

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Estudo de uma fração rica em compostos fenólicos  
provenientes de uvas da variedade bordô (*Vitis  
labrusca* L.), sobre o sistema cardiovascular:  
ênfoque na aterosclerose experimental

Elke Zuleika Schuldt

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Santa Catarina, como  
requisito à obtenção do título de Doutor em  
Farmacologia.

FLORIANÓPOLIS - SC

Junho de 2005

*Orientadora*

*Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau*

*Este tese foi realizada no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina e contou com o apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), na forma de uma bolsa de doutorado.*

Schuldt, Elke Zuleika. Estudo de uma fração rica em compostos fenólicos provenientes de uvas da variedade bordô (*Vitis labrusca* L.), sobre o sistema cardiovascular: enfoque na [aterosclerose] experimental. Florianópolis, 2005, .....f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Professora Doutora Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau.

Defesa: 08/06/2005.

O objetivo geral deste estudo foi investigar a atividade de uma fração rica em compostos fenólicos - Fração Acetato de Etila (FAE), obtida a partir do extrato bruto dealcoolizado de um [vinho] tinto catarinense, sobre o sistema cardiovascular de ratos *Wistar* normotensos e camundongos C57/BLACK6 com ablação gênica para o receptor de LDL (LDLR KO), submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica (DH). Foram realizados ensaios para determinar a atividade [antioxidante], experimentos de reatividade vascular, experimento crônico para verificar o efeito da FAE em camundongos LDLR KO submetidos a uma DH, dosagens bioquímicas de [colesterol] total, triglicerídeos, e lipoproteínas, cortes histológicos de arcos aórticos de camundongos LDLR KO para determinar a formação de [ateromas] e imunohistoquímica. Os resultados deste estudo demonstraram que a FAE apresenta alguns efeitos biológicos importantes: 1) atividade [antioxidante] *in vitro*; 2) atividade vasorelaxante sobre vasos de pequeno calibre, mais precisamente, sobre o leito arterial mesentérico de ratos; 3) efeito hipolipidemiante na menor dose utilizada (3 mg/kg); 4) Diminuição sobre a expressão dos marcadores CD40L e nitrotirosina (N-TYR). A diminuição da expressão dos referidos marcadores aterogênicos foi ao encontro de todos os demais resultados anteriores, confirmando as efetivas atividades antioxidantes, hipolipidemiantes e vasorelaxantes da FAE.

Palavras-chave: [vinho], [antioxidante], [ateromas], [colesterol], [aterosclerose].

O objetivo geral deste estudo foi investigar a atividade de uma fração rica em compostos fenólicos - Fração Acetato de Etila (FAE), obtida a partir do extrato bruto dealcoolizado de um vinho tinto catarinense, sobre o sistema cardiovascular de ratos *Wistar* normotensos e camundongos C57/BLACK6 com ablação gênica para o receptor de LDL (LDLR KO), submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica (DH).

Através da realização de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE - HPLC), os principais compostos presentes nas amostras de: um vinho tinto (VT) dealcoolizado proveniente de uvas (*Vitis labrusca* L.) da variedade Bordô; um vinho branco (VB) dealcoolizado proveniente de uvas (*Vitis labrusca* L.) da variedade Niágara Branca; um suco de uva (SU) proveniente de uvas (*Vitis labrusca* L.), da variedade Isabel e uma Fração extraída com o solvente acetato de etila (FAE), obtida a partir de VT, foram identificados. A partir da identificação dos diferentes compostos fenólicos presentes nas amostras, passamos a investigar a atividade antioxidante de VT, VB, SU e FAE. Foram realizados os ensaios do NBT (capacidade seqüestradora do radical ânion superóxido); ensaio da desoxirribose (capacidade seqüestradora do radical hidroxila) e o ensaio da peroxidação lipídica (capacidade seqüestradora do radical peroxila). Os resultados demonstraram que as amostras apresentam diferenças significativas em relação ao seu efeito antioxidante, obedecendo a seguinte ordem de atividade: FAE > VT > SU > VB.

A partir da obtenção dos cromatogramas bem como dos ensaios bioquímicos relacionados com a atividade antioxidante, selecionamos a FAE, a qual apresentou os melhores resultados, para os experimentos em vaso de condutância (aorta) e vasos de resistência (leito arterial mesentérico -LAM) de ratos. De acordo com os

resultados obtidos, a FAE apresenta uma atividade vasorelaxante sobre vasos de pequeno calibre, mais precisamente, sobre o LAM de ratos. Com relação ao mecanismo de ação da FAE, os resultados obtidos estabelecem uma relação direta entre o aumento da biodisponibilidade do NO e sua atuação sobre canais de potássio, com subsequente hiperpolarização das células lisas vasculares.

A partir dos resultados obtidos nos experimentos de reatividade vascular, investigamos o efeito da FAE sobre camundongos LDLR KO. Neste protocolo experimental, os animais foram divididos em sete grupos experimentais (CSD, CCD, SD+V, FAE 3, FAE 10, FAE 30 e CP), e avaliados de acordo com: 1) os parâmetros fisiológicos - peso e ingesta alimentar - dos camundongos LDLR KO, ao longo dos três meses de tratamento; 2) dosagens bioquímicas pela verificação dos níveis de colesterol total (CT), triacilgliceróis (TAG), e das lipoproteínas: lipoproteína de muita baixa densidade (*very low density lipoprotein* - VLDL); lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoprotein* - LDL) e lipoproteína de alta densidade (*high density lipoprotein* - HDL); 3) através de protocolos os quais avaliam a reatividade vascular, verificamos o efeito de um agonista  $\alpha$ -adrenérgico, a fenilefrina, bem como o efeito de um agonista colinérgico muscarínico, a acetilcolina, sobre a aorta dos camundongos LDLR KO, submetidos a DH e ao tratamento com a amostra de escolha (FAE); 4) a partir de cortes histológicos corados pelo método hematoxilina-eosina (HE), identificamos o índice de lesões dos diferentes grupos experimentais; 5) através de metodologia imunohistoquímica, verificamos a influência do tratamento crônico

da FAE, nas diferentes concentrações utilizadas, sobre os marcadores aterogênicos, CD40L e nitrotirosina (N-TYR).

De acordo com o tratamento crônico, a FAE demonstrou uma efetiva atividade hipolipidemiante na menor dose utilizada (3 mg/kg). Por outro lado, as maiores doses da FAE (10 e 30 mg/kg), não promoveram a mesma atividade, possivelmente devido a uma atividade pró-oxidante dos componentes da FAE. Com relação à imunohistoquímica, no grupo FAE 3, ocorreu uma significativa diminuição na expressão dos marcadores CD40L e, principalmente, N-TYR. A diminuição da expressão dos referidos marcadores aterogênicos vai ao encontro de todos os demais resultados anteriores, confirmando as efetivas atividades antioxidantes, hipolipidemiantes e vasorelaxantes da FAE.

