado) que é bastante difundido e comercializado.

Muito se tem pesquisado sobre a relação entre o consumo de vinho e suas frações de flavonóides (antocianidinas, proantocianidinas e leucoantocianidina) Porém os efeitos benéficos cardiovasculares não são tão claros, já que o efeito benéfico do vinho, do extrato bruto de antioxidantes, sejam flavonóides ou outros, dependem dos seguintes fatores: se o experimento é *in vitro* ou *in vivo*, a espécie de animal utilizado, modelo de indução da patologia, idade dos animais, origem do extrato e sua via de administração, bem como o tempo de duração do experimento (VAN DER WORP et al., 2010).

Segundo Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2007) durante os últimos anos observou-se uma ligeira diminuição da mortalidade por causas cardiovasculares em países desenvolvidos, enquanto elevações relativamente rápidas têm ocorrido em países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil. Conforme os últimos dados da OMS existe uma tendência de aumento de doenças cardiovasculares, agravando ainda mais o quadro de morbidade e mortalidade nestes países (SPOSITO et al., 2007).

A arteriosclerose 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. Este fenômeno originará uma placa fibrosa que se projeta para dentro do lúmen do vaso, levando a uma série de complicações circulatórias (CORRÊA-CAMACHO; DIAS-MELICIO; SOARES, 2007).

Segundo Hackam e Anand (2003), a palavra aterosclerose vem do grego atero que significa caldo ou pasta, e esclerose, endurecimento.

O termo arteriosclerose está relacionado a três variantes morfológicas distintas: a aterosclerose, caracterizada por espessamento e acúmulo de gordura da túnica íntima vascular, ou seja, espessamento da camada subendotelial; a esclerose média calcificada de Monckeberg, que é caracterizada por calcificação da túnica média das artérias; e a arteriosclerose caracterizada por um espessamento e endurecimento proliferativo ou hialino das paredes das pequenas artérias e arteríolas (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996).

Para realização de experimentos que envolvam espessamento da camada subendotelial e possivelmente a formação da arteriosclerose, os coelhos são os melhores modelos, devido à excreção lenta do colesterol exógeno e desenvolvimento da doença de forma rápida, ocasionando lesões em regiões da aorta proximal, mais do que na distal. A aorta em coelhos pode apresentar superfície afetada com formação de células espumosas na região subendotelial, sem ulceração, necrose, fibrose ou trombose. (STEBENS, 1986).

Várias drogas são usadas na redução do colesterol e conseqüentemente da aterosclerose, tais como: inibidores da enzima HMG-CoA redutase, sequestradores de colesterol, fitoesteróis, fitofármacos e os fibratos.

Em artigos pesquisados, não foram encontrados relatos da quantificação da formação e espessura da camada subendotelial caracterizada pelo início de surgimento de placas ateroscleróticas em coelhos sobre tratamento com a leucoantocianidina de uva.

A determinação do efeito deste antioxidante contribuirá para construção de outros experimentos para indução de arteriosclerose, em coelhos, que possa servir como referência para o desenvolvimento de outras pesquisas, que visem à prevenção, o tratamento ou a redução da arteriosclerose.



## **2.1 Arteriosclerose**

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica possuindo várias causas que surge por resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (SPOSITO et al., 2007). Jaldin et al. (2006) acrescentam que a arteriosclerose é uma das doenças que acomete mais pessoas no mundo e é uma das causas de morte mais comuns no hemisfério ocidental. Na mesma abordagem Luz; Laurindo; Chagas (2003), afirmam que a dieta gordurosa promove o aumento de colesterol no sangue e é um fator preponderante as várias doenças ateroscleróticas na América e na Europa.

Aterosclerose é um processo crônico, progressivo e sistêmico que tem como mecanismo uma resposta inflamatória e fibroproliferativa no endotélio de um vaso sanguíneo. Nesta patologia é comum encontrar vasos arteriais comprometidos como da aorta, carótidas, renais, ilíacas e femorais. Entre os principais fatores de risco para lesão arterial encontra-se a hipercolesterolemia, hipertensão arterial, diabetes, tabagismo, obesidade, envelhecimento e fatores genéticos (LUZ; LAURINDO; CHAGAS, 2003).

Grande parte do processo de arteriosclerose ocorre a partir da infiltração de células da circulação sanguínea para locais específicos da parede vascular. Além dos efeitos locais da inflamação na lesão aterosclerótica, os aspectos sistêmicos da resposta inflamatória podem afetar o risco trombótico (SERRANO JÚNIOR et al., 2003). Além do risco trombótico a doença aterosclerótica coronária é uma doença lenta e gradual, que se inicia na infância e adolescência, fortemente influenciada por fatores genéticos e pelo estilo de vida, e que apresentará suas principais manifestações clínicas após quatro a cinco décadas de evolução. Sua progressão está diretamente relacionada à presença dos fatores de risco: hipercolesterolemia, hipertensão, tabagismo, sedentarismo, estresse, diabetes, obesidade que serão descritos a seguir (XAVIER, 2002).

## **2.2 Fatores de Risco para Aterosclerose**

Para se descobrir características específicas que sejam relacionadas a ocorrência das doenças aterocoronarianas (DAC), é necessário voltar aos estudos

demográficos e estatísticos de indivíduos específicos. Estes estudos foram realizados durante vários anos, que têm o objetivo de identificar alguns hábitos de pessoas que estão relacionados à chance de desenvolver DAC. Dentre os fatores de risco a hipercolesterolemia é a mais comum principalmente em indivíduos com hábitos alimentares inadequados. Podemos atribuir as hiperlipidemias às seguintes condições básicas: causa genética, distúrbios ou falência de órgãos ou adquirida em função de má orientação higieno-dietética (RANG et al., 2004).

Pode-se classificar as hiperlipidemias como isoladas quando somente um componente lipídico está elevado por exemplo, só o colesterol ou triglicerídeos ou mistas, quando mais de um componente lipídico sérico encontra-se elevado por exemplo, colesterol e triglicerídeos ou, ainda, quando o HDL está diminuído em associação com o aumento de triglicerídeos e/ou elevação dos níveis de LDL. As hiperlipidemias também podem ser classificadas como primárias ou secundárias. As primárias estão relacionadas a hipercolesterolemia comum ou familiar homozigótica e heterozigótica, hipertrigliceridemia comum ou familiar ou familiar combinada, disbetalipoproteinemia, síndrome de quilomicronemia, hiperalfalipoproteínaemia. As secundárias são secundárias a uma ou mais doenças pré-existentes, que podem ter origem genética, como por exemplo: hipotireoidismo, diabetes melito, síndrome nefrótica, falência renal, icterícia obstrutiva, glicogenoses, hileomatose, etilismo, anorexia nervosa, deficiência do hormônio do crescimento, lipodistrofia. (RANG et al, 2004).

### **2.3 Formação da Placa Arteriosclerótica**

Nesta revisão pretende-se descrever a fisiopatologia da arteriosclerose, modelos experimentais de indução de aterosclerose em animais, bem como seu tratamento.

O processo de aterogênese pode ser percebido em apenas uma semana de exposição a uma dieta hipercolesterolêmica. De forma rápida, a atividade inflamatória se torna nítida, com aumento das moléculas de adesão e migração celular, gerando a diferenciação de monócitos em macrófagos que se tornam captadores para LDL oxidado, que determina na formação das células espumosas, uma etapa inicial da aterogênese (LUZ; FAVARATO, 1999).

Em sua fisiopatologia, segundo Wilmore e Costill (2001) o surgimento da arteriosclerose ocorre a partir do momento que um irritante sanguíneo lesa ou arranha a parede arterial e expõe o tecido conjuntivo subjacente, desta forma as plaquetas e os monócitos circulantes são então atraídos ao local da lesão e aderem ao tecido conjuntivo exposto. As plaquetas liberam uma substância denominada fator do crescimento derivado da plaqueta (PDGF), que promove a migração das células musculares lisas da túnica média para a túnica íntima. Uma placa composta basicamente por células musculares lisas, tecido conjuntivo e resíduos formam-se no local da lesão. À medida que a placa cresce, ela estreita a luz arterial e impede o fluxo sanguíneo adequado. Os lipídeos séricos, especificamente as LDL são depositados na placa. Quando pedaços da placa são desprendidos, podem iniciar a formação de coágulos que se alojam em outras partes do vaso.

Higuchi e Gutierrez (2002) acrescentam que as lesões arterioscleróticas surgem principalmente a partir da segunda década de vida e são formadas por um centro acelular de lipídeos e restos necróticos, circundado por células xantomatosas (são células que englobaram grandes quantidades de gordura, correspondendo a macrófagos e, em menor grau, a células musculares lisas), mais externamente, pela chamada capa fibrosa constituída de fibras musculares lisas e tecido conjuntivo fibroso. Pode ainda haver vasos neoformados, infiltrado inflamatório linfo-histiocitário e deposição de cálcio no centro lipídico-necrótico, em quantidade variável de placa para placa e de indivíduo para indivíduo.

Os principais componentes da placa aterosclerótica são suas células, principalmente as células musculares lisas arteriais e os seus lipídios, a maioria extracelular. As proporções relativas desses dois componentes principais, assim como das proteínas fibrosas e dos produtos complexos de carboidratos das células musculares lisas, variam de placa para placa. Essas proporções também variam durante a sequência de desenvolvimento ou regressão de uma determinada placa. (LUZ; LAURINDO; CHAGAS, 2003).

A respeito da localização e distribuição das placas arterioscleróticas na árvore arterial humana, geralmente atingem a aorta abdominal, que é mais extensamente comprometida do que a aorta torácica, já as artérias coronárias apresentam um comprometimento aterosclerótico mais intenso nos seus 6cm iniciais, as lesões

aórticas tendem a ser mais proeminentes próximo aos óstios dos seus ramos principais (BRAUNWALD, 1987).

Como consequência da obstrução os efeitos clínicos das placas avançadas da maioria das artérias de tamanho médio, se devem às suas características de ocupação de espaço, que levam à estenose, ou às suas propriedades trombogênicas, que geralmente surgem relacionadas à fratura ou ruptura da cápsula fibrosa e à ulceração resultante da superfície da placa. Várias evidências sugerem que a peroxidação de componentes da lipoproteína de baixa densidade (LDL) é um evento relevante na gênese do ateroma. (CONTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996).

A aterogênese envolve uma série de etapas, tais como: 1- Ocorre disfunção endotelial com alteração na biossíntese de prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>, prostaciclina); 2- A lesão do endotélio disfuncional estimula a fixação dos monócitos. A turbulência pode ser responsável pela notável predileção das lesões por regiões de comprometimento do fluxo, como a origem dos vasos da aorta. Foi sugerido um possível papel da infecção crônica (por exemplo, por *Chlamydia*), embora isso seja controvertido. 3- As células endoteliais ligam-se à LDL. Quando ativadas (por lesão) essas células e os monócitos e macrófagos fixados produzem radicais livres que oxidam as LDL, resultando em peroxidação dos lipídeos e destruição do receptor necessário para a depuração normal da LDL mediada por receptores. 4- A LDL modificada por oxidação é captada por macrófagos através de “receptores de depuração”. 5- Após terem captado as LDL oxidadas, esses macrófagos (que, neste estágio, são conhecidos como células espumosas) migram para a região subendotelial. As coleções subendoteliais de células espumosas e de linfócitos T formam as estrias gordurosas que anunciam o ateroma. 6- As plaquetas, os macrófagos e as células endoteliais liberam citocinas e fatores de crescimento. Essas substâncias induzem a proliferação do músculo liso e a deposição de componentes do tecido conjuntivo. A resposta fibroproliferativa inflamatória resulta na formação de um denso revestimento fibroso de tecido conjuntivo que recobre um cerne de resíduos lipídicos e necróticos, sendo esta estrutura global descrita como “placa ateromatosa”. 7- A placa pode sofrer ruptura, formando substrato sobre o qual irá se desenvolver a trombose. O aspecto da placa que a tornam sujeita a ruptura

incluem a presença de grande número de macrófagos, enquanto o músculo liso vascular e as proteínas da matriz a estabilizam (RANG et al., 2004).

Embora qualquer artéria possa ser afetada, as principais artérias acometidas na doença são: aorta, as artérias coronárias e cerebrais tendo como principais consequências o infarto do miocárdio, a isquemia cerebral e o aneurisma da aorta (GOTTLIEB; BONARD; MORIGUCHI, 2005). Estudos sugerem duas fases interdependentes na evolução da aterosclerose: na primeira fase predomina uma formação anatômica de lesão aterosclerótica sob influência dos fatores de risco aterogênico e que leva décadas para evoluir. Devido a sua história insidiosa, sua evolução, comumente, não traz manifestação clínica severa. A segunda fase, conhecida como trombogênica, determina a formação aguda de trombo sobre a placa aterosclerótica e está envolvida nos eventos agudos coronários como infarto do miocárdio, angina instável e morte súbita, que é geralmente desencadeada por desestabilização da placa aterosclerótica com redução significativa e abrupta da luz do vaso devida à formação local do trombo (FUSTER, 1994).

#### **2.4 Modelo Experimental de Aterogênese em Coelhos**

Diversas espécies de animais são empregadas para a pesquisa biológica e médica experimental em laboratório, visando diferentes objetivos, particularmente nas áreas da fisiologia e farmacologia. Entre estas espécies incluem-se as seguintes mais comumente utilizadas: Coelho - gênero *Oryctolagus cuniculus*, pertencendo à ordem *Lagomorpha*. A variedade albina é de fácil criação, especialmente a raça Nova Zelândia, que pode chegar a ter 4 – 5 kg de peso corporal. Existem muitas raças, todas excelentes para estudos farmacológicos e imunológicos. É um bom modelo experimental para estudo da aterosclerose. Drogas podem ser administradas por via oral, por meio de sonda orofaríngea ou na água de beber, bem como por outras vias. Injeções intravenosas podem ser feitas com muita facilidade na veia marginal da orelha, pela qual também se pode colher facilmente amostras de sangue para diferentes análises (IHARA et al., 1998).

A primeira vez que aterosclerose foi induzida em coelhos alimentando-os com gema de ovo e colesterol puro teve resposta em algumas semanas de dieta: a aorta de 90% dos coelhos apresentou placas acinzentadas semelhantes às das coronárias

de homens vítimas de infarto do miocárdio. Posteriormente, o autor concluiu que o colesterol não era o único responsável pelos aparecimentos das placas ateroscleróticas, uma vez que repetiu os experimentos em ratos e cachorros e não obteve o mesmo resultado (ANITSCHKOW; CHALATOW, 1913).

A arteriosclerose também foi induzida com 0,5% e 1% de colesterol puro e verificou-se a quantidade de óxido nítrico na aorta de coelhos hipercolesterolêmicos (MINOR et al., 1990).

A respeito dos modelos experimentais para indução de aterosclerose em animais como ratos, suínos, cachorros e coelhos. Pesquisadores utilizam o colesterol puro diluídos em percentuais desde 0,5 % a 5% de colesterol ou incorporados a ração dos animais. Quando não são colocados na ração são utilizados veículos como: leite, gordura de coco, gordura de babaçu, gema de ovo, óleo de coco. (JORGE et al., 1997).

Segundo Martinello (2006) o coelho foi o primeiro modelo de animal usado na pesquisa da aterosclerose. Acrescenta ainda que esta espécie possui um metabolismo lipoprotéico muito semelhante ao de humanos, exceto por sua deficiência na lipase hepática. Devido à fácil absorção, os coelhos respondem muito bem à dieta altamente gordurosa ou colesterolêmica e desenvolvem lesões em curto período de tempo. No entanto, as lesões contêm mais gordura e macrófagos que as de humanos e os níveis plasmáticos de colesterol são extremamente altos, diferente dos humanos. Luz, Laurindo e Chagas, (2003) acrescentam que estudos experimentais demonstraram que, em animais submetidos a dieta hipercolesterolêmica, a reatividade vascular encontra-se diminuída em cerca de dez semanas após a instituição da dieta.

O modelo experimental em roedores é frequentemente usado para avaliar os efeitos hipolipemiantes de muitos compostos naturais e sintéticos, contudo, nem todas as espécies apresentam o metabolismo lipoprotéico comparável ao de humanos (MARTINELLO, 2006).

## 2.5 Lipoproteínas e Arteriosclerose

As lipoproteínas são partículas que transportam lipídios apolares (insolúveis em água) em seu núcleo. Estes complexos são constituídos por quantidades variáveis de colesterol e seus ésteres, triglicerídeos, fosfolipídios e apoproteínas, sendo solúveis no plasma devido à natureza hidrófila da parte protéica. Com base na densidade, as lipoproteínas plasmáticas são separadas em: quilomicrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL). Nas últimas décadas acumularam-se evidências relacionando os lipídios e lipoproteínas plasmáticas com a aterosclerose. No estudo das desordens lipoprotéicas são empregados os seguintes testes de rotina: Colesterol total, triglicerídeos, colesterol-HDL, Colesterol-LDL, lipídeos totais (LIMA, 1999).

Colesterol é o esteroide mais abundante nos tecidos humanos. Compõe as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e membranas celulares sendo também, substância precursora na síntese dos hormônios esteróides e ácidos biliares. O colesterol é derivado do ciclopentano peridrofenantreno com ligação dupla entre C-5 e C-6, hidroxila no carbono 3 (colesterol livre) e cadeia alifática de 8 carbonos no C-17. A ingestão de colesterol é, aproximadamente, 400 a 700 mg/d, enquanto a absorção situa-se ao redor de 300 mg/d. Somente 25% do colesterol plasmático é proveniente da dieta, o restante é sintetizado (1 g/d), fundamentalmente, pelo fígado, a partir do acetil CoA. Parte do colesterol hepático é transformada em ácidos biliares excretados pela bile. Por outro lado, os sais de ácidos biliares formam complexos com o colesterol promovendo maior excreção deste composto. O colesterol plasmático ocorre tanto na forma livre (30% do total) como esterificado (70% do total). Na forma esterificada, diferentes ácidos graxos (provenientes da lecitina) estão unidos ao C-3. O colesterol plasmático é afetado tanto por fatores intraindividuais como interindividuais. As medidas da colesterolemia são influenciadas por: dieta, exercícios físicos, idade, sexo, raça e defeitos genéticos (TSIRPANLIS, 2005).

Um dos primeiros eventos na patogenia da aterosclerose é o acúmulo de LDL (lipoproteína de baixa densidade) na camada íntima. Esta proteína fica retida neste local por se ligar a certos proteoglicanos da matriz extracelular. Por estar afastada

dos antioxidantes plasmáticos, torna-se propensa a sofrer reações de oxidação, tanto da sua porção lipídica como a sua porção protéica. As partículas de LDL oxidado podem aumentar a expressão de moléculas de adesão leucocitária na superfície das células endoteliais, como VCAM-1, o ICAM-1 e a P-selectina. Além disso, possuem propriedades quimiotáticas e estimulam o endotélio a secretar citocinas, como a IL-1(interleucina 1) e o TNF-alfa. Estes fenômenos estão relacionados com o acúmulo lipídico na camada íntima com recrutamento de leucócitos que é um processo fundamental da patogênese da aterosclerose. A adesão de leucócitos ao endotélio também é influenciada por fatores hemodinâmicos. O fluxo laminar de sangue é capaz de suprimir (talvez pelo aumento da produção endotelial de óxido nítrico) a expressão das moléculas de adesão, enquanto que o fluxo turbulento não tem essa capacidade. Isto justifica por que as placas de ateroma predominam em regiões de bifurcação arterial (FRUEBIS et al., 1999; RODRIGUES et al., 2003).

Já os níveis plasmáticos elevados da fração HDL colesterol (lipoproteína de alta densidade) está associada a resposta vasodilatadora dependente do endotélio normal à acetilcolina. A HDL tem sido implicada em diversas vias de sinalização das células endoteliais, como proliferação, apoptose, síntese de prostaglandinas e de NO (óxido nítrico), são reguladas pelo cálcio intracelular. A fração HDL pode promover aumento ou diminuição do cálcio intracelular e modular a função da célula endotelial. Os efeitos conhecidos da HDL nas células endoteliais incluem: aumento da síntese de NO e de prostaglandinas, redução da síntese de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1 e E-seletina), tramboxano A2 e de PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*); inibição da apoptose; estimulação da proliferação e migração celular; redução da captação da LDL e da ativação do fator NFκB e finalmente aumento do fluxo de colesterol do meio intracelular. Todos estes mecanismos podem estar envolvidos na melhora da função endotelial (LUZ; FAVARATO, 1999; LUZ; LAURINDO; CHAGAS, 2003).

A lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) é um tipo de lipoproteína produzida pelo fígado. VLDL é um dos cinco grupos principais de lipoproteínas (quilomícrons, VLDL, lipoproteína de baixa densidade, lipoproteína de muito baixa densidade, lipoproteína de alta densidade), que permitem gorduras e colesterol para

mover dentro da solução à base de água da corrente sanguínea. VLDL é montado no fígado a partir de triglicérides, colesterol e apolipoproteínas. VLDL é convertido na corrente sanguínea para lipoproteína de baixa densidade (LDL). Partículas de VLDL têm um diâmetro de 30-80nm. VLDL transporta produtos endógenos, enquanto quilomícrons transporte exógenas (dieta) produtos. VLDL transporta triglicérides endógenos, fosfolipídios, colesterol e ésteres de colesterol. Ele funciona como mecanismo de transporte do organismo interno para lipídios(CHAGAS; CARNIETO JUNIOR, 2002).