Muitos estudos têm relatado que a associação de drogas redutoras do colesterol plasmático e substâncias antioxidantes, seja uma proposta lógica para a reversão de doenças de origem cardiovascular. Inúmeros trabalhos, das mais diversas fontes, têm ainda apontado os "produtos de origem natural", como efetivos promovedores de saúde e bem estar, sem mínimas contra-indicações. Neste contexto, visto se tratar de um produto de ampla comercialização e aceitação popular, o presente estudo pretendeu esclarecer alguns pontos relacionados às efetivas e reais atividades atribuídas aos compostos presentes na uva e vinho tinto.

\* \* \* \* \*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Doenças cardiovasculares - Histórico

O aumento da prevalência de casos de doenças cardiovasculares é bastante recente na história da humanidade, uma vez que tais patologias encontram-se diretamente relacionadas à modificações nos hábitos de vida dos indivíduos. No caso da hipertensão arterial, por exemplo, em sociedades mais primitivas, ou seja, grupos de indivíduos ainda não submetidos à alimentação industrializada como os Yanomames e Xavantes do Brasil, algumas populações de esquimós ou ainda os Zulus da África Central e nativos da Polinésia, não ocorrem registros dessa enfermidade (Neel *et al*, 1964; Oliver *et al*, 1975; Kurokawa, 2001).

O consumo de sal pelo homem teve início há cerca de 10.000 anos, quando o excesso de caça, alterações climáticas e o crescimento populacional resultaram na introdução da agricultura. A prática agrária desencadeou o aumento progressivo da produção de alimentos, bem como o desenvolvimento de técnicas para seu armazenamento (Catanozi *et al*, 2001). Um fato interessante é que o aumento da ingestão de sal ocorreu a partir da descoberta de que os alimentos eram melhor preservados quando mantidos em soluções salinas concentradas. Desde então, o homem utilizou e desenvolveu esta técnica de conservação até a Revolução Industrial e o surgimento do comércio agroindustrial, os quais geraram técnicas mais avançadas de conservação. (Leopold e Ardrey, 1972; Ealton e Konner, 1985).

Além da sociedade moderna ter ao longo de sua evolução, realizado importantes alterações em sua dieta alimentar, outros fatores, como o sedentarismo, o tabagismo, a obesidade e o diabetes – têm contribuído de forma considerável para a evolução das doenças de origem cardiovascular. Corrigir os fatores de risco como deixar de fumar, fazer exercício, adotar uma dieta adequada ou tomar medicação, tem melhorado muito o processo de evolução dessas doenças; a mudança no estilo de vida a partir da redução desses fatores de risco, além do tratamento farmacológico, têm sido, portanto, as grandes linhas de tratamento.

Por essas doenças serem muito frequentes e não produzirem sintomas em sua fase inicial, o diagnóstico precoce também é fundamental. Uma vez feito o diagnóstico, deve-se focalizar as possibilidades de tratamento e a correção, portanto, de estilos de vida impróprios. No entanto, em especial no caso da aterosclerose e da hipertensão arterial, tendo em vista que as alterações que ocorrem no início são bastante assintomáticas, é freqüente os pacientes não terem motivação para mudar o estilo de vida (Lemos da Luz, 2004).

## 1.2. Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial consiste em um evento de elevada prevalência na sociedade moderna. Esta patologia acomete cerca de 20% da população nos Estados Unidos e entre 10% e 15% da população mundial. A hipertensão arterial aumenta, consideravelmente, o risco de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC), insuficiência cardíaca congestiva, doença vascular periférica e insuficiência renal (Macmahon *et al*, 1990; Klag *et al*, 1996), estando, portanto, entre os principais fatores de risco para a doença cardiovascular (Ames, 1986; Crook, 2002).

O tratamento anti-hipertensivo reduz as complicações cardiovasculares, podendo diminuir o número de mortes decorrentes destas complicações, assim como melhorar a qualidade de vida dos pacientes (Psaty *et al*, 1997; Hansson, 1999). Por outro lado, em relação ao tratamento da hipertensão arterial realizado através da utilização de diuréticos ou beta-bloqueadores, tal procedimento tem sido associado à alteração do catabolismo da lipoproteína (LP) de muito baixa densidade (VLDL), contribuindo para o aumento da triacilglicerolemia e da colesterolemia, nos indivíduos tratados (Nilsson *et al*, 1977; Shwan *et al*, 1978; Catanozi *et al*, 2001). Esta modificação do perfil lipídico, muitas vezes tem sido considerada como possível atenuante do tratamento anti-hipertensivo sobre a prevenção da doença arterial coronariana (DAC) (Collins *et al*, 1990; Macmahon *et al*, 1990). Encontra-se portanto, bem definido na literatura que a hipercolesterolemia e a hipertriacilglicerolemia, associadas a baixa concentração de colesterol nas HDL, estão entre os principais fatores de risco para a DAC prematura e o desenvolvimento da aterosclerose (Kannel *et al*, 1971; Davignon e Cohn, 1996; Libby, 2001; Lind, 2003).

### 1.3. Aterosclerose

A aterosclerose é considerada uma das principais causas de mortalidade na população com estilo de vida ocidental (Libby, 2001), visto que desempenha um papel determinante no desenvolvimento de infarto do miocárdio, derrame cerebral, falência renal, gangrena, além de estar associada à perda de função nas extremidades (Libby, 2002; Lind, 2003).

A aterosclerose constitui-se numa das patologias mais estudadas nas últimas três décadas. No início da década de 70, acreditava-se que o simples acúmulo de lipídios nas paredes das artérias - estreitando o lúmen das mesmas e levando ao comprometimento do fluxo para os órgãos alvo - poderia ser a explicação mais plausível para o subsequente aparecimento de placas ateroscleróticas. Além disso, evidências clínicas apontavam uma direta relação entre a hipercolesterolemia e o aparecimento de ateromas nos pacientes (Kannel *et al*, 1971). No final dos anos 70, entretanto, verificou-se que não somente os lipídios, mas também determinados fatores de crescimento bem como a proliferação da musculatura lisa vascular propriamente dita, poderiam também desempenhar um papel coadjuvante na patogenia da doença. Finalmente na década de 90, a aterosclerose passou a ser estudada e reconhecida como uma distúrbio inflamatório crônico que pode ter componentes infecciosos ou auto-ímmunes (Yu *et al*, 2001; Libby, 2000; Lind, 2003).

Dentre os fatores de risco tradicionais relacionados à doença aterosclerótica podemos citar níveis séricos de colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL) maiores que 160 mg/dL, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica (PA > 140/90 mmHg), níveis séricos de colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL) menores que 40 mg/dL, diabetes *mellitus*, idade acima de 45 anos para homens e 55 para mulheres e história familiar precoce de aterosclerose (Santos, 2001).

#### 1.3.1. Patogenia da Aterosclerose

Os primeiros indícios de placa aterosclerótica começam a surgir muitos anos antes de qualquer manifestação clínica, o que dificulta a compreensão da natureza múltipla desse processo que não pode ser atribuído a apenas uma causa e parece envolver fatores tão diversos quanto ambientais, alimentares, genéticos e hemodinâmicos (Brown e Goldstein 1986; Ross, 1999; Libby, 2003).

O processo aterosclerótico é caracterizado por complexas séries de eventos e interações celulares que ocorrem durante a produção das lesões ateroscleróticas. A

formação de uma lesão aterosclerótica - o ateroma - ocorre primariamente pela passagem da lipoproteína de baixa densidade (LDL) através do endotélio arterial.