Triglicérides são ésteres do glicerol, provenientes da dieta, sendo fragmentados e depois ressintetizados nas células epiteliais do intestino, combinados com o colesterol e as apolipoproteínas para formar quilomícrons que são transportados pelo canal linfático torácico para a circulação geral. Acredita-se que os triglicéridos em excesso (acima de 400mg/dl) são aterogênicos por sua frequente associação com: 1) diminuição de HDL; 2) aumento de LDL; 3) doenças como diabetes e hipotireoidismo e 4) aceleração da trombogênese (LUZ; LAURINDO; CHAGAS, 2003).

Lipídeos totais são dosados no soro e compreendem várias frações: colesterol, triglicéridos, fosfolipídios e ácidos graxos. Colesterol total: compreende todo o colesterol encontrado nas várias lipoproteínas, sendo 60 a 70% transportado pelo LDL, 20 a 35% pela HDL e 5 a 12% pela VLDL (LIMA, 1999).

## **2.6 Tratamentos da Aterosclerose e o Antioxidante Leucoantocianidina de Uva**

O tratamento da arteriosclerose se dá através de fármacos anti-hiperlipidêmicos e têm como alvo o problema dos lipídios séricos elevados com intervenções complementares, alguns destes agentes diminuem a produção dos carreadores lipoprotéicos de colesterol e triacil-glicerol, enquanto outros aumentam a degradação de lipoproteínas. Outros, ainda, aumentam diretamente a remoção de colesterol do organismo. Estes fármacos podem ser usados isoladamente ou em combinações, mas estão sempre acompanhados da necessidade de dieta significativamente pobre em lipídios, especialmente o colesterol e gorduras

saturadas, e o conteúdo calórico da dieta deve ser acompanhado rigorosamente (HARVEY; CHAMPE, 1997).

As principais classes de substâncias utilizadas clinicamente são: as estatinas inibidoras HMG-CoA redutase (sinvastatina, lovastatina, pravastatina e atorvastatina), fibratos (bezafibrato, ciprofibrato, genfibrozila, fenofibrato e clofibrato), resinas de ligação de ácidos biliares (colestiramina e colestipol), ácido nicotínico, probucol e óleo de peixe ômega 3 (RANG et al., 2004);

Um grupo farmacológico amplamente utilizado para o tratamento da hipercolesterolemia, são as estatinas substâncias que atuam inibindo a HMG-CoA redutase, enzima que limita a velocidade na síntese do colesterol. Este grupo farmacológico é eficaz no tratamento da hipercolesterolemia e possui uma excelente tolerabilidade na população de dislipidêmicos (HARVEY; CHAMPE, 1997; RANG et al., 2004; SILVA, 2010).

Jorge et al. (2005) realizaram um experimento sobre o efeito das estatinas atorvastatina, fluvastatina, pravastatina e sinvastatina sobre a função endotelial, a peroxidação lipídica e na arteriosclerose aórtica em coelhos hipercolesterolêmicos utilizando 0,5 de colesterol na dieta durante 45 dias, e concluíram que todas as estatinas tiveram efeito significativo e similar em reduzir a peroxidação lipídica nas LDL e na parede arterial, na regressão da aterosclerose aórtica e na reversão da disfunção endotelial, na redução do colesterol total plasmático, no teor de malonodialdeído na parede arterial.

Outros fitoterápicos são utilizados para diminuir o colesterol e que conseqüentemente podem prevenir surgimento da aterosclerose como: *Vitis vinifera*. O *Vittis*® tem como nome científico *Vitis vinifera* e contém em cada cápsula a leucoantocianidina. Este composto funciona inibindo a peroxidação lipídica, uma das causas da aterosclerose, protegendo as células contra a ação dos radicais livres, fortalecendo as paredes dos capilares sanguíneos e mantendo o fluxo sanguíneo normal. Atua como antioxidante, sendo indicado para a proteção das células contra os radicais livres, auxiliando no tratamento de dislipidemias, principalmente hipercolesterolemia, prevenindo a aterosclerose e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002).

O gênero *Vitis* é o principal representante desta família, devido à importância econômica da uva *Vitis vinifera*, largamente consumida naturalmente ou empregada como matéria prima para fabricação de sucos, vinhos, uvas passas, geléias, etc. O nome *Vitis* designava as gavinhas que se recurvam e se agarram ao suporte, passando a designar a videira. Cientificamente a parreira ou videira e *Vitis vinifera* cuja fruta conhecida como uva (SCHLEIER, 2004).

A *Vitis vinifera* é um antioxidante natural extraído das sementes de uva, seus componentes ativos constituem flavonóides e proantocianidinas, leucoantocianidinas que além de atuarem como sequestradores de radicais livres, promovem a vasodilatação, inibem enzimas como fosfolipase, ciclooxigenase e lipoxigenase, além de reduzir a peroxidação lipídica, reduzindo assim o colesterol (MARTIM et al., 2007).

Os compostos fenólicos agem como antioxidantes não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também por causa de seus radicais intermediários estáveis que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento particularmente de ácidos graxos e de óleos. Os subprodutos do suco da uva e da produção de vinho também são fontes de várias combinações de fenólicos que desperta muito interesse devido a suas propriedades antioxidantes e seus efeitos benéficos para a saúde humana. As sementes e a casca da uva contém flavonóides (catequina, epicatequina, proantocianidinas e leucoantocianidinas), ácidos fenólicos e resveratrol, que mostraram ter atividades funcionais. O extrato de proantocianidinas da semente da uva apresentou atividade antioxidante *in vivo* e poderia ser tão importante quanto à vitamina E em impedir os danos oxidativos nos tecidos, reduzindo a oxidação lipídica e/ou inibir a produção de radicais livres (SCHLEIER, 2004).

Estudos epidemiológicos têm associado o consumo de flavonóides com menor mortalidade por doença arterial coronariana. Na população estudada, a principal fonte de flavonóides foram cebola e maçã, flavonóide quercetina é o mais abundante. Pesquisas têm atribuído um papel-chave ao consumo moderado de vinho na dieta dos franceses, por seu alto teor de polifenóis. Estes podem proteger o LDL da oxidação e, portanto, o início do processo de arteriosclerose (LEIGHTON et al., 1997).

Leighton et al. (1997) acrescenta que existe uma associação inversa entre o risco de doença cardíaca e consumo moderado de álcool, especialmente vinho, é bem estabelecida através de numerosos estudos epidemiológicos, que em geral, indivíduos apreciadores de vinho possuem uma diminuição do risco de doença coronariana (principalmente da aterosclerose) de mortalidade de cerca de 30% a 40%.

Os flavonóides exercem efeitos bioquímicos numerosos, aparentemente benéficos, atuando como antioxidante. Nas atividades *in vitro* anti-inflamatórios, anti-trombótica, antimicrobiana e antineoplásica. No entanto, a extrapolação dos resultados *in vitro* com o que acontece em um organismo vivo, só é possível quando você sabe que a biodisponibilidade do princípio ativo, ou seja, quando é conhecido por ser estável no trato gastrintestinal, que é absorvido e alcança níveis significativos em circulação. A biodisponibilidade de polifenóis são poucos e ainda não permitem conclusões definitivas (MARTIM et al., 2007).

Dornas et al. (2010) descreve que as flavanas, leucoantocianidinas e proantocianidinas são flavonoides com eficácia comprovada na eliminação de radicais livres e inibidor de danos oxidativos. Os isoflavonóides apresentam uma variação estrutural não somente entre o número e complexidade dos substituintes, mas também nos níveis de oxidação do anel.

Já Chagas e Carnieto Júnior (2002) verificou o efeito toxicológico de antocianina em coelhos nova Zelândia em três doses: 50mg, 100mg e 150mg de antocianinas de uva e de repolho roxo, via oral por 30 dias. Neste experimento pode-se concluir que a antocianina de repolho roxo e uva roxa apresentam efeito hipolipidêmico sobre o colesterol total, aumento do HDL, e hipotrigliceridêmico. Não apresentaram efeitos tóxicos no metabolismo dos: carboidratos, proteínas, lipídeos, minerais, não havendo alterações tóxicas no tecido hepático.

Dornas et al. (2010) descrevem que em média nos E.U.A. a dieta diária foi estimada para conter aproximadamente 1g de flavonóide mistos, expressos como glicosídeos. No entanto, de acordo com Hertog et al. (1993) a média de ingestão de flavonóides mistos é de 23mg/dia.

Yi et al. (2010) testaram 20 antocianinas e estas mostraram efeito inibitório sobre o aumento de LDL-oxidado, produção e redução de óxido nítrico liberação de vários graus . Já Martim et al. (2007) verificou o efeito antioxidante do *Vitis vinifera* (extrato 3mg/Kg por 5 dias) em ratos wistar e confirmaram a proteção antioxidante através da redução da peroxidação lipídica.

Damasceno et al. (2007) em experimento em coelhos Nova Zelândia usando 7,3mg/Kg/dia de isoflovonas de soja, mostraram efeitos hipolipemiantes e diminuição da pró-inflamação e a subfração LDL no plasma sanguíneo Já Xia et al.(2006) em estudo realizado utilizando o extrato de arroz preto, suplementado com antocianina 300 mg/Kg/dia obteve sucesso na redução da hiperlipidemia.

Atualmente, verificou-se em vários estudos com diferentes concentrações de fitofármacos, Reagan-Shaw; Nihal; Ahmad (2007) descrevem que quando novos medicamentos são desenvolvidos, é essencial traduzir adequadamente a dosagem da droga, tanto para humanos como para animais. A necessidade de tradução adequada é evidente, já que em estudos recentes onde testaram o resveratrol um composto encontrado nas uvas e vinho tinto, melhora o tempo de vida e saúde de camundongos.

Para Silva (2006) estabelecer uma dose ideal pode ajudar os cientistas da área de nutrição a contribuir mais efetivamente para conhecer os efeitos farmacodinâmicos das substâncias e levar a uma melhor compreensão da existência de uma quantidade ideal para o consumo de flavonóides.



### **3.1 Objetivo Geral**

Analisar o efeito da leucoantocianidina de uva na morfologia da camada subendotelial em um modelo experimental de aterosclerose induzida em coelhos machos, albinos da raça Nova Zelândia, nas regiões do arco aórtico, artéria carótida comum direita e artéria femoral direita, bem como observar o perfil bioquímico sérico de lipoproteínas no sangue.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Reproduzir o modelo de indução de aterosclerose em coelhos albinos Nova Zelândia.
- Verificar os efeitos da leucoantocianidina de uva sobre o: colesterol total, LDL, HDL, VLDL, lipídios totais, triglicerídeos.
- Quantificar os efeitos da leucoantocianidina de uva sobre a camada subendotelial arterial utilizando o Programa IMAGE-PRO PLUS 4.5.



#### 4.1 Amostra

Foram utilizados 27 coelhos albinos raça Nova Zelândia adultos, machos. Os animais foram desmamados após 40 dias, sendo nessa época admitidos ao experimento com peso que variou entre 1,5Kg e 1,6Kg, alimentados com ração Socil® e água *ad libitum*. Quando os animais atingiram entre 7 e 8 meses iniciou-se o experimento, apesar de serem criados nas mesmas condições e local, em gaiolas individuais, pesavam entre 2500 e 4100 g. Estes coelhos ficaram em um biotério do Centro de Estudos Superiores de Maceió – CESMAC, sendo aprovado pelo Comitê de Ética desta instituição (anexo 1). Os animais ficaram a temperatura e luz natural onde foram acompanhados por médicos veterinários antes e durante o experimento.

O tamanho da amostra foi definido baseado na maioria dos protocolos internacionais que utilizam esse modelo experimental, sendo estes realizados frequentemente com cinco ou sete animais.

Se aplicarmos o cálculo do tamanho da amostra, quanto maior o valor de  $p$  ( $1 - p$ ) maior será o tamanho da amostra. Não dispondo de qualquer informação sobre o valor de  $p$ , usa-se  $p = 0,05$  e assim trabalhando-se com uma amostra de tamanho grande, há maior segurança nos resultados encontrados. Dessa forma foi utilizado  $p = 0,05$ , ou seja, intervalo de confiança de 95% para população infinita seguindo a fórmula:  $n = z^2 [ p ( 1 - p ) / e^2 ]$ . O valor de  $p$  ( $1 - p$ ) = 0,25 quando  $p$  vale 0,05 e para o valor de  $z$  Foi consultada a tabela para área de 47,5% = 0,475, obtendo valor de  $z = 1,96$  desvios padrões. Admitindo o erro padronizado a 0,37 foi achado o número de animais para nível de significância de resultado:  $n = 1,96^2 [0,5(0,5) / 0,37^2] \leftrightarrow n \approx 7$ . (SCHMIDT, 2007).

#### 4.2 Randomização da Amostra

Os animais foram enumerados de 1 a 27 e num saquítel foram colocados papéis enumerados de 1 a 27. Foi solicitado a uma pessoa não participante do experimento a puxar do saquítel cada número. Conforme os números sorteados, os animais foram alocados em 3 grupos, sendo denominados de G1 com 7 animais, G2 e G3 com 10 animais cada grupo, sendo um coelho por gaiola. Os coelhos foram pesados com uma balança digital de precisão Marte®, modelo AS 5000 C com carga

máxima de 5 kg e mínima 5 g. Para evitar a mistura de animais durante as manipulações, cada animal recebeu um número na face interna da orelha esquerda, com pincel atômico de cor preta (Figura 1). A descrição dos grupos randomizados é descrita a seguir.

**Figura 1 – Coelho identificado na face interna auricular - coelho 4V grupo G3 – (Ração, 10mL de Gema e 1,5g de Colesterol + leucoantocianidina de uva)**



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

- a) O grupo G1 (grupo controle) foi alimentado com 200g da ração Socil® que tem a composição básica necessária ao animal: proteína bruta (15%), extrato etéreo (2,5%), matéria fibrosa (16%), matéria mineral (10%), cálcio (2,5%), fósforo (0,42%), umidade (13%), carboidrato (31,58%). Como os coelhos são roedores, quando a ração não tinha mais a forma de peletas, era desprezada e substituída por nova.
- b) O grupo G2 foi alimentado com 200g da mesma ração do grupo controle, juntamente com 10mL de gema de ovo Carnaúba® grande 1,5g de colesterol puro (Impretraco®). A gema de ovo, além de ser uma fonte de colesterol e outros lipídeos, também foi utilizada como veículo para administração do colesterol que foi dissolvido e injetado por sonda orofaríngea.

- c) O grupo G3 foi alimentado nas mesmas condições do grupo G2, diferenciando apenas na administração do antioxidante (leucoantocianidina de uva 50mg/Kg) conforme Segura; Marin; Delgado (2003).

A administração de colesterol e/ou gema bem como da leucoantocianidina de uva nos animais dos grupos 2 e 3, foi realizada com sondagem orofaríngea, através de sonda de nelaton número 18 conectada a uma seringa descartável de 10mL. A leucoantocianidina de uva, foi administrada 2h antes da complementação alimentar (dieta aterogênica), diluída em 3mL de água destilada. A dieta complementar foi preparada diariamente, durante 100 dias.

Para todos os grupos, foi oferecida diariamente, 200 gramas de ração e água *ad libitum*, havendo sobra, a dieta era novamente complementada até 200 g.

#### **4.3 Preparo e Administração da Dieta Aterogênica**

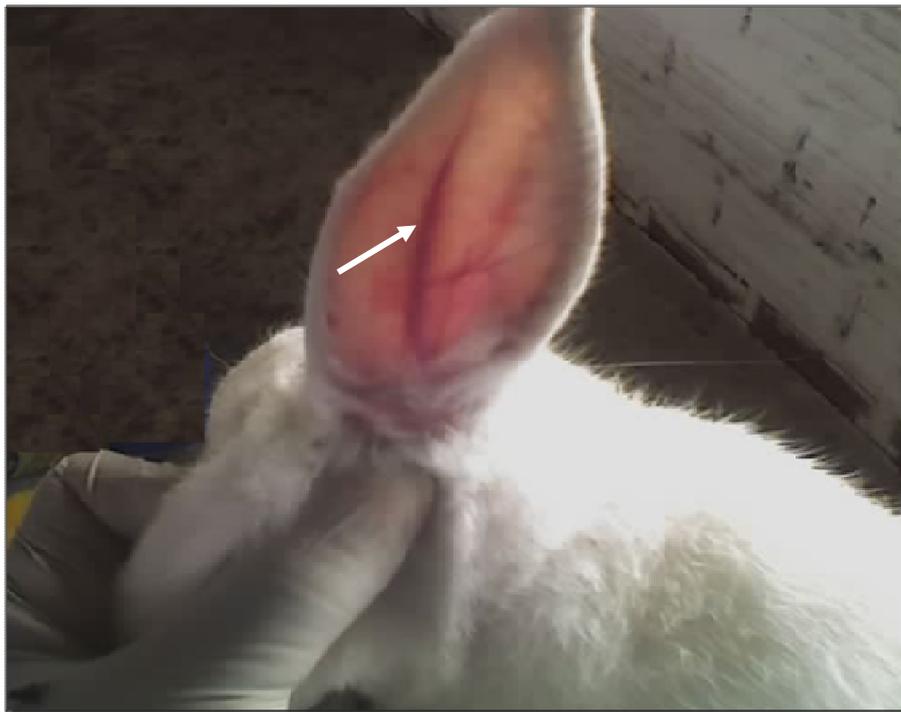
O preparo da dieta foi diário para evitar contaminação dos animais ou do alimento. Antes da sondagem orofaríngea, o ovo foi lavado com hipoclorito de sódio diluído em água e deixando-os durante 5min imersos nessa solução. A retirada da gema foi realizada com a ajuda de uma colher em seguida foi separada a gema da clara em um recipiente plástico. Utilizando uma seringa de 20mL retirou-se 10mL de gema que foi colocado em um recipiente onde continha 1,5g de colesterol previamente pesado. O colesterol foi misturado à gema com o auxílio de um bastão de vidro. A administração foi realizada utilizando uma seringa de 20mL que foi acoplada a uma sonda que foi introduzida até a orofaringe. O animal foi mantido em posição inclinada (com a cavidade bucal e patas para cima) por tempo de 3 minutos para garantir a ingestão da dieta. O colesterol (Impretraco®) foi adquirido exclusivamente para o experimento.

A leucoantocianidina de uva foi diluída em 3mL de água destilada e injetada com a utilização de uma seringa de 10mL acoplada a uma sonda de nelaton número 18 e repetindo o procedimento semelhante ao do colesterol e a gema 2h depois no grupo G3.

#### 4.4 Dosagem Bioquímica

Foi realizada análise bioquímica do sangue após jejum de 12 a 14 horas em todos os coelhos, para verificação de suas taxas de colesterol Total, HDL, VLDL, LDL, lipídeos totais, bem como de triglicérides. O procedimento foi realizado 4 vezes (Início do experimento, dias 33, 66 e 99) em todos os animais. O sangue foi coletado na artéria auricular central (Figura 2), com seringa de 10 mL e armazenado para análise em tubos de ensaio de 5 mL sem anticoagulante. Ao fim da coleta amostras eram encaminhadas ao laboratório do CESMAC (Centro de Estudos Superiores de Maceió) onde foram centrifugadas e seguiu o procedimento operacional padrão para análise do colesterol total e frações.

**Figura 2 – Artéria auricular esquerda central (No coelho grupo 1 - Seta).**



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

#### 4.5 Eutanásia e Histologia

Ao término do experimento os coelhos foram submetidos à eutanásia (100º dia). Para tanto, foi realizada inicialmente anestesia geral (Xilazina a 2% - Rompum® – e Quetamina a 5% - Ketalar®), via intramuscular. Com o animal profundamente anestesiado, foi aplicado lentamente 10mL de cloreto de potássio 19,1%, via

endovenosa, monitorando o animal até o óbito, sendo que todo este procedimento sempre foi acompanhado pelo veterinário responsável, respeitando a recomendação do Conselho Federal de Medicina Veterinária, Resolução nº 714 art. 13, de 20 de junho de 2002.

Cada animal foi submetido a procedimento para a retirada de fragmento das artérias carótidas comuns (direita e esquerda) próximo de sua bifurcação, do arco aórtico e as artérias femorais (direita e esquerda); para isto foi realizada a incisão mediana cervicotoracoabdominal e na face medial de cada coxa e cada animal foi dissecado por planos até expor os vasos para a retirada dos fragmentos que foram limpos e fixados com formaldeído a 10%. Os vasos retirados foram submetidos à rotina histológica para microscopia de luz e coradas com Tricrômico de Masson.