Isto ocorre em locais onde o endotélio encontra-se susceptível ou danificado, e muitos fatores podem resultar em disfunção endotelial, incluindo a oxidação da LDL (LDLox), forças físicas e químicas e infecções virais (Ross, 1999). Monócitos da circulação sanguínea aderem a estes sítios e penetram no espaço sub-endotelial, onde assumem a morfologia de macrófagos. Na seqüência, estas LDL oxidativamente modificadas são rapidamente captadas pelos macrófagos através de um receptor *scavenger*, levando ao acúmulo de ésteres de colesterol e formação das chamadas células espumosas - *foam cells* (Ross, 1999; Libby, 2000). As LDLox podem também danificar diretamente as células endoteliais e induzir as mesmas a produzirem fatores quimiotáticos que irão atrair mais monócitos circulantes. Com relação às células lisas vasculares, as células espumosas produzem fatores de crescimento que induzem a migração da musculatura lisa, da média para a íntima, levando à formação de uma lesão fibro-gordurosa. Em estágios subseqüentes, ocorre uma calcificação e, caso a fibrose continue, formar-se-à uma cobertura fibrosa cercada por um centro rico em lipídeos (Libby, 2002). Dependendo da estabilidade da lesão, esta poderá romper e formar um trombo o qual, ao se desprender, poderá ocluir total ou parcialmente o vaso sanguíneo; as consequências clínicas mais relevantes de todo este processo são o infarto do miocárdio e o derrame cerebral (Ross, 1999; Andreassi, 2003).

### 1.3.2. Aterosclerose e Marcadores Inflamatórios

1.3.2.1. CD40L: Pesquisas experimentais e evidências clínicas têm demonstrado que as placas de ateroma, características da doença vascular aterosclerótica, são consequência de uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas (Mach *et al*, 1999). Neste contexto, o receptor de membrana denominado CD40, bem como seu ligante, CD40L, desempenham um papel fundamental tanto na patogênese precoce da doença aterosclerótica como no desencadeamento dos fenômenos responsáveis pela ruptura da placa de ateroma, responsável pelas síndromes isquêmicas agudas (Herman *et al*, 2001).

O receptor de membrana CD40 foi inicialmente descrito em linfócitos B como parte crucial de um sistema de ativação e diferenciação dependente do contato com

o antígeno de membrana CD40L, presente em células T (Van Kooten e Banchereau, 2000). Posteriormente foi demonstrado que ambas as proteínas são expressas de maneira funcional dentro da placa aterosclerótica; estes achados despertaram um grande interesse sobre o papel da ligação CD40/CD40L na formação e subsequente ruptura da placa de ateroma (Mach *et al*, 1997).

A ativação da via de sinalização CD40/CD40L está envolvida na manutenção do processo inflamatório local, através da geração de citocinas (IL-1, IL-6), e aumento da expressão de moléculas de adesão, como a ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) e a VCAM-1 (*vascular adhesion cell molecule 1*). A ligação CD40/CD40L aumenta também a expressão e a atividade de MMP-1 (colagenase intersticial do tipo 1), MMP-2 (gelatinase), MMP-3 (estromelina 1) e MMP-9 (gelatinase B), tanto em células lisas vasculares como em macrófagos (Libby *et al*, 1999; Mach *et al*, 1997; Mach *et al*, 1999). A essa atividade aumentada das metaloproteinases, que leva a um maior risco de ruptura da placa de ateroma, soma-se o fato de que a ligação CD40/CD40L ocasiona aumento da expressão do fator tecidual em células endoteliais e vasculares (Mach *et al*, 1997). Em conjunto, a perda da integridade da placa e a expressão aumentada de proteínas pró-trombóticas, processos modulados pela via de sinalização CD40/CD40L, podem desencadear os fenômenos trombóticos agudos responsáveis pela isquemia tecidual. Dados experimentais e clínico-laboratoriais sugerem, portanto, que a via de sinalização CD40/CD40L é um dos mecanismos mais importantes no desencadeamento do processo inflamatório que culmina com a ruptura da placa de ateroma e conseqüente síndrome isquêmica aguda (Libby, 2000).

1.3.2.2. Nitrotirosina (N-TYR): Muitos estudos têm reportado que o óxido nítrico (NO) modula o tônus dos vasos através de mecanismos dependentes e independentes da formação de monofostato de guanosina cíclico (GMPc), no interior das células lisas vasculares ( Szilvassy *et al.*, 2001; Niu *et al.*, 2001) . De uma forma geral, no processo de formação das placas ateroscleróticas, a inibição crônica da produção de NO acelera o processo de formação de ateromas, enquanto que o aumento de sua concentração nos vasos pode suprimir o desenvolvimento da aterosclerose ou, ao menos, reduzir o índice de lesões (Cayette *et al.*, 1994; Naruse *et al.*, 1994). Várias pesquisas têm demonstrado que uma dieta rica em colesterol pode comprometer a sinalização NO-GMPc, devido a formação de espécies reativas

de oxigênio, como o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), formado a partir da reação entre o NO e o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ).

Em um experimento utilizando coelhos tratados com uma dieta hipercolesterolêmica, verificou-se que ocorre uma diminuição nos níveis de NO e GMPc, e um simultâneo aumento de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{ONOO}^-$ , levando a um quadro de hipertensão arterial (Szilvassy *et al.*, 2001). Em outro estudo realizado com camundongos *knockout* para a enzima óxido nítrico sintetase (eNOS $^{-/-}$ ) os pesquisadores demonstraram que a eNOS parece desempenhar um importante papel antiaterogênico. Por outro lado, durante um processo inflamatório, o alto fluxo de NO liberado a partir da ativação de uma forma induzida da NOS (iNOS) produz também, altas concentrações de  $\text{ONOO}^-$ , gerando nitrotirosina (N-TYR) (Niu *et al.*, 2001).

A N-TYR é um composto biomarcador de  $\text{ONOO}^-$ , sendo formado a partir da nitração de resíduos de tirosina de determinadas proteínas, como por exemplo, a apolipoproteína B-100 (apo B-100), encontrada nas LDLs. A exposição da LDL ao  $\text{ONOO}^-$  resulta na nitração dos resíduos de tirosina da apo B-100, promovendo subsequente a peroxidação lipídica da lipoproteína, além da depleção de antioxidantes lipossolúveis, como a vitamina E (Hazen *et al.*, 1999; Niu *et al.*, 2001). Neste contexto, estudos de imunohistoquímica e espectrometria de massa têm demonstrado que a N-TYR encontra-se significativamente aumentada em vasos ateroscleróticos humanos, bem como na LDL. De acordo com Hazen e colaboradores, em LDLs obtidas a partir de aortas ateroscleróticas humanas, a concentração de N-TYR é aproximadamente cem vezes maior do que em LDLs circulantes, obtidas de voluntários sadios (Hazen *et al.*, 1999).

### 1.3.3. Terapia Antioxidante

A hipótese de que a peroxidação lipídica desempenha importante papel na patogenia da aterosclerose, despertou crescente entusiasmo sobre a utilização de antioxidantes como agentes antiaterogênicos. Os antioxidantes mais investigados, tanto em animais como em humanos, têm sido a vitamina E), o beta-caroteno (precursor da vitamina A), o ácido ascórbico (vitamina C), e os flavonóides.

A vitamina E, cuja forma mais prevalente e ativa é o  $\alpha$ -tocoferol, é o antioxidante lipossolúvel predominante nos tecidos e na LDL. Estudos laboratoriais demonstraram que a vitamina E é um antioxidante extremamente potente,

responsável pela captura dos radicais peroxila, interrompendo a cadeia de peroxidação lipídica. Além disso, protege os lípides poliinsaturados da oxidação pelos radicais livres e parece ser essencial à proteção das lipoproteínas circulantes e ao funcionamento adequado das membranas celulares. Por outro lado, alguns estudos têm apontado que a suplementação através de dietas contendo vitaminas (particularmente a vitamina E), não estaria necessariamente relacionada a um retardo do processo aterosclerótico (Kritharides e Stocker, 2002). Acredita-se que isto ocorra porque o  $\alpha$ -tocoferol, além de ser um composto antioxidante, pode também exercer uma forte atividade pró-oxidante sobre as lipoproteínas (Bowry et al, 1995). Neste caso, os pesquisadores acreditam que uma dieta ideal seria aquela cujos componentes, além de exercerem a atividade antioxidante per se, fossem ainda capazes de proteger a oxidação do  $\alpha$ -tocoferol. Neste contexto, de acordo com um estudo feito por Stocker e O'Halloran, uma determinada fração enriquecida com componentes obtidos a partir do vinho, foi capaz de atenuar tanto a peroxidação do  $\alpha$ -tocoferol como também a peroxidação da LDL, *in vitro* (Stocker e O'Halloran, 2004). Este resultado é bastante importante, pois vai ao encontro de outros estudos, os quais afirmam que num quadro de aterosclerose avançada em humanos, grande parte da LDLox é gerada em função da presença do  $\alpha$ -tocoferol oxidado, muito embora os níveis de vitamina E oxidada não estejam significativamente elevados (Witting *et al*, 1999). Neste caso, acredita-se que a intervenção prévia utilizando agentes que são capazes de inibir a peroxidação lipídica mediada pelo  $\alpha$ -tocoferol, estariam, em última análise, inibindo também a oxidação da própria LDL na parede arterial (Witting *et al*, 1999).

Os flavonóides são compostos cuja estrutura química é formada por quinze átomos de carbono no seu núcleo básico, arranjados sob a configuração C6-C3-C6, com dois anéis aromáticos ligados por três unidades de carbono, as quais podem ou não formar um terceiro anel. Dentre os flavonóides mais pesquisados encontram-se a catequina, quercetina, e glabridina (Rice Evans, 1996; Aviram e Fuhrman, 2002).

Tendo em vista que os flavonóides são encontrados em diversos alimentos da dieta, como na maçã, brócolis, uva, chá e vinho tinto, a bioatividade destas substâncias passou a ser investigada por inúmeros pesquisadores, no mundo todo. O potencial benéfico dos componentes fenólicos, presentes estruturalmente nos flavonóides, esteve primariamente relacionado à sua capacidade em seqüestrar

espécies reativas de oxigênio (EROs) nos sistemas biológicos (Husain *et al*, 1987; Negre-Salvagyre e Salvagyre, 1992; Dragsted, 1993). No entanto, a vasta gama de pesquisas realizadas com estes compostos têm apontado inúmeros efeitos biológicos, os quais vão muito além desta atividade. Os principais efeitos promovidos pelos compostos fenólicos, relacionados com os objetivos do presente estudo, são:

- Atividade vasodilatadora: A partir de experimentos realizados com preparações isoladas de aorta torácica de ratos, muitos pesquisadores verificaram que determinados compostos fenólicos existentes em plantas utilizadas na medicina popular, sob a forma de chás, tinturas e alcoolaturas, são capazes de promover relaxamentos dependentes da presença do endotélio vascular (Fitzpatrick *et al*, 1995; Andriambelason *et al*, 1997; Waslawik *et al*, 1997; Schuldt *et al*, 2000). Os mecanismos de ação relacionados à esta atividade vão desde o aumento da meia-vida do óxido nítrico e maior atividade da enzima NOS, até ações sobre o influxo de cálcio transmembranário e inibição de fosfodiesterases.
- Ação antiinflamatória: Por inibirem a enzima ciclooxigenase, os compostos fenólicos podem atuar diminuindo a agregação plaquetária e, conseqüentemente, a formação de trombos (Pace-Asciak *et al*, 1996; Ruf *et al*, 1999; Dell'Agli *et al*, 2004).
- Ação moduladora sobre o sistema P450: Determinados extratos obtidos do vinho tinto assim como alguns compostos isolados são capazes de inibir a atividade das isoenzimas P450 2E1, 1A1 e 1A4, diminuindo em última análise, a formação de espécies reativas deletérias aos tecidos (Chun *et al*, 1999; Chan *et al*, 2000; Orellana *et al*, 2002).
- Atividade sobre a proliferação de células lisas vasculares: Compostos fenólicos obtidos a partir do vinho tinto, são capazes de inibir a proliferação de células lisas vasculares, bem como a síntese de endotelina 1 em células endoteliais de aorta bovina (Corder *et al*, 2001; Araim *et al*, 2002).
- Inibição da oxidação da LDL: Os compostos fenólicos são capazes de inibir a oxidação da LDL *in vitro* (Frankel *et al*, 1995; Frankel *et al*, 1998; Fuhrman *et al*, 2001; Fuhrman e Aviram, 2002) como também diminuir a formação de placas ateroscleróticas em coelhos e hamsters hipercolesterolêmicos (Silva *et al*, 1995;

Vinson *et al*, 2001) e ainda camundongos com ablação gênica para a apolipoproteína E (Stocker and O'Halloran, 2004).

#### 1.4. Modelos animais para o estudo da Aterosclerose

O fato da aterosclerose ser uma doença de evolução lenta e silenciosa, envolvendo múltiplos fatores de difícil controle em estudos clínicos, os quais geram resultados muitas vezes de interpretação complexa, criou a necessidade do desenvolvimento de modelos animais de experimentação (Fekete, 1993). De acordo com Vesselinovich (1988), o modelo ideal deve ser de fácil manuseio e manutenção, ter baixo custo, tamanho adequado, ser passível de viabilização em laboratório, possuir características genéticas definidas, guardar semelhanças anatômicas, fisiológicas e bioquímicas com o homem quanto a aspectos do processo patológico e desenvolver lesões com facilidade.

De acordo com estas premissas, a utilização de camundongos ou mesmo ratos, num protocolo de aterosclerose, é ideal, principalmente com relação ao espaço físico, manutenção e manuseio dos animais e tamanho da amostra. No entanto, com relação aos camundongos, pelo fato de o sistema metabólico ser bastante eficiente no que diz respeito a mobilização e metabolismo do colesterol, estes animais tendem a responder brandamente à dietas hipercolesterolêmicas, desenvolvendo somente discretas estrias gordurosas no arco aórtico (Paigen *et al*, 1987).