#### **4.6 Análise Estatística**

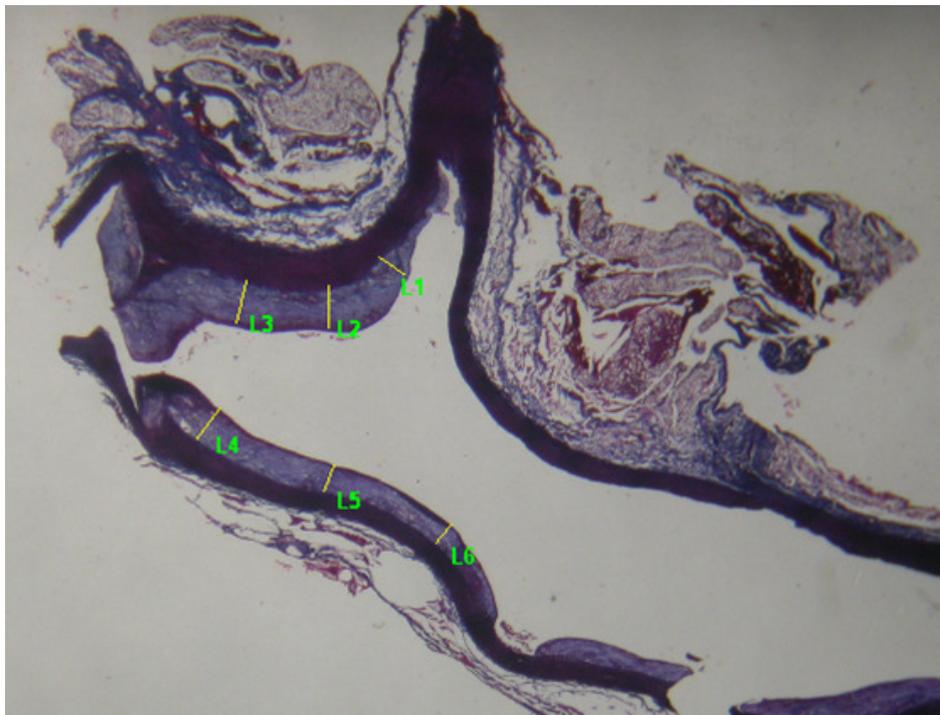
Os resultados foram analisados através da estatística descritiva usando como ferramenta software GraphPad Prism (versão 5.0). Os dados desta análise foram expressos em média e desvio padrão. Primeiramente foi feito o teste de normalidade em cada grupo (G1, G2 e G3), para verificar se os dados seguem ou não a distribuição normal. Para comparações entre os grupos (G1, G2 e G3) foi usado o ANOVA one-way e o pós-teste de TUKEY para os dados que seguem a distribuição normal. Para os resultados que não seguem a distribuição normal foi utilizado o teste de KRUSKAL-WALLIS e o pós-teste DUNNS. Para saber se existiam ou não diferenças significantes entre as médias, foi adotado o nível significância de 0,05.

#### **4.7 Mensuração das Artérias**

Após a preparação das lâminas histológicas do arco da aorta, a.a. carótidas comuns (direita e esquerda), artérias femorais (direita e esquerda), estas foram fotografadas com ajuda de um estereoscópio acoplado a uma câmera fotográfica digital. Todas as lâminas histológicas foram fotografadas e devidamente identificadas e em seguida estas imagens foram trabalhadas no Programa IMAGE-PRO PLUS 4.5. Antes de capturar as imagens foi necessário calibrar o programa utilizando uma régua de calibração (lâmina micrométrica). Após a calibração, mensuramos todas as lâminas, sendo que artérias carótidas e femorais não

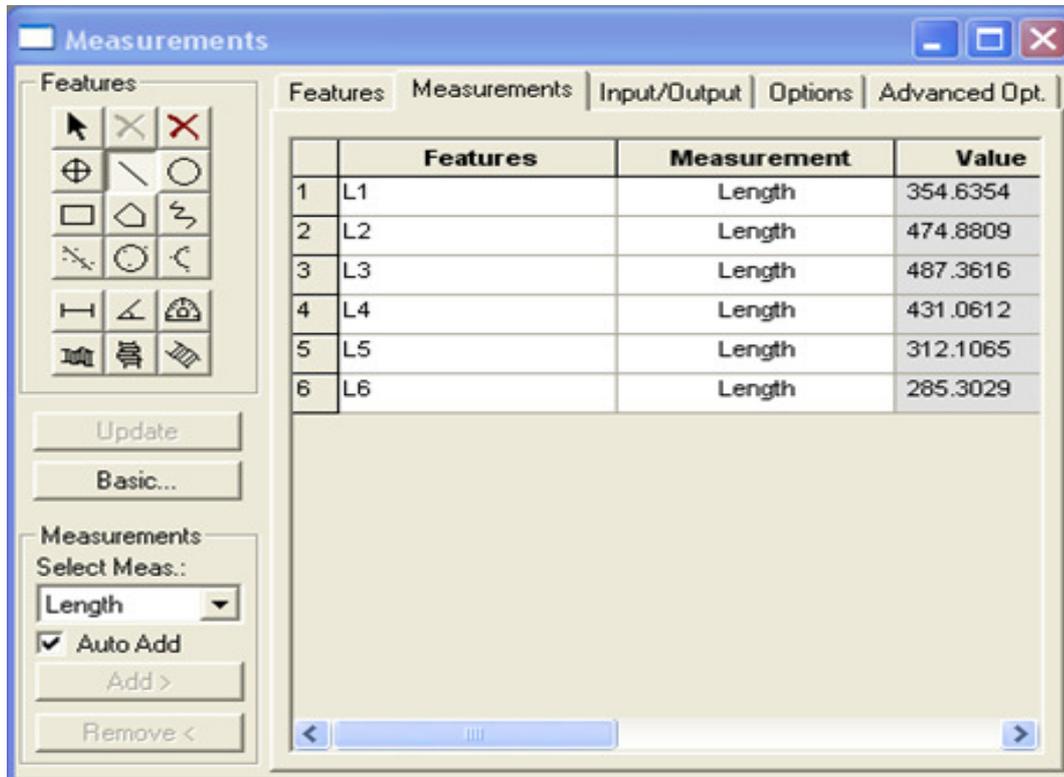
encontramos diferenças significantes, sendo assim, realizamos a mensuração do arco da aórtico utilizando 6 campos diferentes de cada lâmina preparada e depois os resultados foram transferidos para uma planilha no Excel e convertidos de milímetros para micrômetros. Os maiores espessamentos da camada subendotelial foram utilizados para os cálculos estatísticos, já que este confere um maior risco no que diz respeito à oclusão arterial, como podemos verificar nas Figuras 3 e 4 abaixo.

**Figura 3 – Aspecto histológico corado com tricrômio de masson do arco aórtico (corte longitudinal) ao estereocópico identificando os 6 pontos de mensuração no Programa IMAGE-PRO PLUS 4.5.**



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

**Figura 4 – Mensuração e identificação dos valores em milímetros dos espessamentos da camada subendotelial do arco aórtico no Programa IMAGE-PRO PLUS 4.5.**



Fonte: Programa Image-Pro Plus 4.5.

Nesse experimento, observou-se que 100% dos animais do G2 desenvolveram doença arteriosclerótica quando alimentado com 1,5g de colesterol misturados a 10mL de gema de ovo. Contudo, a média do espessamento endotelial após 100 dias, dos animais do grupo leucoantocianidina de uva foi menor 4,35 % comparado grupo com 10mL de gema e 1,5g de colesterol. Os resultados detalhados são apresentados a seguir.



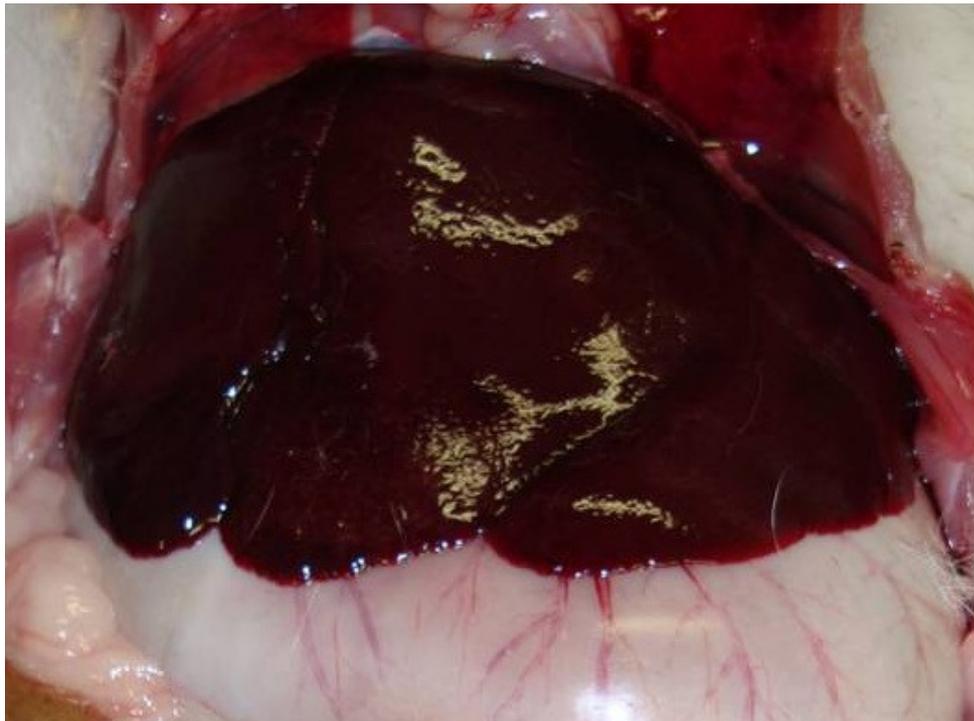
## 5.1 Adaptação à Dieta

Para melhor análise dos efeitos da leucoantocianidina de uva serão apresentados inicialmente os resultados da adaptação a dieta, alterações hepáticas de todos os grupos, pele (xantomias), segmentos arteriais retirados, os resultados hematológicos e sobre o peso dos animais, bem como das mensurações arteriais.

O comportamento dos grupos em relação à dieta desenvolveu-se da seguinte forma:

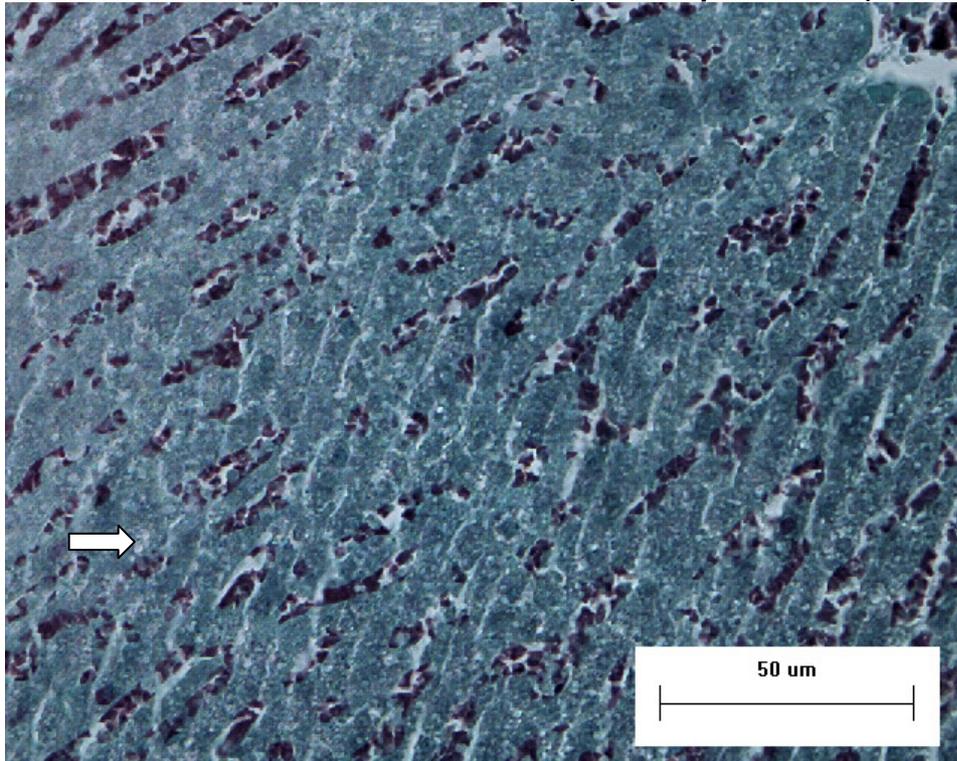
G1 (controle – ração) - Foi ofertado diariamente 200 g de ração Socil®. Não foram encontradas alterações hepáticas e nem espessamento da camada subendotelial nos animais deste grupo, conforme Figuras 5, 6 e 7 a seguir.

**Figura 5 – Fígado normal (ausência de esteatose) (G1 – Grupo Controle).**



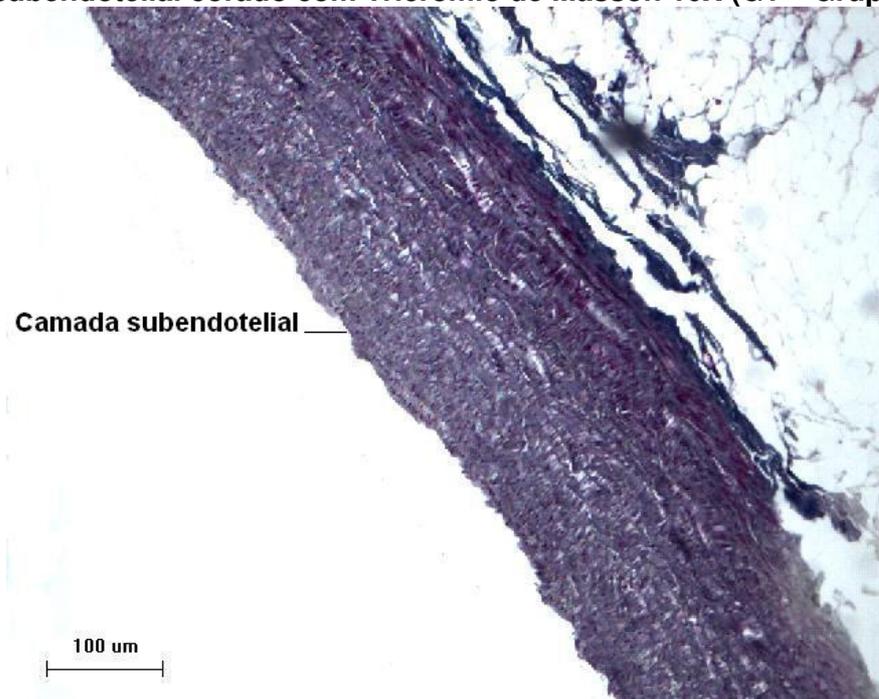
Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

**Figura 6 – Fotomicrografia do fígado normal ausência de esteatose, hepatócito (seta) corado com Tricrômio de Gomori 40X (G1 – Grupo Controle).**



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

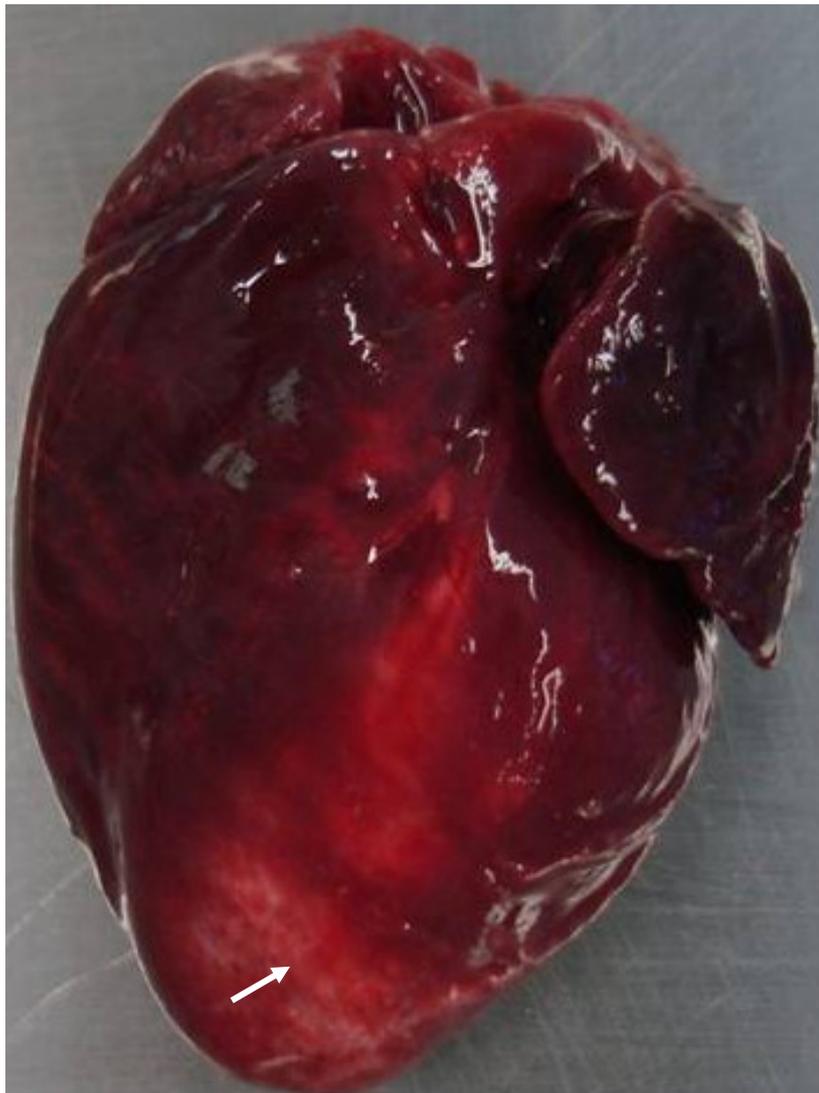
**Figura 7 – Fotomicrografia do arco da aorta ausência de espessamento da camada subendotelial corado com Tricrômio de Masson 10X (G1 – Grupo Controle).**



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

G2 (Ração, colesterol 1,5g e 10mL de gema de ovo) - Adaptaram-se bem à dieta administrada, iniciamos o experimento com 10 animais neste grupo, contudo, ocorreram com 3 óbitos. Nestes 3 óbitos, os animais apresentaram sinais de acidente vascular encefálico, infarto do miocárdio e esteatose hepática nos dias 45º, 60º e 92º respectivamente, como podemos observar nas Figuras 8, 9 e 10 a seguir.

**Figura 8 – Observa-se área infartada (seta) próximo ao ápice do coração.  
(grupo G2 – 1,5g de colesterol e 10mL de gema).**



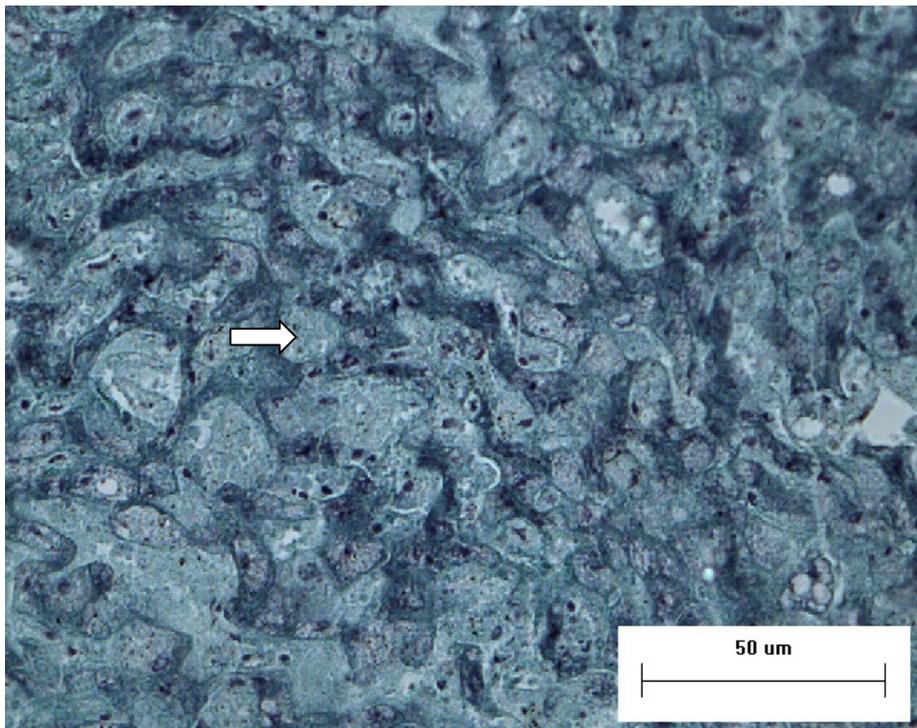
Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

**Figura 9 – Fígado com esteatose hepática (G2 – Grupo Ração, 1,5g de colesterol e 10mL de gema de ovo)**



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

**Figura 10 – Fotomicrografia do fígado com esteatose hepática macrovesicular, hepatócito aumentado (seta) corado com Tricrômio de Gomori 40X(G2 – Ração,1,5g de colesterol e 10mL de gema)**



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

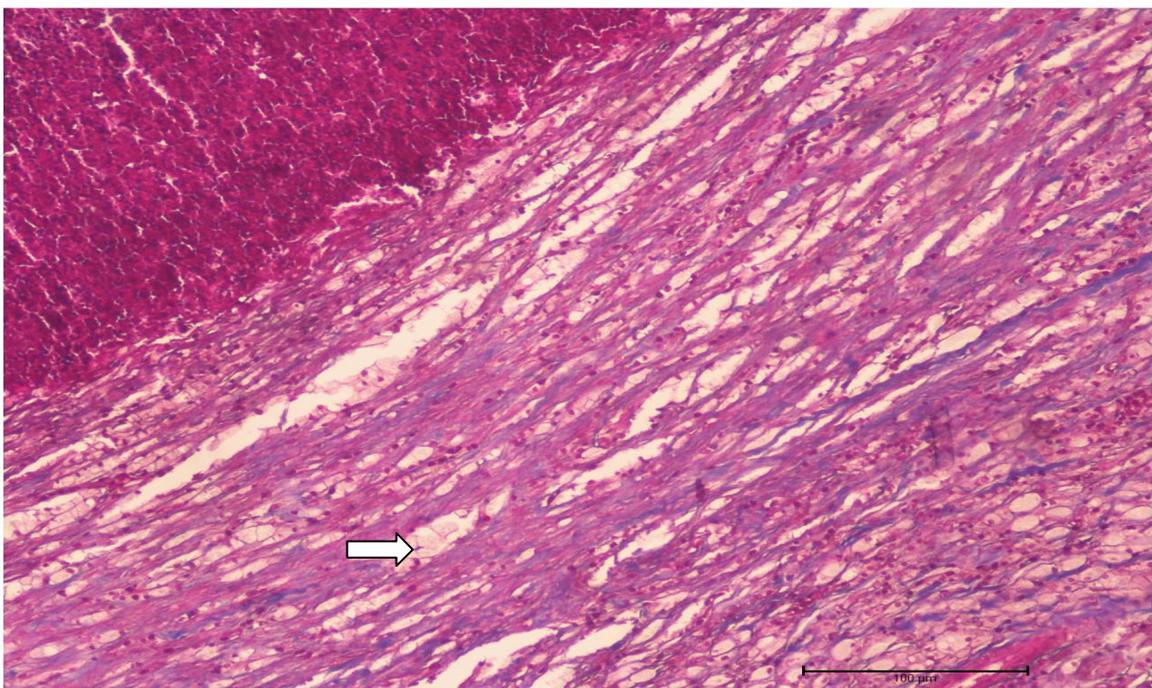
Na análise necroscópica foi observada esteatose hepática (com a presença de macrovilosidades e microvilosidades) nos 3 animais, bem como nos outros 7 animais submetidos à eutanásia. Em todos os animais deste grupo apresentaram acúmulo de gordura subcutânea denominada de xantoma, com comprimentos superiores a 2 cm , como podemos verificar nas Figuras 11 e 12 a seguir.