Em ratos, o aumento da ingestão de colesterol estimula a taxa de conversão deste esteróide a ácidos biliares, o que não ocorre em humanos (Catanozi *et al*, 2001). Estes determinantes metabólicos caracterizam maiores valores séricos de LDL colesterol no homem, enquanto o rato encontra-se entre os mamíferos que apresentam a menor concentração plasmática desta classe de LP. Dentro deste perfil fisiológico, os ratos, ao contrário do homem, dificilmente desenvolvem hipercolesterolemia (Catanozi *et al*, 2001).

Os camundongos *knockout* para o receptor de LDL, denominados LDLR KO, são obtidos a partir de recombinação homóloga de células tronco (*stem cells*) embrionárias para produção de camundongos com perda funcional dos genes para receptores de LDL. As partículas de VLDL e LDL, normalmente, competem por receptores hepáticos comuns, denominados receptores de LDL ou B/E, os quais reconhecem as apolipoproteínas B e E (apoB e apoE), presentes nestas lipoproteínas (Catanozi *et al*, 2003). Os camundongos LDL KO não possuem estes

receptores de LDL de alta afinidade, porém, apresentam os receptores de LDL de baixa afinidade. Desta forma, o prejuízo na taxa de remoção de VLDL, por meio dos receptores B/E, resulta em aumento de competição na taxa de captação com as partículas de LDL nos receptores de baixa afinidade (Ishibashi *et al*, 1994; Catanozi *et al*, 2003). Consequentemente, ambos os tipos de partículas (VLDL e LDL) podem apresentar suas concentrações plasmáticas simultaneamente aumentadas. Estes camundongos passam então a apresentar uma moderada hipercolesterolemia devido à ausência de receptores hepáticos suficientes para a captação de VLDL e LDL. No entanto, quando são alimentados com uma dieta rica em colesterol, eles tornam-se severamente hipercolesterolêmicos e desenvolvem aterosclerose aórtica e xantomas subcutâneos (Ishibashi *et al*, 1993; Ishibashi *et al*, 1994; Catanozi *et al*, 2003).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

O objetivo geral deste estudo foi investigar a atividade de uma fração rica em compostos fenólicos - Fração Acetato de Etila (FAE), obtida a partir do extrato bruto dealcoolizado de um vinho tinto catarinense (VT), sobre o sistema cardiovascular de ratos *Wistar* normotensos e camundongos C57/BLACK6 com ablação gênica para o receptor de LDL (LDLR KO) submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica.

### 2.2. Específicos

2.2.1. Identificar , através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE - HPLC), os principais compostos presentes em amostras de:

- um vinho tinto (VT) dealcoolizado proveniente de uvas catarinenses (*Vitis labrusca* L.) da variedade Bordô;
- um vinho branco (VB) dealcoolizado proveniente de uvas catarinenses (*Vitis labrusca* L.) da variedade Niágara Branca;
- um suco de uva (SU) proveniente de uvas catarinenses (*Vitis labrusca* L.), da variedade Isabel;
- uma Fração extraída com o solvente acetato de etila (FAE), obtida a partir de VT.

2.2.2. A partir dos resultados obtidos através do HPLC, verificar a atividade antioxidante das amostras, através dos respectivos ensaios:

- ensaio do NBT (capacidade seqüestradora do radical ânion superóxido);
- ensaio da desoxirribose (capacidade seqüestradora do radical hidroxila);
- ensaio da peroxidação lipídica (capacidade seqüestradora do radical peroxila).

2.2.3. Com os cromatogramas obtidos e a partir dos ensaios bioquímicos relacionados com a atividade antioxidante, selecionar a amostra que apresentou os melhores resultados, para os experimentos em vaso de condutância (aorta) e vasos de resistência (leito arterial mesentérico);

2.2.4. A partir dos resultados obtidos nos experimentos de reatividade vascular, verificar o efeito da FAE nos protocolos com camundongos LDLR KO:

2.2.4.1. Realizar um experimento crônico com camundongos LDLR KO durante um período de três meses. Submeter os animais a uma dieta hipercolesterolêmica e a um tratamento com diferentes concentrações da amostra de escolha. A partir deste protocolo experimental, avaliar:

- os parâmetros fisiológicos - peso e ingesta alimentar - dos camundongos LDLR KO, ao longo dos três meses de tratamento;
- com a coleta do soro dos animais, realizar dosagens bioquímicas verificando os níveis de colesterol total (CT), triacilgliceróis (TAG), e das lipoproteínas:

lipoproteína de muita baixa densidade (*very low density lipoprotein* - VLDL);  
lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoprotein* - LDL) e lipoproteína de alta densidade (*high density lipoprotein* - HDL);

Através de protocolos os quais avaliam a reatividade vascular, verificar o efeito de um agonista  $\alpha$ -adrenérgico, a fenilefrina, bem como o efeito de um agonista colinérgico muscarínico, a acetilcolina, sobre a aorta dos camundongos LDLR KO, submetidos a dieta hipercolesterolêmica e ao tratamento com a amostra de escolha;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais

3.1.1. Animais: Para o ensaio da peroxidação lipídica e os protocolos envolvendo preparações isoladas de aorta torácica e leito arterial mesentérico, foram utilizados ratos albinos Wistar, machos, normotensos pesando entre 200 e 300g. Todos os animais foram alojados em gaiolas plásticas, mantidos em temperatura ambiente controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo dieta comercial e água *ad libitum*. No ensaio da peroxidação lipídica, os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas antes da retirada do fígado dos mesmos, para a subsequente preparação dos homogenatos.

Nos protocolos onde foi verificada a atividade da FAE em animais hiperlipidêmicos, foram utilizados camundongos (LDLR KO) machos C57BL/6 (com ablação gênica para receptores de lipoproteína de baixa densidade - *LDLR<sup>-/-</sup> mice*), com 8 a 10 semanas, pesando cerca de 20-25g, alojados em gaiolas plásticas (máximo de 06 animais por gaiola) e mantidos em temperatura ambiente controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com ciclo claro/escuro de 12 horas.

Os camundongos LDLR KO foram gentilmente cedidos pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob a interveniência do Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza. Os animais foram originalmente adquiridos da The Jackson Laboratory (600 Main Street, Bar Harbor, Maine 04609-1500). Todos os experimentos realizados com animais foram conduzidos conforme as diretrizes estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), de

acordo com os protocolos 091/CEUA - 23080.001729/2001-45/UFSC e 264/CEUA - 23080.003548/2004-04/UFSC.

### 3.1.2. Drogas

Os kits enzimáticos para as dosagens do colesterol total (CT) e triacilglicerol (TAG) foram obtidos, respectivamente, da MERCK (Darmstadt, Alemanha) e ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim, Alemanha). A dosagem de LP foi realizada com o kit enzimático da DADE BEHRING (Newark, EUA). Os compostos padrão bem como os reagentes da fase móvel da análise feita por HPLC foram adquiridos das empresas SIGMA e TEDIABRAZIL, respectivamente.

O peróxido de hidrogênio foi adquirido da QUIMEX. O ácido clorídrico (HCl), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), foram adquiridos da empresa NUCLEAR. A glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), da MERCK. O gel de congelamento (*Tissue Freezing Medium*) - foi adquirido da Jung/Leica Instruments GmbH (Alemanha).