**Figura 11 – Acúmulo de gordura subcutânea na face interna da pata direita xantoma seta (Grupo G2 – Ração,1,5g de colesterol e 10mL de gema)**



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

**Figura 12 – Fotomicrografia do xantoma corado com hematoxilina e eosina 10X, macrófagos espumosos e acúmulo de lipídeos na derme (seta) (Grupo G2 – Ração,1,5g de colesterol e 10mL de gema)**



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

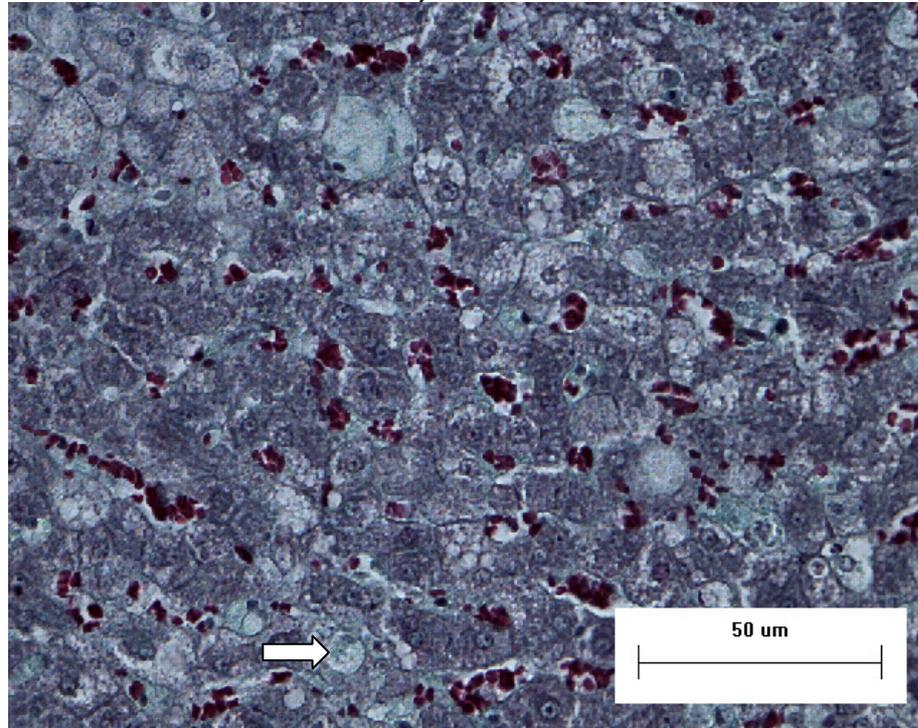
G3 (Ração, colesterol 1,5g, 10mL de gema de ovo e 50mg/Kg de leucoantocianidina de uva) - se adaptaram bem à dieta e iniciamos o experimento com 10 animais, sendo que também ocorreram 3 óbitos neste grupo. Sendo os 3 óbitos nos dias 72º, 86º e 95º, os animais apresentaram sinais de acidente vascular encefálico. Na análise necroscópica foi observada esteatose hepática moderada (com microvilosidades), bem como nos outros 7 animais do grupo. Nestes grupos, as fezes apresentaram tonalidade escura. Em alguns os animais deste grupo apresentaram acúmulo de gordura subcutânea denominada de xantoma, com comprimentos inferiores a 2cm, como podemos verificar nas Figuras 13 e 14, abaixo:

**Figura 13 – Fígado com esteatose hepática (Grupo G3 – Ração, 1,5g de colesterol, 10mL de gema de ovo e leucoantocianidina de uva).**



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

**Figura 14 – Fotomicrografia do fígado com esteatose hepática microvesicular hepatócito moderadamente aumentado (seta) corado com Tricrômio de Gomori 40X (Grupo G3 – Ração, 1,5g de colesterol, 10mL de gema e leucoantocianidina de uva).**



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

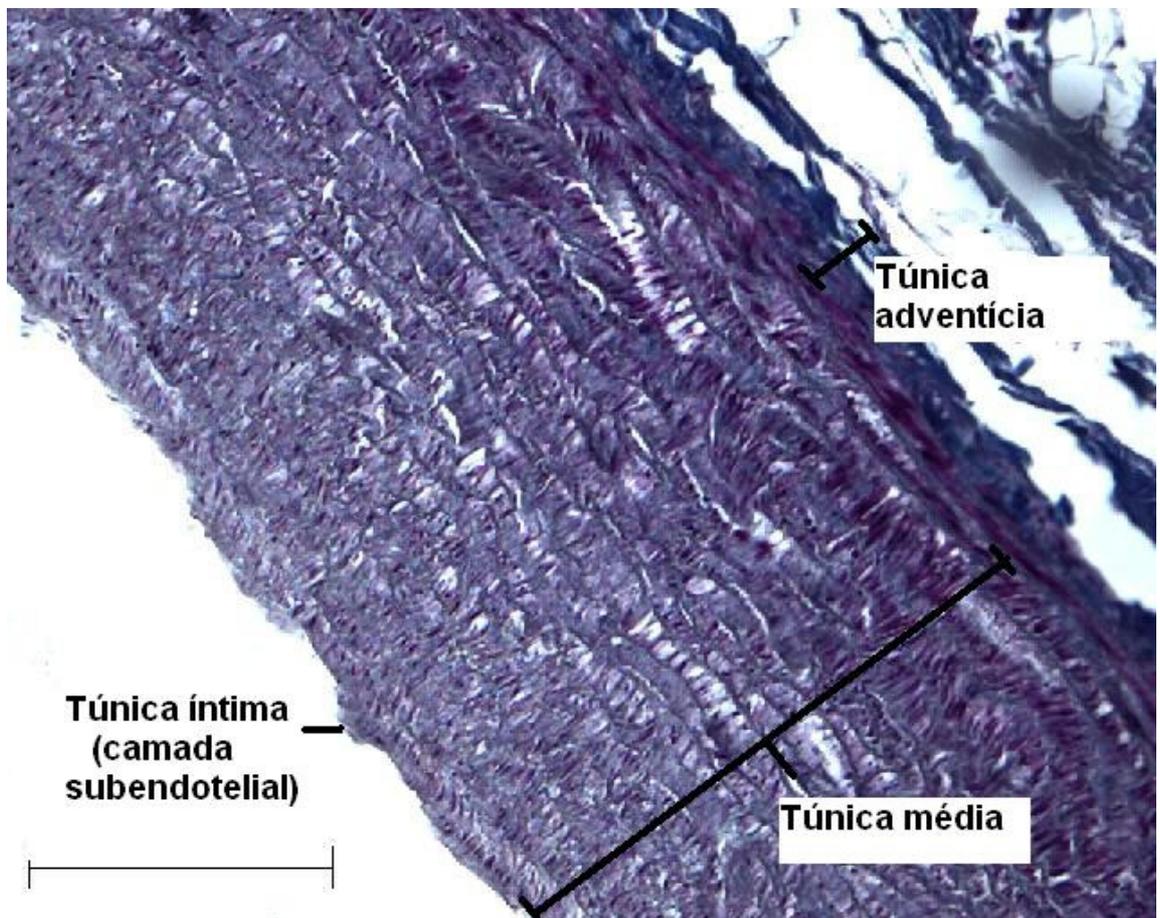
## 5.2 Análise Histológica

Para esta análise, foram retiradas as artérias carótida comum direita na sua bifurcação, segmento proximal da artéria femoral direita e arco aórtico. Os resultados dos grupos seguem descritos abaixo:

Nas artérias carótidas e femorais (direitas) não foram observadas alterações em todos os grupos, sendo assim, seguem os resultados do arco aórtico.

G1 (controle – Ração) - Não foram observadas alterações histológicas nos vasos analisados (Figura 15).

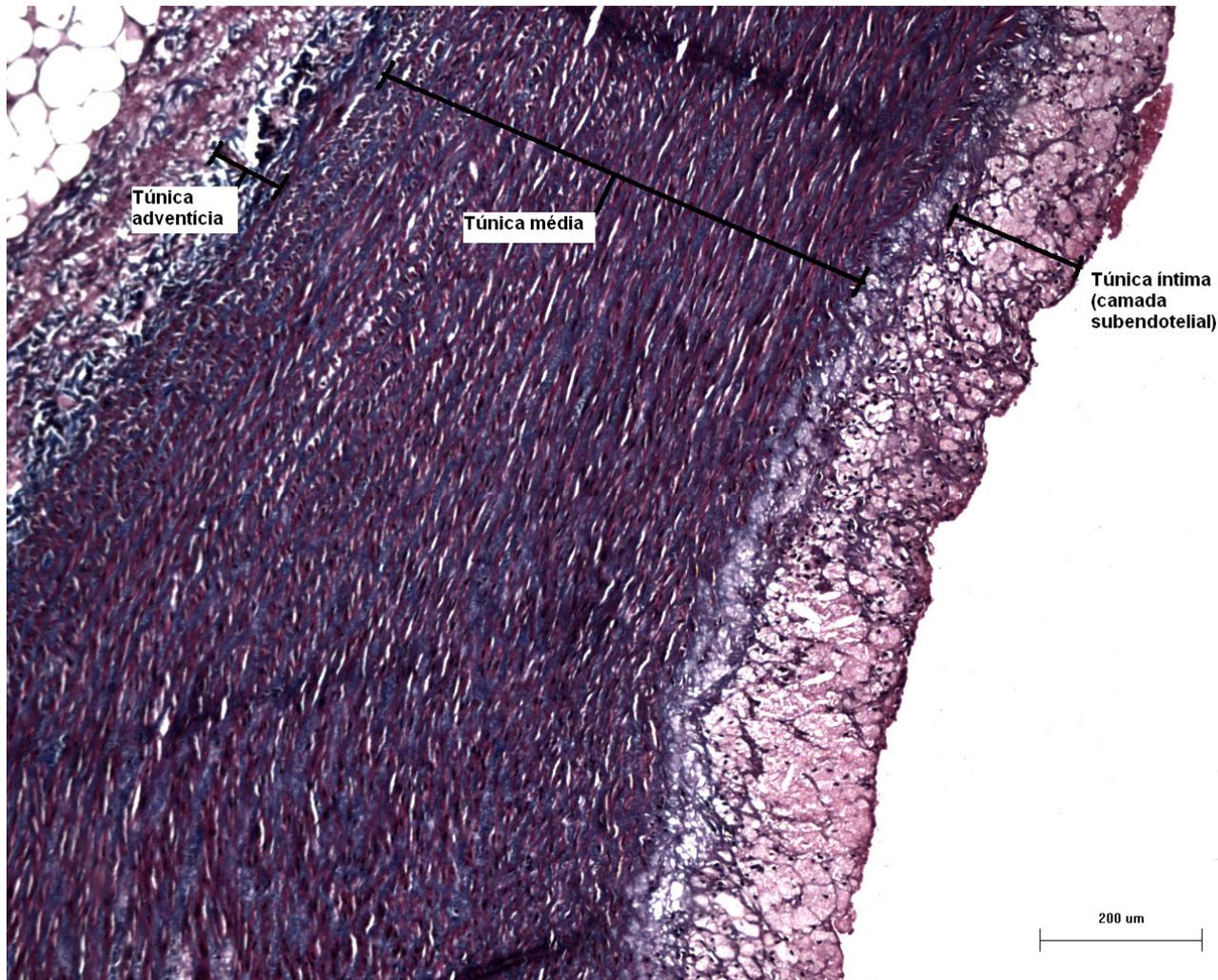
**Figura 15 – Fotomicrografia com ausência de espessamento da camada subendotelial do arco aórtico G1 (controle-ração), corante Tricrômio de Masson 20X**



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

G2 (Ração, colesterol 1,5g c/ 10mL de gema) - Foram evidenciadas formações de células espumosas (discretas) em todos os arcos aórticos (100%) e espessamento subendotelial (Figura 16).

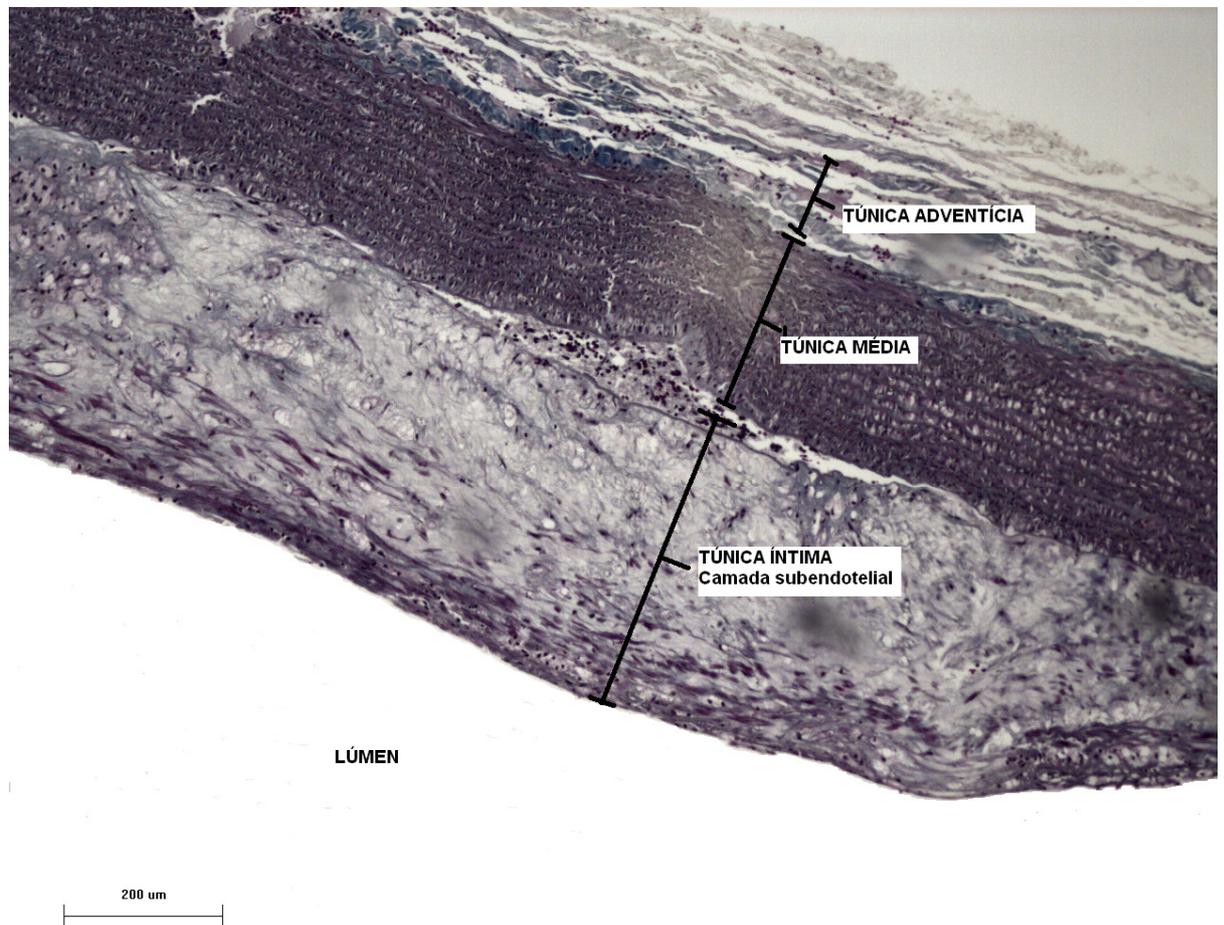
**Figura 16 – Fotomicrografia com presença de espessamento da camada subendotelial do arco aórtico G3 (leucoantocianidina de uva), corante Tricrômio de Masson 10X.**



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

G3 (Ração, colesterol 1,5g c/ 10mL de gema e leucoantocianidina de uva) - Foram observadas bem delineadas, células espumosas e espessamento. De acordo com a mensuração do espessamento do arco aórtico e femoral foram significantes comparados com os demais (Figura 17).

**Figura 17 – Fotomicrografia com presença de espessamento da camada subendotelial do arco aórtico G2 (1,5 g de colesterol c/ 10mL de gema), corante Tricrômio de Masson 10X.**

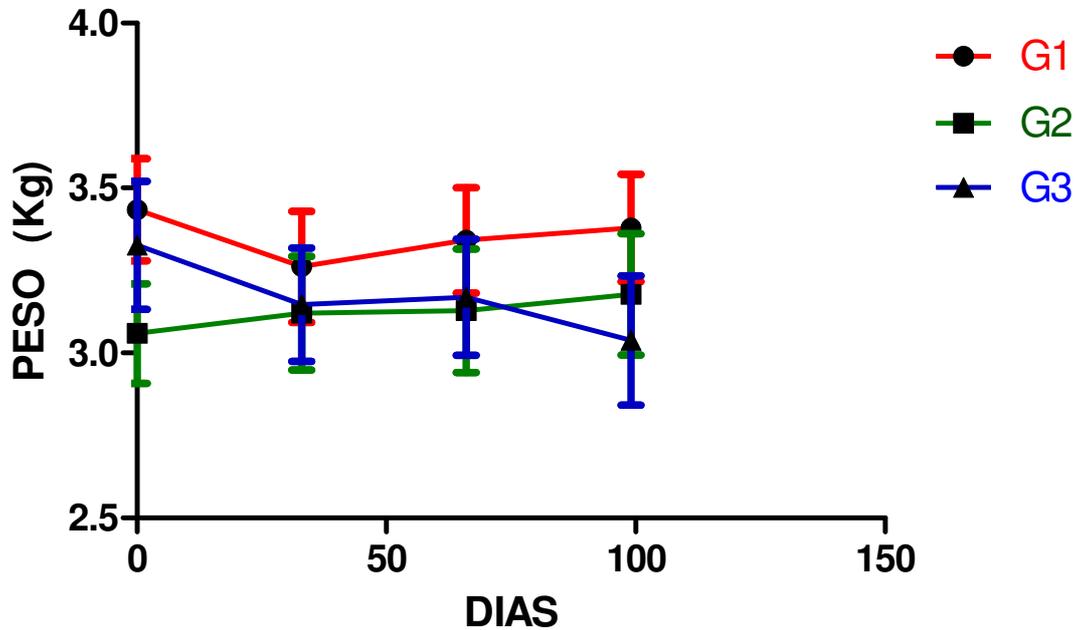


Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

### 5.3 Peso dos Animais

A média do peso dos animais no início do experimento para os grupos foi de 3,4341kg ( $\pm 0,4093$ ) para o G1, 3,0591kg ( $\pm 0,3985$ ) para o G2 e 3,3263kg ( $\pm 0,51281$ ) para o G3. Observou-se, que a diminuição do peso dos animais dos grupos G1 G2 nos primeiros 33 dias de experimento e aumento de peso dos animais do grupo G3 nos primeiros 33 dias, no entanto, não houve diferença significativa no peso dos animais durante todo experimento. Conforme demonstra o Gráfico 1 sobre a evolução de peso.

Gráfico 1 – Representação de evolução do peso dos animais durante o experimento dos grupos: G1, G2 e G3, durante os 100 dias de experimento. Observa-se que não houve diferença significativa entre os pesos dos animais em todos os tempos do experimento,  $p=0,7895$ .



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

#### 5.4 Valores de Colesterol Total e suas Frações

Os Gráficos 2, 3, 4 a seguir mostram a concentração sérica de CT, LDL, VLDL, HDL, Triglicerídeos e lipídeos totais dos coelhos submetidos à dieta hiperlipidêmica dos grupos G1 (Controle – ração), G2 (Ração, 1,5g de colesterol e 10mL de gema de ovo), e do G3 (Ração, 1,5g de colesterol, 10mL de gema de ovo e 50mg/Kg de leucoantocianidina de uva), antes e durante o consumo da dieta. Os resultados das variáveis pesquisadas foram analisados usando o ANOVA one-way e o pós-teste de TUKEY para os dados que seguem a distribuição normal. Para os resultados que não seguem a distribuição normal foi utilizado o teste de KRUSKAL-WALLIS e o pós-teste DUNNS. Foram calculados a média, desvio padrão e o valor de  $p$ , adotando intervalo de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ ) em todos os grupos.

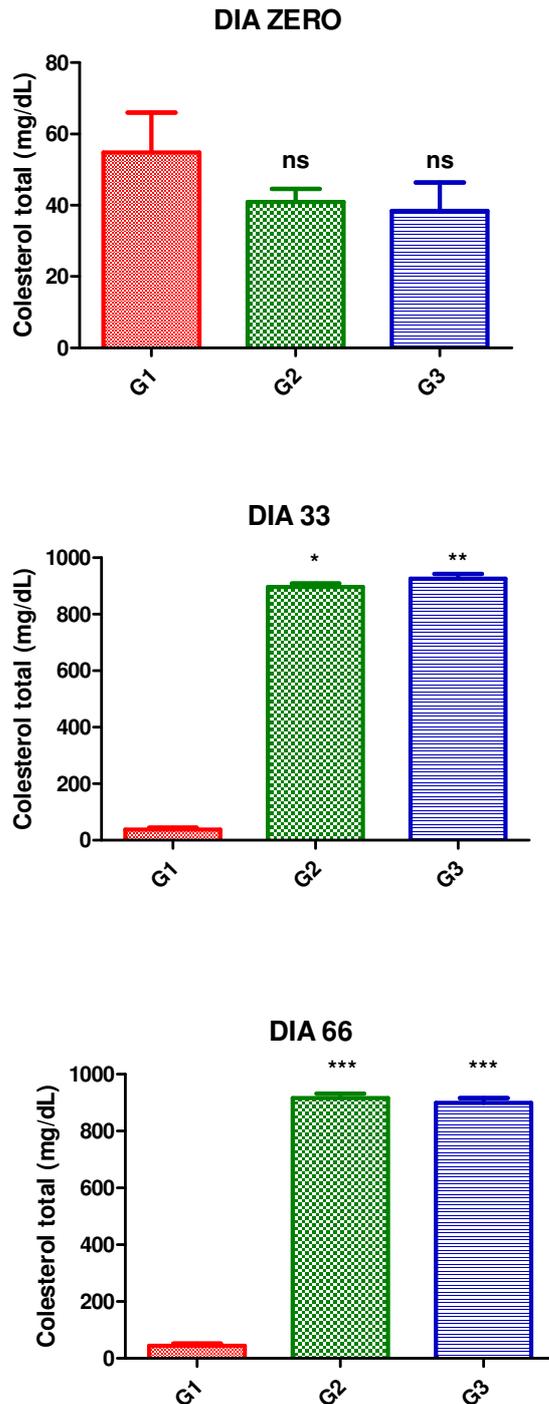
##### 5.4.1 Colesterol Total

Ao analisar os níveis de CT (colesterol total) dos coelhos do grupo G1, G2 e G3 no dia (ZERO) verificou-se que não houve diferença significativa entre os grupos. Nos dias (zero, 33, 66 e 99) dias, com a dieta 200g de ração para cada animal por

dia, observou-se que os níveis do CT do grupo G1 permaneceram normais, já nos grupos G2 e G3 houve aumento significativo, que receberam uma dieta hiperlipidêmica, conforme demonstra o Gráfico 2 abaixo.

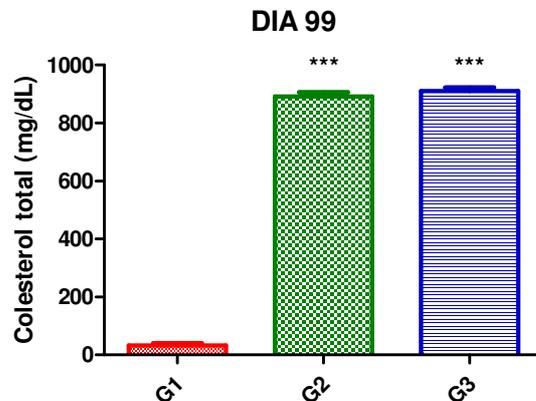
**Gráfico 2 – Valores de CT dos animais em todo o experimento e seus respectivos grupos: G1, G2 e G3, e dia: zero, 33, 33, 66 e 99 com a dieta de 200g de ração por animal/dia.**

(Continua)



**Gráfico 2 – Valores de CT dos animais em todo o experimento e seus respectivos grupos: G1, G2 e G3, e dia: zero, 33, 33, 66 e 99 com a dieta de 200g de ração por animal/dia.**

(Conclusão)



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

No início do experimento (dia zero), a comparação entre os grupos G1, G2 e G3 não houve diferença significativa  $p = 0,1645$ . No dia 33, a comparação entre os grupos G1 e G3 apresentaram resultado significativo  $p = 0,0011$  quando comparados com o grupo G1. Entre os grupos G2 e G3 o resultado foi não significativo no restante do experimento. No dia 66, a comparação entre os grupos, G1 e G2 apresentaram resultado significativo  $p < 0.0001$ . Entre os grupos G2 e G3 o resultado foi não significativo, em todas as comparações anteriores foi utilizado o teste de KRUSKAL-WALLIS e o pós-teste DUNNS. No dia 99, a comparação entre os grupos, G1 comparados com o, G2 e G3 apresentaram resultado significativo. Entre os grupos G2 e G3 o resultado foi não significativo, em todas as comparações do dia 99 foi utilizado o teste ANOVA one-way e o pós-teste de TUKEY.

**Tabela 1 – Média, desvio padrão do CT (Colesterol Total), conforme o dia e grupo experimental.**

Variável	G1		G2		G3	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Colesterol Total (dia zero)	54,86	29,58	40,93	9,84	38,46	20,95
Colesterol Total (dia 33)	38,32	17,19	897,30*	32,97	926,10*	44,44
Colesterol Total (dia 66)	44,86	19,04	917,20*	39,67	899,60*	46,80
Colesterol Total (dia 99)	32,80	21,08	892,07*	37,85	910,61*	32,42

Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

Nota:\* Houve significância em relação ao grupo controle (G1).

#### 5.4.2 Colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade)

Ao analisar os níveis do LDL, dos três grupos no dia (zero) observou-se que os grupos G1, G2 e G3 não houve diferença significativa, da mesma forma no grupo G1 os níveis estavam mais elevados, esta diferença é semelhante à citada em relação aos níveis do CT. Durante os dias (zero, 33, 66 e 99) do experimento os níveis plasmáticos do LDL do grupo G1, se mantiverem sem alterações significantes, conforme Gráfico 3.

**Gráfico 3 – Valores de LDL dos animais em todo o experimento e seus respectivos grupos: G1, G2 e G3 e dias: zero, 33, 66 e 99.**

(Continua)

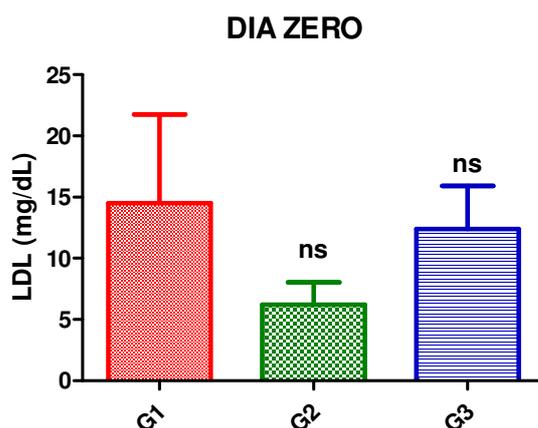
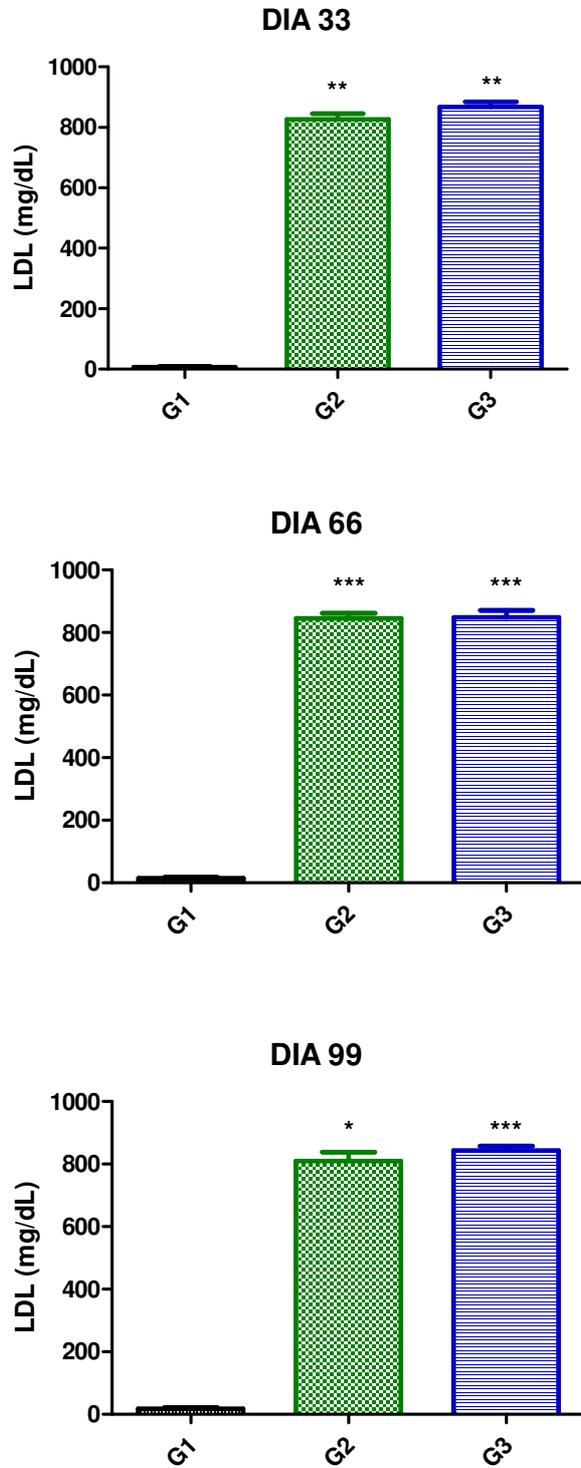


Gráfico 3 – Valores de LDL dos animais em todo o experimento e seus respectivos grupos: G1, G2 e G3 e dias: zero, 33, 66 e 99.

(Conclusão)



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

No início do experimento (dia zero), a comparação entre os grupos G1, G2 e G3, não houve diferença significativa  $p=0,3707$ . No dia 33, a comparação entre os grupos, G1 comparados com o, G2 e G3 apresentaram resultado significativo  $p=0,0012$ . Entre os grupos G2 e G3 o resultado foi não significativo e em todas as comparações (dia zero e 33) foi utilizado o teste de KRUSKAL-WALLIS e o pós-teste DUNNS. No dia 66, a comparação entre os grupos, G1 comparados com o, G2 e G3 apresentaram resultado significativo  $p<0.0001$ . Entre os grupos G2 e G3 o resultado foi não significativo, em todas as comparações foi utilizado o teste ANOVA one-way e o pós-teste de TUKEY. No dia 99, a comparação entre os grupos, G1 comparados com o, G2 e G3 apresentaram resultado significativo  $p=0,0008$ . Entre os grupos G2 e G3 o resultado foi não significativo e em todas as comparações foi utilizado o teste de KRUSKAL-WALLIS e o pós-teste DUNNS.

**Tabela 2 – Média, desvio padrão da LDL, conforme o dia e grupo experimental.**

Variável	G1		G2		G3	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
LDL (dia zero)	14,50	19,22	6,22	4,77	12,41	9,23
LDL (dia 33)	6,73	5,56	826,50*	51,17	866,70*	48,352
LDL (dia 66)	14,47	9,82	845,03*	44,98	848,84*	58,34
LDL (dia 99)	17,10	11,39	809,29*	78,67	844,01*	36,91

Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

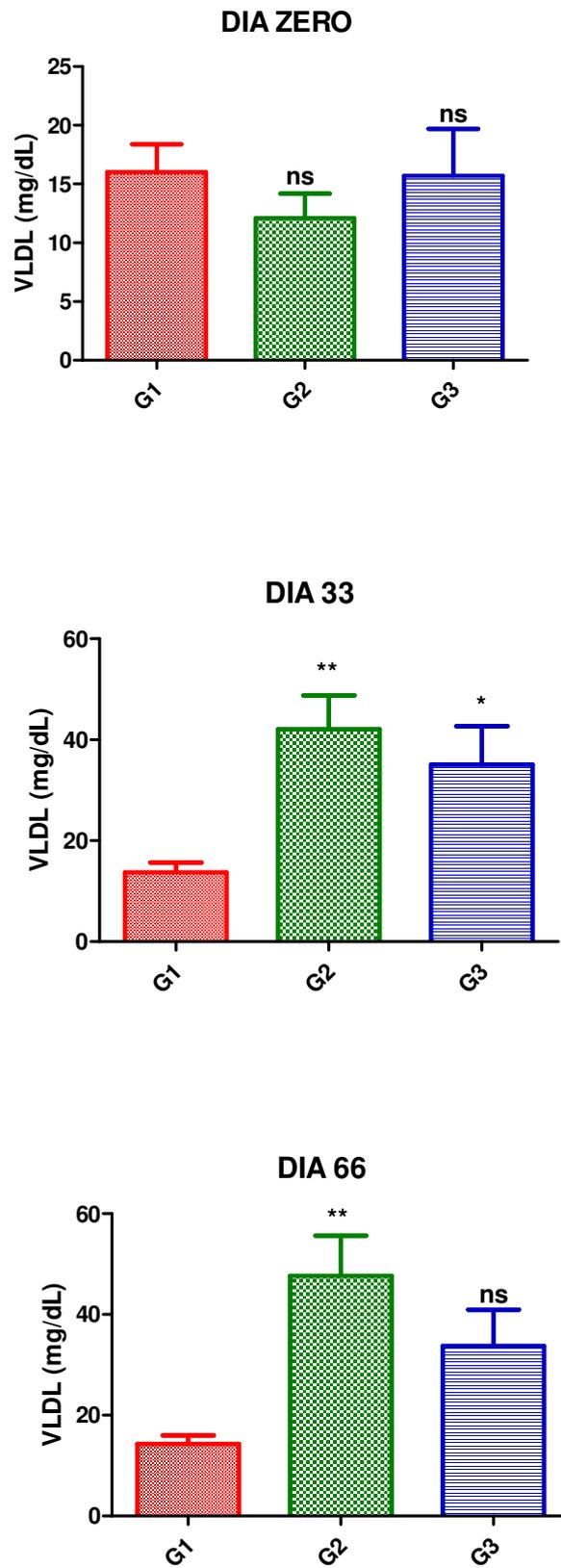
Nota:\* Houve significância em relação ao grupo controle (G1).

#### 5.4.3 Colesterol VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade).

A análise dos níveis do VLDL, no dia (zero) observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos, permaneceu sem alterações significantes no dia 33. Nos dias (66, 99) dias houve aumento dos níveis plasmáticos dos grupos G2 e G3 em relação ao grupo G1, e a diferença não foi significativa entre si, durante o experimento, conforme demonstra o Gráfico 4 a seguir.

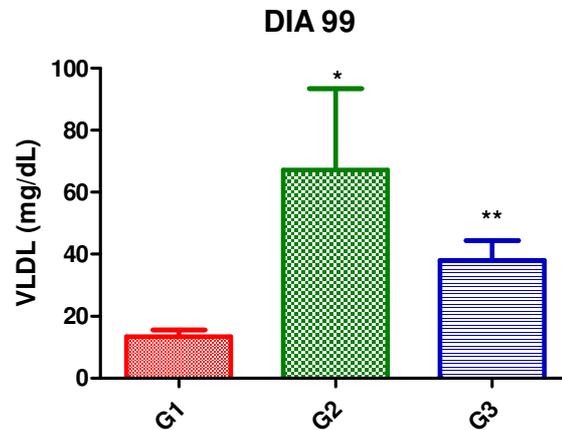
Gráfico 4 – Valores de VLDL dos animais em todo o experimento e seus respectivos grupos: G1, G2 e G3 e dias: zero, 33, 66 e 99.

(Continua)



**Gráfico 4 – Valores de VLDL dos animais em todo o experimento e seus respectivos grupos: G1, G2 e G3 e dias: zero, 33, 66 e 99.**

(Conclusão)



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

No dia zero, a comparação entre os grupos G1, G2 e G3 o resultado foi não significativa  $p=0,5867$ , em todas as comparações foi utilizado o teste ANOVA one-way e o pós-teste de TUKEY. No dia 33, entre os grupos G1, comparado com os grupos G2 e G3 houve diferença significativa  $p= 0,0042$ , no entanto comparando os grupo G2 e G3 não houve diferença significativa e em todas as comparações foi utilizado o teste de KRUSKAL-WALLIS e o pós-teste DUNNS. No dia 66, a comparação entre os grupos G1 e G2, houve diferença significativa  $p =0,0054$ , no entanto, comparando os grupos G1 e G3, G2 e G3 o resultado foi não significativa, em todas as comparações foi utilizado o teste ANOVA one-way e o pós-teste de TUKEY. No dia 99, a comparação entre os grupos G1 e G2, G1 e G3 o resultado foi significativa  $p=0,0027$ , no entanto, comparando os grupos G2 e G3 não houve diferença significativa e em todas as comparações foi utilizado o teste de KRUSKAL-WALLIS e o pós-teste DUNNS.

**Tabela 3 - Média, desvio padrão do VLDL, conforme o dia e grupo experimental.**

Variável	G1		G2		G3	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
VLDL (dia zero)	16,01	6,29	12,09	5,51	15,70	10,58
VLDL (dia 33)	13,73	5,20	42,09	17,65	35,07*	20,16
VLDL (dia 66)	14,27	4,47	47,69	20,95	33,73	19,17
VLDL (dia 99)	13,34	5,87	67,17	69,63	38,02*	16,72

Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

Nota:\* Houve significância em relação ao grupo controle (G1).

#### 5.4.4 Colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade)

Ao analisar os níveis do HDL, no dia (zero) pode-se observar que não houve diferença entre os três grupos. Nos dias (33, 66, 99) dias não houve aumento dos níveis plasmáticos dos grupos G2 e G3 com diferença significativa em relação ao grupo G1. Porém não houve diferença significativa entre os grupos G2 e G3, durante o experimento, de acordo com o Gráfico 5 a seguir.