Os anticorpos primários, CD40L (*rabbit polyclonal antibody CD 154*) e anti-nitrotirosina (*rabbit anti-nitrotyrosine antibody N-409*) foram adquiridos das empresas Santa Cruz Biotechnology e Sigma, respectivamente. O cromógeno diaminobencidina (DAB) e o soro albumina bovina (BSA), foram adquiridos, respectivamente, da Sigma e Boehringer Ingelheim Bioproducts. O anticorpo secundário foi adquirido da Vector Laboratories (CA, EUA).

Todas as demais substâncias relacionadas a seguir foram adquiridas da SIGMA: fenilefrina, acetilcolina, indometacina, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido cinâmico, quercetina, ácido protocatêico, ácido *p*-cumárico, ácido *m*-cumárico, hidroquinona, *trans*-resveratrol, epicatequina, dimetil sulfoxido (DMSO), ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), manitol, butil-hidróxi-tolueno (BHT), *t*-butil-peróxido, desoxirribose, cloreto férrico, ácido nitrilotriacético (NTA), enzima superóxido dismutase, fenazina metasulfato, difosfato de nicotinamida e *nitro blue tetrazolium* (NBT).

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Seleção das amostras dos vinhos e preparação dos extratos:

3.2.1.1. Os estudos foram conduzidos utilizando-se amostras (750 mL), de vinho tinto (uvas da variedade Bordô - *Vitis labrusca* L.), vinho branco (uvas da variedade Niágara Branca - *Vitis labrusca* L.) e suco de uva (uvas da variedade Isabel; *Vitis labrusca* L., provenientes do Vale do Rio do Peixe, município de Tangará - Santa Catarina/Safra 2000. As garrafas foram mantidas ao abrigo da luz, sob temperatura de 20 a 22°C e, após aberta, a atmosfera interna foi substituída por N<sub>2</sub>.

3.2.1.2. O volume total de cada garrafa de vinho tinto e branco (750 mL), foi aliquotado em duas partes, transferindo-se as amostras para um evaporador rotatório para a remoção do componente etanólico (EtOH). A destilação fracionada

foi realizada sob condições de vácuo parcial e temperatura de 80-85°C, durante 2,5 horas/amostra. Ao final deste período, o resíduo foi coletado, determinando-se o volume final deste em proveta graduada; a concentração de etanol (graus GL) foi determinada com o auxílio de um alcoômetro.

3.2.1.3. Para os ensaios cromatográficos, o resíduo obtido foi dissolvido em 5,0 mL de metanol:clorofórmio (1:1) e acondicionado a -20°C, até o momento das análises (Maraschin *et al*, 2000).

3.2.1.4. Visto que os protocolos bioquímicos e farmacológicos não podem ser realizados na presença de quaisquer solventes, foi necessário determinar o teor de matéria seca do resíduo obtido. Para isso, 10 mL do resíduo foram transferidos para placas de Petri e mantidos em estufa ( $\cong$  60°C) até peso constante. O valor de matéria seca foi calculado tendo por base os valores do peso fresco do conjunto (amostra + placa Petri) e os valores obtidos do peso seco deste. A partir destes valores, calculou-se a média do peso fresco/mL da amostra deacoolizada, utilizando-se duas repetições para tal.

3.2.1.5. Os extratos brutos obtidos através da ressuspensão da matéria seca em água deionizada passaram a ser denominados de VT, para o extrato dealcoolizado obtido a partir do vinho tinto e VB, para o extrato dealcoolizado obtido a partir do vinho branco.

3.2.1.6. Para extração dos compostos (poli)fenólicos de VT, 100 mL de amostra foram adicionados a igual volume de acetato de etila (AcEtOH), e incubados durante 24 horas, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A partir deste procedimento, a fase orgânica foi coletada e o AcEtOH foi removido por evaporação, utilizando-se um fluxo de N<sub>2</sub>. A matéria seca desta fração foi obtida realizando-se os mesmos procedimentos descritos no item 3.2.1.4. A fração acetato de etila, obtida através da ressuspensão da matéria seca em água deionizada, passou a ser denominada de FAE.

3.2.1.7. A amostra do suco de uva (SU) foi obtida por secagem de 450 mL de suco concentrado, sendo que para a realização dos ensaios bioquímicos, o resíduo de SU também foi ressuspendido em água deionizada.

3.2.1.8. Todas as amostras obtidas - VT, VB, SU e FAE - foram mantidas em freezer, à -20°C, sob o abrigo da luz, até a realização dos procedimentos bioquímicos e farmacológicos.

### 3.2.2. Ensaio Cromatográfico

#### 3.2.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE):

A análise dos compostos (poli)fenólicos via CLAE foi realizada através da injeção de amostras de 10 µL em cromatógrafo Shimadzu LC-10, equipado com uma coluna de fase reversa (Shim-pack C<sub>18</sub>, 4,6 mm Ø x 25 cm comprimento) e detector

UV-visível (Shimadzu SPD 10A, 280 nm e 306 nm). A fase móvel utilizada foi H<sub>2</sub>O:AcOH:*n*-BuOH (350:1:10, v/v/v), com fluxo contínuo de 0,8 mL/min. Para a análise quantitativa dos componentes, foi realizada uma curva de calibração, utilizando-se como padrão ácido gálico (1,0 a 100,0 µg/mL).

3.2.2.2. Os itens 3.2.1 e 3.2.2. foram realizados no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal - Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina, sob supervisão do Prof. Dr. Marcelo Maraschin.

### 3.2.3. *Estudo da Atividade Antioxidante*

3.2.3.1. Ensaio do NBT (capacidade seqüestradora do radical ânion superóxido):

O sistema gerador de EROs utilizado para detecção da capacidade seqüestradora de radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) foi realizado segundo Robak & Gryglewski (1988). Para avaliar a capacidade sequestradora de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> foi utilizado o sistema gerador de radical ânion superóxido NADH-metassulfato de fenazina onde foi acrescentado ao meio de reação uma substância que reage com o O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, o NBT, formando um produto corado que pode ser avaliado espectrofotometricamente a 560 nm.

O meio de incubação deste ensaio consistiu de fenazina-metasulfato (10 µM), nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH, 78 µM) e *nitro blue tetrazolium* (NBT, 25 µM) em tampão fosfato ( 0,1 M; pH 7,4). A enzima superóxido dismutase (SOD; 100U/mL) também foi utilizada neste ensaio como controle positivo. Após dois minutos de incubação à temperatura ambiente, a reação foi interrompida adicionando-

se aos tubos teste, HCl 0,01 N. a leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 560 nm contra um branco o qual não continha fenazina metassulfato. Tomou-se como 100% da redução do NBT, a reação sem a presença de VT, VB, FAE e SU.

3.2.3.2. Ensaio da degradação da desoxirribose (capacidade seqüestradora do radical  $\cdot\text{OH}$ ):

O sistema gerador de EROs (radical  $\cdot\text{OH}$ ) utilizado para detecção de danos oxidativos à desoxirribose foi realizado de acordo com Nishida e colaboradores (1991). A detecção dos produtos oxidados (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS) foi realizada como descrita em Halliwell e Gutteridge (1981).