**Gráfico 5 – Valores de HDL dos animais em todo o experimento e seus respectivos grupos: G1, G2 e G3 e dias: zero, 33, 66 e 99.**

(Continua)

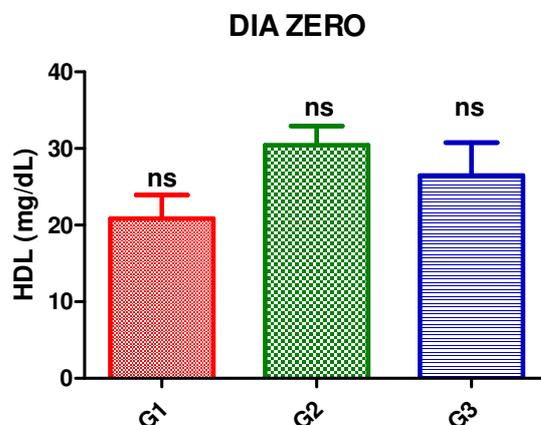
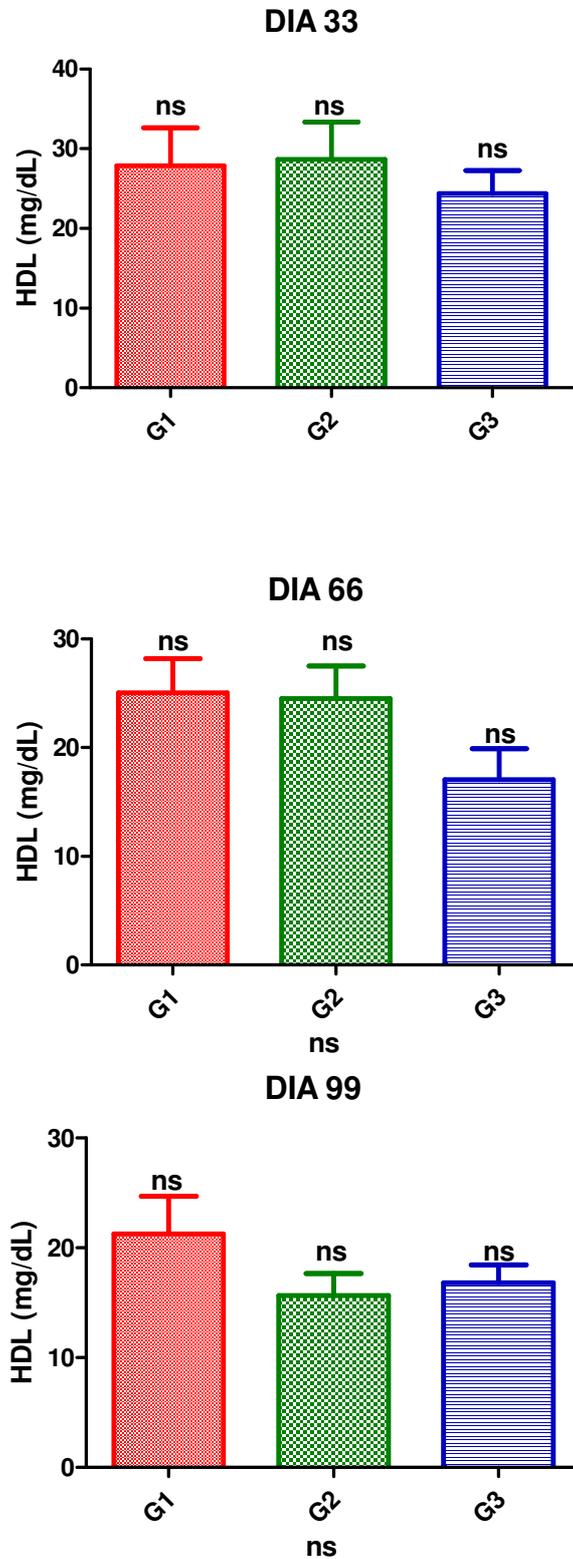


Gráfico 5 – Valores de HDL dos animais em todo o experimento e seus respectivos grupos: G1, G2 e G3 e dias: zero, 33, 66 e 99.

(Conclusão)



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

Observa-se que no início do experimento (dia zero), a comparação entre os grupos G1, G2 e G3 o resultado foi não significativo  $p=0,0976$ . Observa-se que no dia 33, a comparação entre os grupos G1 e G2, G1 e G3, G2 e G3 o resultado foi não significativo  $p=0,8913$ . Observa-se que no dia 33, a comparação entre os grupos G1 e G2, G1 e G3, G2 e G3 o resultado foi não significativo  $p=0,2006$  e em todas as comparações (nos dias zero, 33 e 66) foi utilizado o teste de KRUSKAL-WALLIS e o pós-teste DUNNS. Observa-se que no dia 99, a comparação entre os grupos G1 e G2, G1 e G3, G2 e G3 o resultado foi não significativo  $p=0,2648$  em todas as comparações foi utilizado o teste ANOVA one-way e o pós-teste de TUKEY.

**Tabela 4 – HDL média e desvio padrão conforme o dia e grupo experimental.**

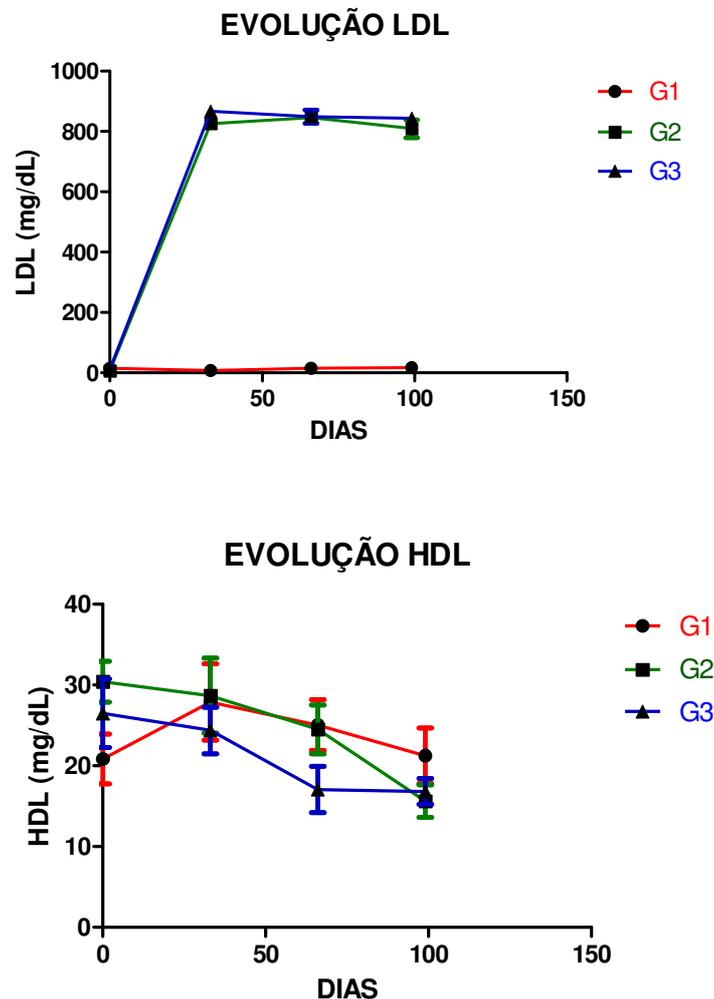
Variável	G1		G2		G3	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
<b>HDL(dia zero)</b>	20,84	8,17	30,41	6,68	26,50	11,24
<b>HDL (dia 33)</b>	27,90	12,48	28,70	12,31	24,38	7,61
<b>HDL (dia 66)</b>	25,04	8,29	24,50	7,96	17,06	7,51
<b>HDL (dia 99)</b>	21,26	9,09	15,63	5,34	16,82	4,24

Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

#### 5.4.5 Gráfico de Evolução LDL e HDL

Ao analisar os níveis do LDL e HDL, no dia (zero) pode-se observar que não houve diferença significativa entre os três grupos. No dia (33) houve um aumento do LDL com média de 826,50mg/dL para o grupo G2 866,70 mg/dL para o grupo G3 não obtendo diferença significativa. No HDL durante todo experimento não houve diferença significativa. No entanto, no dia 66 até o término do experimento os níveis de HDL do grupo G3 deixaram de diminuir e se estabilizaram como pode-se verificar no Gráfico 6 de evolução do HDL a seguir.

Gráfico 6 – Evolução de LDL e HDL



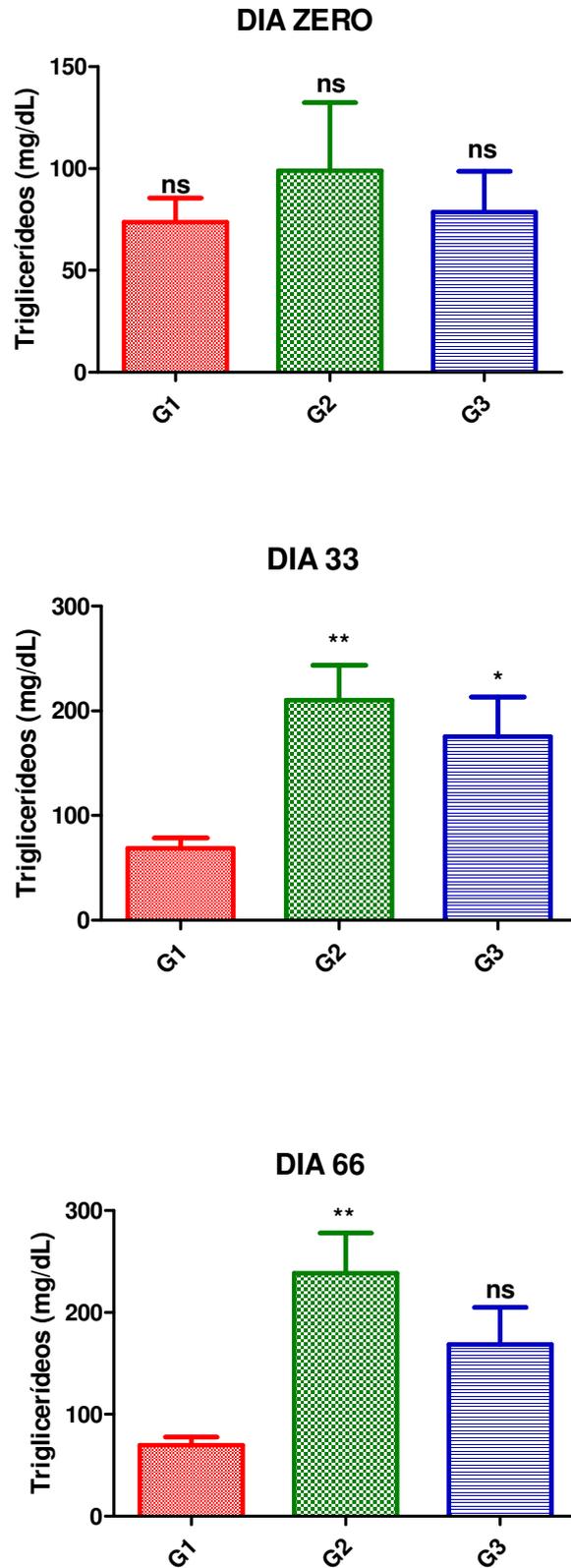
Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

#### 5.4.6 Triglicerídeos

Ao analisar os níveis de Triglicerídeos do grupo G1, os valores se mantiveram durante o experimento sem nenhuma alteração. No dia (99) dias os níveis aumentaram com diferença significativa dos grupos G2 e G3 em relação ao grupo G1. Observa-se que a leucoantocianidina de uva não reduziu de forma significativa os níveis plasmáticos dos triglicerídeos nos dias 33 e 99, no entanto, no dia 66 não houve diferença significativa entre o grupo G3 (tratado com leucoantocianidina de uva) e o grupo G1 (controle) desta forma, houve redução dos triglicerídeos, conforme Gráfico 7.

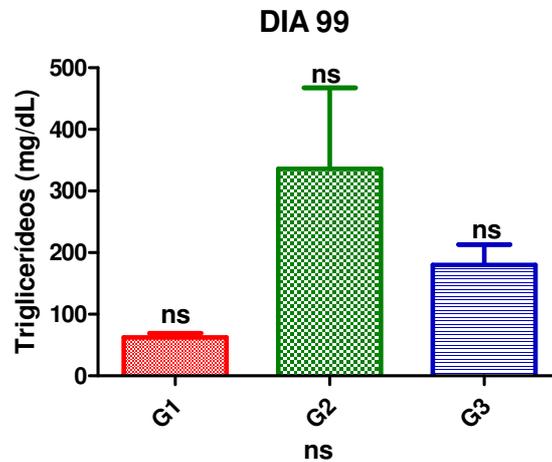
Gráfico 7 – Valores de triglicerídeos dos animais em todo o experimento e seus respectivos grupos: G1, G2 e G3 e dias: zero, 33, 66 e 99.

(Continua)



**Gráfico 7 – Valores de triglicerídeos dos animais em todo o experimento e seus respectivos grupos: G1, G2 e G3 e dias: zero, 33, 66 e 99.**

(Conclusão)



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

Observa-se que no início do experimento (dia zero), a comparação entre os grupos G1 e G2, G1 e G3, G2 e G3 o resultado foi não significativa  $p=0,9564$ . Observa-se que no dia 33, a comparação entre os grupos G1 e G2, G1 e G3, o resultado foi significativa  $p<0.05$ , no entanto, comparando os grupos G2 com G3 não houve diferença significativa em todas as comparações (nos dias: zero e 33) foi utilizado o teste de KRUSKAL-WALLIS e o pós-teste DUNNS. Observa-se que no dia 66, a comparação entre os grupos G1, G2 houve diferença significativa  $p=0,0047$ , no entanto, comparando os grupos G1 com G3 e G2 com G3 não houve diferença significativa em todas as comparações. Observa-se que no dia 99, a comparação entre os grupos G1 e G2, G1 e G3, G2 e G3 o resultado não foi significativa, apesar que verificar que o grupo tratado (G3) obteve média dos triglicerídeos mais próxima do grupo controle (G1). Em todas as comparações (nos dias 66 e 99) foi utilizado o teste ANOVA one-way e o pós-teste de TUKEY.

**Tabela 5 – TRIGLICERÍDEOS – média e desvio padrão conforme o dia e grupo experimental.**

Variável	G1		G2		G3	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
TGC (dia zero)	73,74	31,09	98,96	88,22	78,52	52,93
TGC (dia 33)	68,67	26,01	210,36	88,21	175,31*	100,86
TGC (dia 66)	69,69	20,66	238,41	104,70	168,63	95,81
TGC (dia 99)	62,36	17,95	335,68	347,85	179,68	87,97

Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

Nota:\* Houve significância em relação ao grupo controle (G1)

#### 5.4.7 Lipídeos Totais

Ao analisar os níveis de lipídeos totais não houve diferença significativa entre os grupos G2 e G3. Observa-se que a leucoantocianidina de uva não reduziu de forma significativa os níveis de lipídeos totais, como demonstra o Gráfico 8.

**Gráfico 8 – Valores de lipídeos totais dos animais em todo o experimento e seus respectivos grupos: G1, G2 e G3 e dias: zero, 33, 66 e 99.**

(Continua)

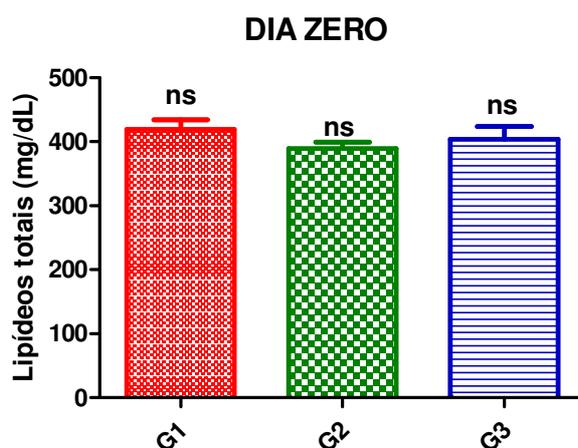
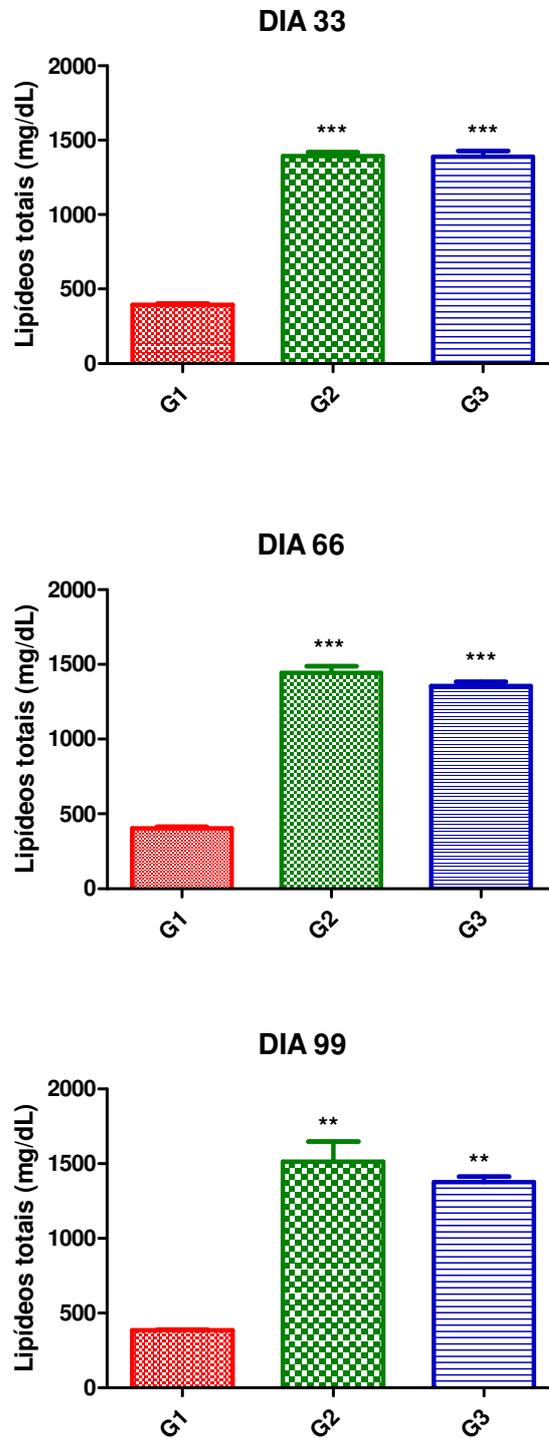


Gráfico 8 – Valores de lipídeos totais dos animais em todo o experimento e seus respectivos grupos: G1, G2 e G3 e dias: zero, 33, 66 e 99.

(Conclusão)



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

Observa-se que no início do experimento (dia zero), a comparação entre os grupos G1, G2 e G3, não houve diferença significativa  $p=0,4086$ . Observa-se que no tempo 33, a comparação entre os grupos G1 com G2 e G1 com G3, houve diferença significativa  $p<0.0001$ , no entanto comparando os grupos G2 com o G3 não houve diferença significativa. Observa-se que no tempo 66, a comparação entre os grupos G1 com G2 e G1 com G3, houve diferença significativa  $p<0.0001$ , no entanto, comparando os grupos G2 com o G3 não houve diferença significativa e em todas as comparações (nos dias zero, 33 e 66) foi utilizado o teste ANOVA one-way e o pós-teste de TUKEY. Observa-se que no dia 99, a comparação entre os grupos G1 com G2 e G1 com G3, houve diferença significativa  $p=0,0012$ , no entanto, comparando os grupos G2 com o G3 não houve diferença significativa em todas as comparações foi utilizado o teste de KRUSKAL-WALLIS e o pós-teste DUNNS.

**Tabela 6 – LIPÍDEOS TOTAIS – média e desvio padrão conforme o dia e grupo experimental.**

Variável	G1		G2		G3	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
LPT (dia zero)	419,51	39,47	389,39	26,38	403,99	53,017
LPT (dia 33)	394,00	27,52	1394,50*	64,24	1388,40*	106,75
LPT (dia 66)	404,48	24,25	1442,60*	117,83	1355,30*	71,77
LPT (dia 99)	384,11	13,96	1514,90*	353,18	1378,30*	90,745

Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

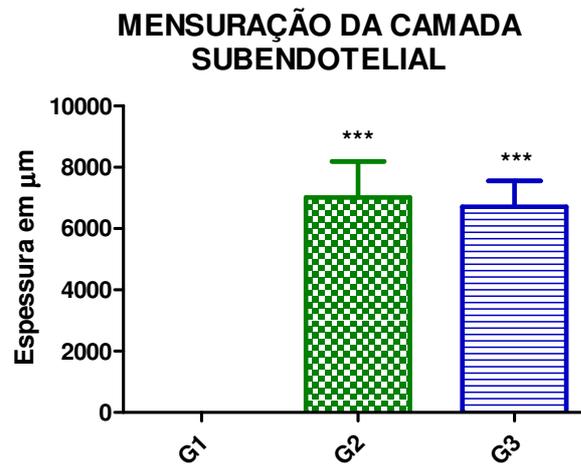
Nota:\* Houve significância em relação ao grupo controle (G1).

#### 5.4.8 Mensuração das Artérias

Observa-se que ao término do experimento (dia 100), a comparação entre os grupos G1 com G2 e G1 com G3, houve diferença significativa  $P=0,0009$ , no entanto, comparando os grupos G2 com o G3 não houve diferença significativa. Mas mesmo não havendo diferença estatisticamente significativa, comparando o grupo G3 com o

G2 houve uma redução de 4,35% no espessamento da camada subendotelial, como mostra o Gráfico 9 a seguir:

**Gráfico 9 – Mensuração da camada subendotelial**



Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

**Tabela 7 – MENSURAÇÃO DA PLACA ARTERIOSCLERÓTICA – média e desvio padrão ao término do experimento.**

Variável	G1		G2		G3	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
<b>Espessura do arco da aórtico em µm</b>	0,0	0,0	7005,5	3105,9	6701,0	2231,7

Fonte: Autor desta dissertação, 2011.

Na análise do grupo G1, G2 e G3 não foi observado alterações histológicas nas artérias: carótida direita e femoral. Já nos grupos G2 e G3 foram evidenciadas formações de células espumosas e espessamento da camada subendotelial. Foi observado que a leucoantocianidina de uva administrada ao grupo G3, não diminuiu o espessamento da camada subendotelial de forma significativa, no entanto houve redução do espessamento da camada subendotelial 4,35% quando comparado com o grupo G2.



## 6.1 Formação da Placa Arteriosclerótica

A aterosclerose é uma condição de patogenia extremamente complexa em virtude dos diversos fatores envolvidos. É considerada uma das principais doenças da atualidade, portanto o interesse nos mecanismos implicados no processo aterogênico. É justificável quando se verifica que grande parte das mortes ocorridas é decorrente de síndromes isquêmicas relacionadas à doença aterosclerótica. Sendo considerada uma doença inflamatória que compromete principalmente as artérias de grande e médio calibre, tais como o arco da aorta, femorais e carótidas (HASSON, 2001; DIJK et al., 2010). A camada íntima da artéria é o local onde se desenvolve o processo aterosclerótico, podendo deixar obstruído a luz do vaso (HILTUNEN et al., 2002; WADDINGTON et al., 2003; HUR et al., 2005; GALKINA et al., 2006). Nesta pesquisa observou-se a formação da doença aterosclerótica em artéria de grande calibre, onde houve lesão da camada íntima do arco aórtico.

O processo aterosclerótico no ser humano é lento, e tem início com a vida, onde as estrias de gorduras aparecem na camada íntima da aorta a partir dos 3 anos, sendo mais prejudicial a partir da vida adulta (GIROLDO; ALVES; BAPTISTA, 2007; LI et al., 2008; SANTOS; BORTOLOZO, 2008;). Diferente no coelho, em que o desenvolvimento do processo é rápido, e em poucas semanas ocorre à lesão no endotélio. Por isso, é um animal que tem vários aspectos semelhantes na estrutura e composição encontradas no humano, por isso, o coelho é utilizado em pesquisas do processo aterosclerótico, o metabolismo de lipoproteínas e assim como o tratamento da doença (CONSTANT, 2004; ZHANG; XU; LI, 2009). Estas informações são precisas com pesquisas para estudo da arteriosclerose utilizando o coelho como um excelente modelo para estudar o desenvolvimento da aterosclerose em curto prazo de tempo (STAHLKE JÚNIOR et al, 2004; BERNADINO, 2008; LEE et al, 2004) e foi confirmada com nossos resultados ao término de 100 dias do experimento para a formação do espessamento da camada subendotelial e formação da aterosclerose.

Segundo Luz, Laurindo e Chagas (2003) as artérias onde o processo aterosclerótico é mais evidente são: femoral, carótidas comuns, arco aórtico, ilíacas e renais, sendo que no presente experimento não verificamos o comprometimento aterosclerótico nos vasos: ilíacos e renais. No entanto, observamos alterações extremamente discretas nas artérias carótidas comuns e femorais, sendo no arco

aórtico o maior comprometimento provocado pela aterosclerose, este comprometimento é reforçado por Rai, Hare e Zulli (2009) que realizaram avaliação histológica da aterosclerose em coelhos para verificar o relaxamento do endotélio vascular, bem como para realização da mensuração da camada subendotelial.

## **6.2 Modelo Experimental de Aterogênese em Coelhos**

Os níveis de colesterol total, LDL, HDL, VLDL, lipídeos totais e triglicerídeos aumentam rápido, no coelho, este fato ocorre devido à lenta excreção da ingestão da dieta hiperlipídica (IHARA et al., 1998). Sendo assim, pesquisadores como Jorge et al., (1997); Bernadino (2008) utilizaram coelhos adultos nos experimentos com dieta rica em colesterol, gema de ovo e banha e assim desenvolveram o processo da arteriosclerose em coelhos. No início de administração de uma dieta aterogênica rica em colesterol e gordura saturada, os níveis das lipoproteínas aumentam em curto prazo (GIROLDO; ALVES; BAPTISTA, 2007; KOLANKIEWICZ; GIOVELLI; BELLINASSO, 2008; LANCELLOTTI et al., 2010; WAQAR et al., 2010;) estas informações coincidem com as observadas em nossos resultados, onde a dieta hiperlipidêmica elevou os níveis das lipoproteínas que atingiu nível superior a 800 mg/dL.

Estudo utilizando gema de ovo foi administrado em animal para esclarecer os processos envolvidos da arteriosclerose como também o metabolismo lipídico, como o experimento realizado por Ihara et al. (1998), que administrou colesterol de forma crônica e aguda (3 e 2 meses), foi verificado o espessamento na aorta dos coelhos. Estas afirmações confirmam os resultados do nosso experimento, onde a dieta hiperlipidêmica utilizando gema de ovo de galinha e 1,5 g de colesterol comprovou que em 100 dias os níveis dos lipídeos aumentaram e produziram com eficácia a aterosclerose, bem como de outros sinais clínicos como surgimento de xantomas, esteatose hepática severa (macrovesicular). Nikolai Anitchkow administrou gema de ovo de galinha em coelhos, para induzir aterosclerose, porém, a quantidade utilizada não foi esclarecida. Em experimento realizado por Bernardino (2008) visando esclarecer a quantidade de gema de ovo utilizada, estes utilizaram vários tipos de dietas, comprovaram que o coelho é um excelente animal para induzir arteriosclerose utilizando gema e/ou colesterol, sendo preferível o uso da gema de ovo por conta do baixo custo.

Comparando as dietas utilizadas nos experimentos, oferecida aos animais para induzir arteriosclerose, com o objetivo de induzir placas ateroscleróticas, pesquisadores administraram ração suplementada com uma gema de ovo acrescentada com 13,5 mL de óleo de milho (JALDIN et al., 2006), no experimento de Clubb Junior et al., (1989) foi ofertado colesterol contendo 3 e 4 mg, e Jorge et al., (1997) utilizou 0,5% de colesterol puro, sendo acrescentado a ração, produzindo uma dieta de laboratório. Porém este modelo de dieta não é preciso, pois os autores não têm como garantir que todos os animais irão ingerir a quantidade de ração ou a gordura efetivamente desejada.

Bernadino (2008) utilizaram com eficácia 20 mL de gema de ovo de galinha em seu experimento, e foi desenvolvida a arteriosclerose nos coelhos. Foram utilizados em nosso experimento, 10 mL de gema, já que usamos também 1,5g de colesterol que misturados a gema de ovo são suficientes para a formação da arteriosclerose.

Segundo Ramalho et al. (2007) a concentração do colesterol em ovos de galinha é de 956 mg/100g, por ter um alto teor de lipídios o ovo é considerado importante para o desenvolvimento da arteriosclerose, além do aumento significativo na concentração de colesterol plasmático (JALDIN et al., 2006), que no presente experimento o colesterol contido na gema de ovo foi de 997,5mg/100g (realizado por cromatografia – HPLC *High Performance / Pressure Liquide Chromatography*) correspondendo aos resultados do nosso experimento, essas evidências são fidedignas, indicando a importância do tipo de gordura em relação ao risco da doença cardiovascular, comprovando que a dieta rica em colesterol e gordura saturada tem graves consequências para saúde.

### **6.3 Efeito da Leucoantocianidina de Uva nos Níveis Séricos Sanguíneos**

No presente trabalho utilizamos a dosagem segundo Segura, Marin e Delgado (2003) que descrevem que 50mg/Kg de proantocianidinas oligoméricas são capazes de reduzir a oxidação da LDL e aumentar o HDL, sendo a dosagem reajustada a cada 33 dias, sendo usado o pó liofilizado (processo de desidratação) de leucoantocianidina de uva.

Em experimento em coelhos Nova Zelândia realizado por Damasceno et al. (2007) utilizou 7,3mg/Kg/dia de isoflavona da soja mostraram efeitos hipolipemiantes e de diminuição da subfração pró-inflamatória de LDL no plasma sanguíneo dos animais. Já Xia et al. (2006) verificou a influência da antocianina extraídas do arroz preto na arteriosclerose em ratas (300mg/Kg/dia), tendo êxito na melhora do perfil lipídico, diminuindo os triglicerídeos, colesterol total e aumentando o HDL (lipoproteína de alta densidade). O possível motivo do sucesso do experimento deve-se ao uso do extrato bruto e não purificado, já que algumas vezes o extrato bruto possui um efeito terapêutico mais significativo em virtude da soma de todas as substâncias encontradas no presente extrato. No nosso experimento não houve melhora estatisticamente significativa na redução do colesterol total, LDL, lipídeos totais, triglicerídeos. Meyer et al. (1997) acrescenta que as atividades antioxidantes dos extratos fenólicos de 14 diferentes tipos de uvas frescas foram investigadas através da verificação da inibição da lipoproteína de baixa densidade (LDL) *in vitro*. No entanto, segundo Van Der Worp et al. (2010) nem sempre experimentos realizados com resultados positivos *in vitro* tem o mesmo resultado *in vivo* e também nem sempre experimentos *in vitro* possuem o mesmo grau de reprodutibilidade de forma plena *in vivo*.

Nielsen et al. (2005) realizaram um estudo utilizando uma substância purificada de fração de antocianinas de groselha preta em coelhos Watanabe, neste estudo o extrato purificado aumentou significativamente o colesterol plasmático e LDL, mas reduziu o VLDL de forma significativa. No presente experimento não houve diferença significativa comparando o grupo tratado com leucoantocianidina de uva e o grupo 2 (1,5g de colesterol e 1mL de gema de ovo), Hansson (2001) descrevem que o aumento do LDL é um fator importante a ser considerado, já que pode aumentar o processo de aterogênese.

Existem evidências de que o consumo de vinho (flavonóides contidos no vinho) produz um aumento no colesterol HDL, no entanto, estudos sugerem que o consumo moderado de álcool aumenta a HDL (LAMA, 2001). A relação entre o consumo de vinho e suas frações de flavonóides e os efeitos benéficos cardiovasculares não é tão clara, já que o efeito benéfico do vinho, do extrato bruto de antioxidantes, sejam flavonóides ou outros dependem dos seguintes fatores: se o

experimento é *in vitro* ou *in vivo*, a espécie de animal utilizado, modelo de indução da patologia, idade dos animais, origem do extrato e sua via de administração, bem como o tempo de duração do experimento (VAN DER WORP et al., 2010).

Kaliora, Dedoussis e Schmidt (2006) descrevem que vários componentes naturais têm recebido atenção considerável devido ao seu potencial antioxidante. Comumente alguns trabalhos têm descrito que consumir uma dieta rica em antioxidantes naturais tem sido associado com a prevenção e/ou de tratamento de arteriosclerose, impedindo a oxidação da LDL e lesão oxidativa do endotélio. Segura, Marin e Delgado (2003) descrevem que 50mg/Kg de proantocianidinas oligoméricas são capazes de reduzir a oxidação da LDL e aumentar o HDL. A presente afirmação não se confirmou no presente experimento, principalmente porque o LDL aumentou nos primeiros 33 dias tornando-se praticamente estável durante o restante do experimento, sendo que o HDL diminuiu dos grupos 2 e 3. Chagas e Carnieto Junior (2002) acrescenta que já é bem estabelecido que quanto mais elevada é a LDL, tanto mais freqüente a doença arteriosclerótica e quanto mais elevada a HDL, menor é o risco para adquirir essa doença em todas as raças, sexos e idades. Luz, Laurindo e Chagas (2003) relatam que a HDL tem um importante papel na regulação da função endotelial, restaura o comprometimento da síntese de óxido nítrico nas células endoteliais expostas a lipídios aterogênicos e papel antitrombolítico. Dornas et al. (2010) descrevem que estudos *in vivo* com extrato de proantocianidinas de sementes de uvas comprovam a eficácia na eliminação de radicais livres e inibição de danos oxidativos nos tecidos.

Shi et al. (2005) fizeram uma revisão de literatura descrevendo o extrato de semente de uva relatando que este possui um efeito benéfico em muitas áreas da saúde, por causa do efeito antioxidante, na ligação com o colágeno, promovendo pele jovem e prevenindo possivelmente problemas de pele como xantomas que em nosso experimento tiveram tamanho e aparecimento menores no grupo tratado com leucoantocianidina.



- 1- A leucoantocianidina de uva foi capaz de reduzir 4,35 % do espessamento da camada subendotelial;
- 2- A leucoantocianidina de uva reduziu de forma significativa a esteatose hepática (macrovesicular e microvesicular), bem como o tamanho dos xantomas que surgiram distribuídos nos corpo dos animais.
- 3- A leucoantocianidina de uva não modifica, no presente modelo experimental de arteriosclerose em coelhos, os níveis de colesterol total, LDL, HDL, VLDL, lipídeos totais e triglicerídeos de forma significativa;
- 4- A leucoantocianidina de uva foi capaz de aproximar os resultados de triglicerídeos do grupo controle.

**REFERÊNCIAS**

---

ANITSCHKOW, N.; CHALATOW, S. Ueber experimentelle cholesterinsteatose und ihre bedeutung für die entstehung einiger pathologischer prozesse. *Centralbl. Zent. Bl. Allg. Pathol. Patol. Anat.*, Jena, v. 24, p. 1-9, 1913. ISSN 0044-4030.

BENARDINO, J. A. S. **Estudo da aterosclerose induzida por diferentes tipos de dieta hiperlipídica em coelhos albinos (*Oryctolagus Cuniculus*)**. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.

BRAUNWALD, E. **Tratado de medicina cardiovascular**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1987. v. 2.

CHAGAS, A. C. P.; CARNIETO JUNIOR, A. Participação da cicloxigenase-2 no processo inflamatório da placa aterosclerótica. *Rev. Soc. Cardiol. do Estado de São Paulo*, São Paulo, v. 12, n. 4, 2002. ISSN 0103-8559.

CLUBB JUNIOR, F. J. et al. Effect of dietary omega-3 fatty acid on serum lipids, platelet function, and atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arteriosclerosis*, Dallas, v.9, n.4, p. 529-537, 1989. ISSN 0276-5047.

CONSTANT, J. The role of eggs, margarines and fish oils in the nutritional management of coronary artery disease and strokes. *Keio J. Med.*, Takyō, v. 53, n. 3, p. 131–136, 2004. ISSN 0022-9717.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V. ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1996.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002. *Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências*. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 21 jun 2002. Seção 1, p. 201.

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, p. 41-48, 2007. ISSN 1807-1325.

DAMASCENO, N. R. T. et al. Soy isoflavones reduce electronegative low-density lipoprotein (LDL(-)) and anti-LDL (-) autoantibodies in experimental atherosclerosis. *Eur. J. Nutr.*, Darmstadt, v. 46, n. 3, p. 125-32, Apr. 2007. ISSN 1436-6207.

DIJK, R. A. et al. The natural history of aortic atherosclerosis: A systematic histopathological evaluation of the Peri-reanl region. *Atherosclerosis*, Amsterdam, v. 210, p. 100-106, 2010. ISSN 0021-9150.

DORNAS, W. C. et al. Experimental Atherosclerosis in Rabbits. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 95, n. 2, p. 272-278, 2010. ISSN 0066-782X.

FRUEBIS, J. et al. Inhibition of VCAM-1 expression in the arterial wall is shared by structurally different antioxidants that reduce early atherosclerosis in NZW rabbits. *J. Lipid Res.*, Bethesda, v. 40, 1999. ISSN 0022-2275.

FUSTER, V. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. **Circulation**, Dallas, v. 90, n. 21, p. 26-2146, 1994. ISSN 0009-7322.

GALKINA, E. et al. Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent. **J. Exp. Med.**, New York, v. 203, n. 5, p. 1273-1283, 2006. ISSN 0022-1007.

GIROLDO, M. L.; ALVES, A. S.; BAPTISTA, F. Doença aterosclerótica: uma patologia multifatorial. **Rev. Saúde e Biol.**, Rio de Janeiro, v. 2, n.1, 2007. ISSN 0034-7108.

GOTTLIEB M. G. V.; BONARDI G.; MORIGUCHI E. H. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 15, p. 3; 2005. ISSN 1806-5562.

HANSSON, G. K. Immune mechanisms in atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v. 21, p. 1876-1890; 2001. ISSN 1079-5642.

HACKAM, G. D.; ANAND, S. S. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. **JAMA**, Chicago, v. 290, p. 932-940, 2003. ISSN 0098-7484.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C. **Farmacologia ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1997.

HERTOG, M. G. et al. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. **Nutr Cancer**, Hillsdale, v. 20, n. 1, p. 21-29, 1993. ISSN 1532-7914.

HIGUCHI, M. L.; GUTIERREZ, P. S. Avanços na patologia da placa aterosclerótica. **Rev. Soc. Cardiol. do Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 12, n. 4, jul./ago., 2002. ISSN 0103-8559.

HILTUNEN, M. O. et al. Changes in gene expression in atherosclerotic plaques analyzed using DNA array. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 165, p. 23-23, 2002. ISSN 0021-9150.

HUR, S. J. et al. Effect of dietary fats on blood cholesterol and lipid and the development of atherosclerosis in rabbits. **Nutr. Res.**, New York, v. 25, p.925-935, 2005. ISSN 0271-5317.

IHARA, S. S. M. et al. Coelhos alimentados com dieta rica em colesterol: modelo experimental para o estudo da aterosclerose. **NewsLab.**, n. 6, n.27, 1998.

JALDIN, R. G. et al. O processo aterosclerótico em artérias de coelhos submetidos a dieta suplementada com gema de ovo: modelo experimental de baixo custo. **J. Vasc. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 4, p. 247-56, 2006. ISSN 1677-5449.

JORGE, P. A. et al. Effects of atorvastatin, fluvastatin, pravastatin, and simvastatin on endothelial function, lipid peroxidation, and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 84, n. 4, 2005. ISSN 0066-782X.

\_\_\_\_\_. et al. Effects of omega-3 fatty acids on endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolemic rabbits. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 13-18, 1997. ISSN 0066-782X.

KALIORA, A. C.; DEDOUSSIS, G. V.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 187, n. 1, p. 1-17, Jul. 2006. ISSN 0021-9150.

KOLANKIEWICZ, F.; GIOVELLI, F. M. H.; BELLINASSO, M. L. Estudo do perfil lipídico e da prevalência de dislipidemias em adultos, **Rev. Bras. Anal. Clín.**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 4, p. 317-320, 2008. ISSN 0370-369X.

LAMA T, A. Vino: ¿recomendación de consumo moderado? **Rev. Méd. Chile**, Santiago, v. 129, n. 9, p. 1093-1094. sept. 2001. ISSN 0034-9887.

LANCELLOTTI, T. E. S. et al. Hypercholesterolemia impaired sperm functionality in rabbits, **Plos One**, v. 5, n. 10, 2010. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0013457#references>>. Acesso em: 13 dez. 2011.

LEE, C.-S. et al. Genistein supplementation inhibits atherosclerosis with stabilization of the lesions in hypercholesterolemic rabbits. **J. Korean Med. Sci.**, Seoul, v. 19, p. 656-661, 2004. ISSN 1011-8934.

LEIGHTON, F. et al. [Wine and health: epidemiological studies and possible mechanisms of the protective effects]. **Rev. Med. Chil.**, Santiago, v. 125, n. 4, p. 483-491, apr. 1997. ISSN 0034-9887.

LIMA, J. C. C. As dislipidemias e suas avaliações laboratoriais. **HiperAtivo**, v. 6, n. 2, p. 133-137, abr./jun. 1999. Disponível em: <<http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/6-2/006.pdf>>. Acesso em: 21 fev. 2011.

LI, Y. et al. Effect of aging on fatty streak formation in a diet-induced mouse model of atherosclerosis. **J. Vasc. Res.**, Basel, v. 45, n.3, p.205-210, 2008. ISSN 1018-1172.

LUZ, P. L.; FAVARATO, D. Doença coronária crônica. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 7, p. 5-21, 1999. ISSN 0066-782X.

\_\_\_\_\_; LAURINDO, F. R. M.; CHAGAS, A. C. P. **Endotélio & doenças cardiovasculares**. São Paulo: Atheneu, 2003.

MARTIM, E. C. O. et al. Lesão renal aguda por glicerol: efeito antioxidante da *Vitis vinifera L.* **RBTI: Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 292- 296, 2007. ISSN: 1982-4335. Disponível em: <[http://rbti.org.br/download/artigo\\_2010614141348.pdf](http://rbti.org.br/download/artigo_2010614141348.pdf)>. Acesso em: 23 fev. 2011.