De acordo com este protocolo, o radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) é gerado através da reação de Fenton:  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$ . O radical uma vez gerado, oxida a desoxirribose e os produtos desta oxidação (TBARS), reagem subseqüentemente com o TBA (ácido tiobarbitúrico), formando um produto corado, que pode ser medido espectrofotometricamente a 532 nm. Da mesma forma como ocorre no ensaio anterior, quanto maior a capacidade antioxidante do composto testado, menor é a intensidade da cor.

Os ensaios foram realizados em triplicatas, num volume final de 1,2 mL. Inicialmente foi realizada uma pré incubação de 25  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque de  $\text{FeCl}_3$  (25  $\mu\text{M}$ ) com 100  $\mu\text{L}$  da solução estoque de NTA (ácido nitrilotriacético; 100

$\mu\text{M}$ ), por 10 minutos à temperatura ambiente, para formação do quelato. Posteriormente foi adicionado água deionizada (volume necessário para 1,2 mL), 150  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato (0,01 M), 100  $\mu\text{L}$  de solução de desoxirribose (2,8 mM) e finalmente, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,4 mM). Os tubos foram incubados por 20 minutos em banho maria a 37°C. Ao final da incubação foi realizada a reação com o TBA (reagente de cor), onde foram adicionados aos tubos, 1 mL da solução de TBA 1% e 1 mL de ácido tricloroacético (acidificante do meio) a 2,8 %.

Os tubos foram incubadas por mais 15 minutos à temperatura de 100°C para a formação de pigmento e, ao final deste tempo, resfriados imediatamente em banho de gelo. A absorvância das amostras foi medida em espectrofotômetro visível a 532 nm à temperatura ambiente, contra um branco contendo todos os reagentes, com exceção da desoxirribose. Nos tubos contendo as amostras, foi adicionado 240 mL das diluições dos mesmos ao meio de reação, antes da adição do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A absorvância de cada ensaio foi medida contra um branco específico, contendo a mesma concentração de VT, VB, FAE e SU. O manitol (250mM) foi utilizado paralelamente como controle positivo dos ensaios. Os resultados forma expressos em valores percentuais, considerando-se os valores médios da absorvância dos controles como 100% da degradação da desoxirribose.

3.2.3.3. Ensaio da peroxidação lipídica (capacidade seqüestradora do radical  $\text{LOO}\cdot$ ):

Neste ensaio, para a verificação da capacidade seqüestradora de VT, VB, Fae e SU sobre biomoléculas, foi utilizado homogenato de fígado de ratos, de acordo com Chen e Tappel (1996).

Neste sistema, a peroxidação lipídica foi induzida pelo peróxido de *t*-butila. Os reagentes foram adicionados na seguinte ordem: 10 mM de tampão fosfato ( $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$ ) pH 7,4; diferentes concentrações de VT, VB, SU e FAE (0,03 a 1,0  $\mu$ g/mL), ou BHT (10mM; controle positivo), homogenato (150  $\mu$ L; concentração de proteínas = 179.31 mg/mL) e 100  $\mu$ M de peróxido de *t*-butila. Esta mistura foi incubada a 37°C a temperatura ambiente, por um período de 2 horas. Após este período, 1 mL de TBA (1%) e 1 mL de TCA (2,8%) foram adicionados aos tubos e aquecidos a uma temperatura de 100°C por 15 minutos. Após a retirada do precipitado por centrifugação, a quantidade de TBARs foi mensurada através de leitura em espectrofotômetro a 532 nm.

3.2.4. Protocolos Experimentais Farmacológicos - Reatividade Vascular em ratos *Wistar normotensos*:

3.2.4.1. Preparações isoladas de aorta torácica:

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical seguido de exsanguinação feita pela secção da artéria carótida. Após a abertura da cavidade torácica, a aorta foi delicadamente removida e transferida para uma placa de Petri contendo solução fisiológica específica para este tipo de preparação, retirando-se os tecidos adiposos e conectivos adjacentes (Andriambeloson *et al*, 1997).

O vaso foi seccionado na forma de anéis de 3 - 4 mm de comprimento, os quais foram transferidos para cubas de vidro com volume total de 5,0 mL de solução de Krebs-Henseleit, de acordo com a seguinte composição (mM): NaCl 118; KCl 4,7;

CaCl<sub>2</sub> 2,5; MgSO<sub>4</sub> 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,9; NaHCO<sub>3</sub> 25; glicose 11. A solução nutriente foi mantida à 37°C, pH 7,4 e aerada com uma mistura de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. Duas hastes metálicas foram inseridas na luz dos mesmos, sendo uma delas adaptada a um transdutor de tensão isométrica acoplado a um software de aquisição de dados da marca Soft and Solutions. A tensão de repouso das preparações correspondeu a 1,0 g e a solução nutriente foi substituída a cada 15 minutos.

Após o período de equilíbrio (60 minutos) as preparações foram contraídas com fenilefrina (1,0 - 3,0 μM) para verificar a capacidade contrátil das mesmas. A presença do endotélio funcional foi avaliada pela capacidade da acetilcolina (ACh, 1μM) induzir ao relaxamento das preparações contraídas previamente com fenilefrina. Somente as preparações que apresentaram relaxamento igual ou superior a 75% foram consideradas com endotélio íntegro.

Após a realização do teste da integridade do endotélio, as preparações foram lavadas com solução fisiológica e mantidas em repouso por 30 minutos, sendo a solução nutriente substituída a cada 10 minutos. Passado o período de 30 minutos, as preparações foram novamente contraídas com fenilefrina (1,0 - 3,0 μM) e foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas (CCRc), à FAE (0,1 - 3000,0 μg/mL).

#### 3.2.4.2. Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM):

Os ratos foram anestesiados com uma mistura de quetamina (Francotar®) e cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompum®) e, em seguida à laparotomia, o leito mesentérico foi estendido para o exterior da cavidade abdominal e envolto com gaze umedecida com solução de Krebs. Em seguida, os ramos pancreático duodenal, íleo-cólico e cólico direito da artéria mesentérica superior foram ligados e seccionados. A artéria mesentérica superior foi isolada na sua origem, à

altura da aorta abdominal e canulada com um tubo de polietileno (PE50), de aproximadamente 4 cm de comprimento, preenchida com solução de Krebs heparinizada. Em seguida, os animais foram sacrificados por meio de rompimento do diafragma e o leito arterial mesentérico (LAM) foi removido. O intestino delgado foi então separado do LAM, cortando-se rente a borda intestinal, e a preparação foi perfundida com solução de Krebs (g/L): NaCl (6,9); KCl (0,35); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,44); MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,29); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,16); NaHCO<sub>3</sub>(2,1g); glicose (2,0).

#### 3.2.4.3. Medida da pressão de perfusão do LAM:

Após o isolamento, a preparação foi colocada em uma cuba (volume de 10 mL) e constantemente perfundida por meio de uma cânula inserida na artéria mesentérica superior que foi conectada a uma bomba peristáltica. A solução de Krebs, mantida a 37<sup>0</sup>C e areada com uma mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> ), foi infundida à velocidade de 4mL/min e a pressão de perfusão registrada continuamente em um computador PC, por um equipamento de análise de pressão

arterial Digi-Med (Modelo 190, NY, EUA), conectado a um software de integração Digi-Med (Modelo 200) em um sistema operacional Windows 95™ (Microsoft Corporation, EUA).