- MARTINELLO, F. **Avaliação da atividade biológica do extrato hidroalcoólico de *Tamarindus indica* L. sobre o metabolismo lipídico e na carcinogênese coloretal em hamster.** 2006. 153 f. Tese (Doutorado em Biociências aplicada à Farmácia) – Universidade de São Paulo, Riberão Preto, 2006.
- MEYER, A. S. et al. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 45, p. 1638-1643, 1997. ISSN 0021-8561.
- MINOR, R. L. et al. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 86, n. 6, p. 2109–2116, 1990. ISSN 0021-9738.
- NIELSEN, I. L. F. et al. Anthocyanins increase low-density lipoprotein and plasma cholesterol and do not reduce atherosclerosis in watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 49, n. 4, p. 301-308, Apr. 2005.
- RAI, S.; HARE, D. L.; ZULLI, A. A. A physiologically relevant atherogenic diet causes severe endothelial dysfunction within 4 weeks in rabbit. **Int. J. Exp. Pathol.**, Oxford, v. 90, n. 6, p. 598-604, Dec. 2009. ISSN 0959-9673.
- RANG, H. P. et al. **Farmacologia.** 5. ed., São Paulo, Elsevier, 2004.
- RAMALHO, H. M. M. et al. Cholesterol levels in country chicken eggs, in those of farm raised chickens, and in quail eggs stored under different conditions. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 3, p. 256-260, 2007. ISSN 0073-9855.
- REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, v. 22, n.3, p. 659-661, 2007. ISSN 0892-6638.
- RODRIGUES, H. G. et al. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol HDL. **Rev. Nutr. PUCCAMP**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 315-320, jul./set., 2003. ISSN 0103-1627.
- SANTOS, L. E. S.; BORTOLOZO, E. A. F. Q. Ingestão de ômega-3: Consideração sobre potenciais benefícios no metabolismo lipídico. **Exata Terra**, v. 14, n. 2, p. 161-170, 2008.
- SCHIMIDT, E. R. **Teórica da amostragem:** bioestatística. Disponível em: <<http://www.ceunes.ufes.br/downloads/2/edilsonshmildt-AMOSTRAGEM.pdf>>. Acesso em: 23 fev. 2007
- SCHLEIER, R. **Constituintes fitoquímicos de *Vitis vinifera* L. (Uva).** 2004. Monografia (Especialização em Fitoterapia) – Instituto Brasileiro de Estudos Homeopáticos, São Paulo, 2004.
- SCHULZ, A.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia racional.** 4. ed., São Paulo, Manole, 2002.

SEGURA, M. A. M.; MARÍN, H. F.; DELGADO, S. E. B. Bases farmacológicas y clínicas del extrato de *Vitis vinifera* en patologías asociadas al estrés oxidativo. **Rev. Fitoter.**, Carlet, v. 3, n. 2, p. 135-144, 2003. ISSN 1576-0952.

SERRADO JUNIOR, C. V. et al. Conhecimentos atuais na fisiopatologia da doença aterosclerótica. **Rev. Soc. Cardiol. do Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 13, n. 2, mar./abr., 2003. ISSN 0103-8559

SHI, Q. et al. Arterial endothelial dysfunction in baboons fed a highcholesterol, high-fat diet–1,3. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 82, n. 4, p. 751-759; 2005. ISSN 0002-9165.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SILVA, M.B. S. **Flavonóides com capacidade antioxidante**. Química Aplicada – Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2006.

SPOSITO, A. C. et al IV Diretriz **Brasileira** sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 88, supl. 1, abr. 2007. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/abc/v88s1/01.pdf>>. Acesso em: 23 fev. 2011.

STAHLKE JÚNIOR, H. J. et al. Hiper-homocisteinemia causando aterogênese na aorta de coelhos: modelo experimental. **J. Vasc. Bras.**, São Paulo, v. 3, p. 20-30, 2004.

STEBBENS, W. E. An appraisal of cholesterol feeding in experimental atherogenesis. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, New York, v. 29, p. 107-128, Nov./Dec. 1986. ISSN 0033-0620.

TSIRPANLIS, G. Inflammation in atherosclerosis and other conditions : a response to danger. **Kidney Blood. Press. Res.**, Basel, v. 28, p. 211–217, 2005. ISSN 1420-4096.

VAN DER WERP, H. B. et al. Can animal models of disease reliably inform human studies? **Plos Medicine**, v. 7, n. 3, p. 1-8, 2010. Disponível em: <<http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.1000245>>. Acesso em: 8 dez. 2011.

WADDINGTON, E. et al. Fatty acids oxidation products in human atherosclerotic plaque: an analysis of clinical and histopathological correlates. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 167, p. 111-120, 2003. ISSN 0021-9150.

WAQAR, A.B. et al. High-fat diet without excess calories induces metabolic disorders and enhances atherosclerosis in rabbits. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 213, p. 148-155, 2010. ISSN 0021-9150.

WILMORE, J. H.; COSTILL, D. L. **Fisiologia do esporte e do exercício**. 2. ed., São Paulo: Manole, 2001.

XAVIER, H. T. Dislipidemia e trombose: importante associação de risco para a instabilização da placa aterosclótica. **Rev. Soc. Cardiol. do Estado de São Paulo**, v. 12, n.4, 2002. ISSN 0103-8559.

XIA, X. et al. Anthocyanin-rich extract from black rice enhances atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E-deficient mice. **J. Nutr.**, Philadelphia, v. 136, n. 8, p.2220-2225, 2006. ISSN: 0022-3166.

Yi, L. et al. Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 584, n.3, p. 583-590, Feb. 2010. ISSN 0014-5793.

ZHANG, J. P.; XU, Y. Z; LI, M. Effect of bushen kangshuai tablet on NF-kappaB signal pathway and inflammation factors in rabbits with experimental atherosclerosis. **Zhongguo Zhong Xi Yi Jie. He Za Zhi**. Beijing, v. 29, n. 9, p. 816-820, 2009. ISSN 0254-9034.



**APÊNDICE A**

**EFEITOS DA LEUCOANTOCIANIDINA DE UVA SOBRE A CAMADA SUBENDOTELIAL  
ARTERIAL EM COELHOS ALBINOS (*Oryctolagus cuniculos*) SUBMETIDOS À  
ARTERIOSCLEROSE EXPERIMENTAL**

**FICHA DE CONTROLE DO GRUPO**

**Grupo** \_\_\_\_ **Dieta de** \_\_\_\_ **g de** \_\_\_\_\_

**Data:** \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_\_ **Hora:** \_\_\_\_ : \_\_\_\_

**Relato sobre o Grupo / Aspecto Geral:**

---



---

**Descrição do Procedimento de Coleta de Sangue para Análise Laboratorial:**

---



---

<b>RESULTADO DOS EXAMES</b>					
Animais	Colesterol Total	Colesterol LDL	Colesterol HDL	Triglicérides	Lipídeos totais
Coelho 1					
Coelho 2					
Coelho 3					
Coelho 4					
Coelho 5					
Coelho 6					
Coelho 7					

**Observações:**

---



---

Responsável pelo preenchimento.: \_\_\_\_\_

**APÊNDICE B****EFEITOS DA LEUCOANTOCIANIDINA DE UVA SOBRE A CAMADA SUBENDOTELIAL ARTERIAL EM COELHOS ALBINOS (*Oryctolagus cuniculos*) SUBMETIDOS À ARTERIOSCLEROSE EXPERIMENTAL****FICHA DE CONTROLE INDIVIDUAL****Grupo** \_\_\_\_\_ **Animais** \_\_\_\_\_ **Dieta de** \_\_\_\_\_ **g de** \_\_\_\_\_*Avaliação dos Animais para Submissão na Pesquisa:*

Coelho \_\_\_\_\_, Gaiola \_\_\_\_\_, Data de admissão \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ Hora \_\_\_\_:\_\_\_\_,

Peso do Coelho(g) : \_\_\_\_\_ Programação da ração – *ad libidum*

Aspecto Geral:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Peso do Coelho (g) : \_\_\_\_\_

*Hora:* Início \_\_\_\_:\_\_\_\_ Término \_\_\_\_:\_\_\_\_ Duração \_\_\_\_:\_\_\_\_

Troca de água sim ( ) não ( ) Limpeza da gaiola sim ( ) não ( )

Observações gerais :

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Responsável pelo preenchimento.: \_\_\_\_\_

**APÊNDICE C****EFEITOS DA LEUCOANTOCIANIDINA DE UVA SOBRE A CAMADA SUBENDOTELIAL  
ARTERIAL EM COELHOS ALBINOS (*Oryctolagus cuniculos*) SUBMETIDOS À  
ARTERIOSCLEROSE EXPERIMENTAL****FICHA DE CONTROLE INDIVIDUAL**

**Grupo** \_\_\_\_ **Coelho** \_\_\_\_ **Gaiola:** \_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ **Hora:** \_\_\_\_ : \_\_\_\_

**Necropsia**

**Descrição do Procedimento:**

**Achados:**

**Conclusão:**

**Observações:**

Responsável pelo preenchimento.: \_\_\_\_\_



## ANEXO A



**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO**  
**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO**  
 AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
 INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

LAUDO DE ANÁLISE Nº: CQ 4777/2008

MATERIAL: Ovos Frescos - Marca Carnaúba - Data da Embalagem 18ABR2008 - Embalagem com 12 ovos

INTERESSADO: JOSÉ ANDRÉ BERNARDINO DOS SANTOS

ENDEREÇO: R. Alvorada, 822 - Maceió - AL

DATA DA ENTRADA DA AMOSTRA: 22/04/2008

DATA DA EMISSÃO DO LAUDO: 20/05/2008

NATUREZA(S) DA(S) ANÁLISE(S): FÍSICO-QUÍMICA

RESPONSÁVEL(eis): A. M. R. O. Miguel, E. Vicente, R. A. Ferrari, S. R. Baggio

### 1. METODOLOGIAS

#### Lípidios totais

HORWITZ, W. (Ed.). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2000. v. 2, cap. 34, met. 925.32, p. 2. (MA-CQ.022)

#### Composição em ácidos graxos

FIRESTONE, D. (Ed.). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 5th Ed. Champaign: AOCS. 2005/2006. met. Ce 1e-91, Ce 1f-96, Ce 1-62. (MA-CQ.091)

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Lab. Practice, v. 22, n. 8, p. 475-476, 1973. (MA-CQ.091)

Food Standards Agency. Mc Cance and Widdowson's The Composition of Foods, Sixth Summary Edition. Cambridge:2002, Royal Society of Chemistry. 537 p. (MA-CQ.091)

HORWITZ, W. (Ed.). Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 18th Ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC. 2005. cap. 41, met. 996.06, p. 20. (MA-CQ.091)

#### Colesterol

MAZALLI, M.R.; SALDANHA, T.; BRAGAGNOLO, N. Determinação de colesterol em ovos: comparação entre um método enzimático e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. Revista do IAL, v. 62 n.1, p. 49-54, 2003 (MA-CQ.018)

SCHMARR, H.; GROSS, H. B.; SHIBAMOTO, T. Analysis of polar cholesterol oxidation products: evaluation of a new method involving transesterification, solid phase extraction, and gas chromatography. J. Agric. Food Chem. 44, p. 512-517, 1996. (MA-CQ.018)

### 2. RESULTADOS

DETERMINAÇÕES	RESULTADOS
Lípidios totais (g/100g)	28,7 (0,3) *
Colesterol (mg/100g)	997,5 (30,1) *
Ácidos Graxos (g/100g)	
Saturados	8,53
Monoinsaturados	10,84
Poliinsaturados	4,19
Ômega 3	0,17
Ômega 6	4,02



CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS  
 Av. Brasil, 2880 • CEP 13.070-178 • Campinas/SP • Brasil  
 Tel. 19 3743-1781/1810/1820 • Fax 19 3743 1812/1822  
 e-mail: [ccqa@ital.sp.gov.br](mailto:ccqa@ital.sp.gov.br)  
<http://www.ital.sp.gov.br>



## ANEXO B

[ANEXO I - P. PROD-011]

<b>A Fórmula</b>		<b>LAUDO TÉCNICO</b>		Nº
				Pág. 1/2
Laboratório de Controle de Qualidade A Fórmula Praça Centenário Nº 1067 CEP.57051-140 Farol / Maceió-AL e-mail: aformulaalmoxarifado@ofm.com.br - CNPJ: 02.476.399.0001-07				
<b>Produto:</b> <u>Obucantocianidina</u>		<b>[Cliente:]</b>		
<b>DCB:</b>		<b>Solicitante:</b> <u>Almoxarifado</u>		
<b>[CAS:]</b>		<b>Nº da amostra:</b> <u>12094</u>		
<b>[Classe Terapêutica:]</b>		<b>Data/hora da coleta:</b> <u>05/09/08 15:00</u>		
<b>[Origem/Procedência:]</b> <u>Frauen</u>		<b>Quantidade amostrada:</b> <u>1g</u>		
<b>[Lote:]</b> <u>7212</u>		<b>Data de recebimento:</b> <u>05/09/08</u>		
<b>[Fornecedor:]</b> <u>RANOSKOL</u>		<b>[Data de análise:]</b> <u>05/09/08</u>		
<b>Data de Fabricação:</b> <u>06/12</u>		<b>Condições de amostragem:</b>		
<b>Data de Validade:</b> <u>06/12</u>		<b>Data de emissão:</b> <u>05/09/08</u>		
<b>Nota Fiscal:</b> <u>067699</u>				
TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS	REFERÊNCIAS	
Contaminação				
Peso médio				
Coefficiente de variação				
Uniformidade de conteúdo				
Caract. Organolépticas	* <u>10 - laranja</u>	<u>De acordo</u>	<u>CFRANCO FARM.</u>	
Identificação	<u>Amarelo-azulado</u>		<u>atual.</u>	
Solubilidade				
pH	* <u>Pouco solu-</u>	<u>De acordo</u>	<u>Ficha técnica</u>	
Perda por dessecação (Umidade)	<u>vel em</u>		<u>anexo</u>	
Ponto de Fusão	<u>aquecimento</u>			
Índice de Refração	<u>1,464 e</u>			
Viscosidade	<u>prateado</u>			
Densidade	<u>leve em</u>			
Teor	<u>etanol</u>			
TESTES MICROBIOLÓGICO	* <u>100% 95%</u>	<u>100% 3x</u>	<u>CFRANCO FARM.</u>	
Contagem total de bactérias	<u>105%</u>		<u>atual.</u>	
Fungos e leveduras	* <u>Umidade</u>	<u>46%</u>	<u>CFRANCO FARM.</u>	
Coliformes totais	<u>(KF):</u>		<u>atual.</u>	
Salmonella	<u>≤ 8,0%</u>			
<b>Observações:</b> <u>Frauen</u> <u>Temp. de armazenamento: 25°C Armazenamento 15°C - 30°C</u>				
<b>[Referência Bibliográfica:]</b>				
<b>[Métodos Analíticos:]</b>				
[Não é permitido a reprodução parcial deste laudo. Os resultados apresentados neste laudo referem-se à amostra recebida e aos itens ensaiados. A amostragem é de inteira responsabilidade do solicitante. *Ensaio que foram realizados pelo LCQ A Fórmula; os demais estão em conformidade com o laudo de análise do fornecedor.]				
<b>CONCLUSÃO:</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Aprovado</b>		<input type="checkbox"/> <b>Reprovado</b>		
<u>Bouças</u>		<u>Bouças</u>		
<b>Químico Responsável</b>		<b>Farmacêutico Responsável</b>		
CRQ nº		CRF nº <u>3041</u>		

F-PROD-029/07



## ANEXO C

PHARMA  
NOSTRA

Superação. Nossa principal matéria-prima.

FC=0144

## CERTIFICADO DE ANÁLISE

INSUMO:	LEUCOANTOCIANIDINA			Pág 1
ORIGEM/PROCEDÊNCIA:	FRANÇA	DATA DE ANÁLISE:	09/06/2008	
LOTE PHARMA NOSTRA:	08010807C	LOTE FABRICANTE:	7212	
DATA DE FABRICAÇÃO:	Junho/2007	DATA DE VALIDADE:	Junho/2012	
CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM:	TEMPERATURA ENTRE 15°C - 30°C			
FM:	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> · H <sub>2</sub> O			
PM:	324,27			
DATA DE EMISSÃO:	04/09/2008	NF:	067.696	ORDEM FRACIONAMENTO:
				1782-08
TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS	REFERÊNCIAS	
DESCRIÇÃO*	Pó laranja amarronzado	Pó laranja amarronzado.	Fabricante.	
IDENTIFICAÇÃO*	Teste colorimétrico	Positivo.	Fabricante.	
DENSIDADE APARENTE*	Informativo	Sem compactação 0.45 g/ml.	Met Geral FB IV	
UMIDADE (KF) *	≤ 8.0%	4.67%	Fabricante.	
RESÍDUO POR IGNIÇÃO*	≤ 0.5%	0.1%	Fabricante.	
METAIS PESADOS*	≤10 ppm	<10 ppm	Fabricante.	
SOLVENTES ORGANICOS RESIDUAIS	Etanol ≤100ppm* Acetato Etila ≤ 7.4 ppm Acetona ≤50 ppm*	Não detectada Conforme Não detectado	Fabricante. Fabricante. Fabricante.	
CONTEÚDO CATECHIN (HPLC)	13.0 - 19.0%	13.0%	Fabricante.	
SUBSTÂNCIAS INSOLUVEIS EM ÁGUA*	≤ 2.0%	0.33%	Fabricante.	
CONTROLE MICROBIOLÓGICO:				
Bactérias*	<1000 UFC/g	<1000 UFC/g	Fabricante.	
Fungos e Leveduras*	<100 UFC/g	<100 UFC/g	Fabricante.	
Enterobactérias	<100 UFC/g	<100 UFC/g	Fabricante.	
Staphylococcus*	Ausentes	Ausentes	Met.Geral FB IV	
Salmonella*	Ausente	Ausente	Met.Geral FB IV	
E. coli*	Ausente	Ausente	Met.Geral FB IV	
Pseudomonas*	Ausente	Ausente	Met.Geral FB IV	
GRANULOMETRIA*	Malha 200	Passou 100% na # 200	Fabricante	
TEOR (CG)	95.0% - 105%	101.3%	Fabricante	

\*Resultados obtidos em análise realizada no Laboratório de Controle de Qualidade Pharma Nostra (UNIDADE ANAPOLIS). E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

LEGENDA DAS REFERÊNCIAS: FB (Farmacopeia Brasileira) / USP (United States Pharmacopoeia) / EP (European Pharmacopoeia) / BP (British Pharmacopoeia) / JP (Japanese Pharmacopoeia) / MG (Método Geral conforme Farmacopéia Brasileira IV edição) / Fabricante (especificação conforme o fabricante do insumo) / Informativo (resultado fornecido como informativo pelo LCQ Pharma Nostra, na ausência de especificação oficial ou do fabricante).

CONCLUSÃO: (X) Aprovado ( ) Reprovado

Responsável pelo Lab. Controle de Qualidade  
Renata Galvão E. de Moraes - CRF-GO Nº 5009

Responsável Técnico  
Amin Gabriel Gebrim - CRF-GO Nº 1829

Matriz - Rio de Janeiro  
R. Aquidabã, 1144 - Méier  
Rio de Janeiro/RJ  
20720-293  
PABX: (21) 2141 1555

Filial Anápolis  
Via Primária - 5D-Qd.  
10 MOD. 01 S/N - Daia  
Anápolis/GO - 75133-600  
PABX: (62) 4014 0700

Filial Campinas  
Rua Estácio de Sá, 530  
Campinas/SP  
13080-010  
PABX: (19) 2101 4000

registro: 0800 707 0706  
indústria: 0800 727 4880

www.pharmanostra.com.br

## ANEXO D



**Comitê de Ética em Pesquisa da FCBS (CEP - FCBS/CESMAC/FEJAL)**

(Registro nº. 25000.152099/2004-97 – CONEP / CNS / SIPAR/MS – 07/10/04)



Maceió, 22 de Outubro de 2007.

**ANÁLISE INTERNA DE PROTOCOLO DE PESQUISA COM ANIMAIS VERTEBRADOS / COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)**

**I) Identificação:**

**Protocolo N°. 040A/07 Data Entrada 06/06/07 Analisado Reunião N°. 21ª reunião extraordinária.**

**Título** Efeito do extrato seco do Vitis Vinifera e Sinvastatina na redução de Placa Aterosclerótica Experimental em coelhos.

**Pesquisador responsável** Célio Fernando de Sousa Rodrigues.

**Instituição** FEJAL/CESMAC/FCBS

**II) Sumário do Projeto:**

**Resumo da Introdução, Justificativa e aspectos metodológicos:** Esta pesquisa visa verificar a eficácia do extrato seco do Vitis Vinifera comparada a Sinvastatina na redução da placa aterosclerótica em coelhos. Será analisado o comprometimento da diminuição da luz no vaso, através do preparo de lâminas histológicas das artérias. Os animais serão mantidos vivos em condições adequadas durante 100 dias, nesse período serão avaliados hematologicamente com 30, 60 e 90 dias do experimento. Após o tempo necessário para a avaliação (100 dias) todos os animais serão submetidos a eutanásia (Resolução nº. 714, art. 13 de junho de 2002) recomendada pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária.

**III - Comentários Éticos**

- Há justificativa para o número de animais utilizados.
- Há alojamento, nutrição e cuidados com os animais.
- É indicado o tempo de duração da pesquisa.
- Existe Veterinário responsável.
- Haverá sacrifício de animal com procedimento adequado: uso de anestesia.
- Riscos e Benefícios claros e incluídos na Metodologia.

**III) CONCLUSÃO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: APROVADO**

Nesta oportunidade, lembramos que o pesquisador tem o dever de durante a execução do experimento, manter o CEPA informado através do envio de relatório parcial e final acerca da pesquisa, bem como qualquer alteração ou interrupção da mesma. O não envio de, pelo menos, o relatório final da pesquisa, implicará em não recebimento de um próximo protocolo de pesquisa de vossa autoria.

Atenciosamente,

  
**Profª Cláudia Maria Linç Calheiros**  
 Coordenadora do CEP – FCBS – CESMAC

**Ilmo. Sr. Prof. Célio Fernando de Sousa Rodrigues**

APRL