Os experimentos foram precedidos de um período de 30 minutos de estabilização da preparação, durante o qual a pressão de perfusão basal permaneceu entre 10 a 15 mmHg. Após o período de estabilização, em um dos béquers contendo a solução de Krebs, foi adicionado o agonista adrenérgico - fenilefrina, à preparação (solução mãe = 1 mg/mL), em concentração suficiente para que a pressão de perfusão se mantivesse estável, em torno de 70 - 80 mmHg.

Nos experimentos onde foi utilizado Krebs-despolarizante, não se fez necessária a utilização da fenilefrina para promover a contração do LAM e respectiva PP em torno de 70 - 80 mmHg; a própria solução despolarizante, devido a alta concentração de  $K^+$ , tem a propriedade de contrair a preparação.

Foram realizadas curvas concentração-resposta (CCR) de relaxamento ao VT e à FAE (30 – 3000  $\mu$ g), e também aos compostos majoritários (1 nmol - 3  $\mu$ mol), detectados em maior concentração no HPLC da FAE: ácido gálico, ácido cinâmico, ácido clorogênico, quercetina e resveratrol. Visto que o modelo empregado em nosso estudo é um sistema de perfusão aberto, as diferentes concentrações de VT, FAE e compostos isolados utilizadas nos experimentos, foram injetadas em doses isoladas, *in bolus*, em volumes de 100  $\mu$ L, por meio de uma seringa de insulina.

Para investigar a influência da FAE nos diferentes processos de vasodilatação, foram utilizadas as seguintes drogas: N $\omega$ -nitro-L-arginina (L-NOARG 100  $\mu$ M; inibidor da enzima óxido nítrico sintase - NOS), 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3- $\alpha$ ] quinoxalin (ODQ 10  $\mu$ M; inibidor da enzima guanilato ciclase do tipo solúvel - GC); glibenclamida (GLI 100  $\mu$ M; inibidor de canais de  $K^+$  dependentes de ATP), ouabaína (OUA 100  $\mu$ M;

inibidor da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase), tetraetilamônio (TEA 500  $\mu\text{M}$ ; inibidor não seletivo de canais de  $\text{K}^+$ ), cloreto de bário ( $\text{BaCl}_2$  100  $\mu\text{M}$ ; inibidor de canais de potássio retificadores para influxo -  $\text{K}_{\text{IR}}$ ); Charibdotoxina (ChTx 10 nM; inibidor não-seletivo de canais de potássio ativados pelo cálcio, de média e alta condutância -  $\text{K}_{\text{ca}}$ ) e Apamina (100nM; inibidor seletivo de canais de potássio ativados pelo cálcio, de baixa condutância). Todas estas drogas foram dissolvidas em solução fisiológica de Krebs, em volume final suficiente para a realização de uma CCR de relaxamento à FAE. As soluções de Krebs despolarizante ou Krebs+droga só foram perfundidas após o período de estabilização da preparação. Durante a estabilização, o LAM foi perfundido somente com o líquido de Krebs.

Para verificar o efeito da acetilcolina na ausência e na presença de Krebs despolarizante ou Krebs+droga, após a contração induzida pela fenilefrina, foi injetado um volume de 20  $\mu\text{L}$  de uma solução 10 mM (*in bolus*), do referido agonista.

### 3.2.5. Protocolos experimentais realizados com camundongos LDLR KO

#### 3.2.5.1. Tratamento dos Animais:

Camundongos machos LDLR KO foram separados em sete diferentes grupos e submetidos a um tratamento crônico por um período de três meses, de acordo com a tabela a seguir:

Tabela 1: Diferentes Grupos Experimentais do tratamento crônico dos camundongos LDLR KO

Nome do Grupo Experimental	Detalhamento da dieta/dia fornecida de acordo com o peso semanal dos animais
<i>CSD</i> (N = 5)	Dieta padrão e água destilada <i>ad libitum</i> + água destilada (v.o.), por gavagem
<i>CCD</i> (N = 5)	Dieta hipercolesterolêmica* e água destilada <i>ad libitum</i> + água destilada (v.o.), por gavagem
<i>SD + FAE</i> (N = 5)	Dieta padrão e água destilada <i>ad libitum</i> + FAE 30 mg/kg (v.o.), por gavagem
<i>FAE 3</i> (N = 6)	Dieta hipercolesterolêmica* e água destilada <i>ad libitum</i> + FAE 3 mg/kg (v.o.), por gavagem
<i>FAE 10</i> (N = 6)	Dieta hipercolesterolêmica* e água destilada <i>ad libitum</i> + FAE 10 mg/kg (v.o.), por gavagem
<i>FAE 30</i> (N = 6)	Dieta hipercolesterolêmica* e água destilada <i>ad libitum</i> + FAE 30 mg/kg (v.o.), por gavagem
<i>CP</i> (N = 5)	Dieta hipercolesterolêmica* e água destilada <i>ad libitum</i> + sinvastatina 1 mg/kg (v.o. controle positivo), por gavagem.

A dieta hipercolesterolêmica\* foi desenvolvida pelo ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos - da Unicamp/SP, sob supervisão da Dr<sup>a</sup> Nádia Fátima G. P. Dias. A dieta hipercolesterolêmica consistiu dos seguintes nutrientes, a saber: 1.25 % colesterol, contendo os seguintes nutrientes (g/100 g): caseína (20,4);

dextrina (11,3); bitartarato de colina (0,25); sacarose (10,0); amido de milho (27,0); óleo de soja (20,0), minerais e vitaminas. A dieta, fornecida pelo ITAL na forma liofilizada, foi misturada com água destilada em quantidade suficiente para a confecção manual de *pellets*, os quais foram devidamente armazenados no interior de caixas plásticas sob temperatura de - 20°C. Todos os grupos de camundongos LDLR KO receberam a dieta (padrão ou hipercolesterolêmica) durante o período de três meses.

#### 3.2.5.2. Cálculo das doses de FAE administradas aos camundongos LDLR KO:

As doses de 3, 10 e 30 mg por Kg de peso foram calculadas considerando-se os parâmetros farmacocinéticos homem/camundongo, a qual estabelece que o metabolismo do camundongo é cerca de 10 (dez) vezes mais rápido em relação ao metabolismo humano.

A partir da obtenção do rendimento da FAE (500 mg/garrafa de 750 mL de vinho total), realizou-se inicialmente o cálculo da concentração da FAE em um volume de 100 mL (volume que corresponde aproximadamente a uma taça de vinho tinto).

De acordo com o cálculo acima citado, a ingestão diária de FAE, para um homem de aproximadamente 70 Kg, corresponde a cerca de 70 mg/dia, ou ainda, 1 mg por kg de peso corporal. Tendo em vista que o metabolismo de camundongos é mais acelerado que o metabolismo humano:  $1(\text{mg/kg}) \times 10$  (fator de correção farmacocinético) = 10 mg. A dose intermediária (10 mg/kg), administrada aos LDLR KO, corresponde, portanto, a uma ingestão diária de FAE (70 mg/dia/homem).

Desta forma, a dose de 3 mg/kg corresponde a cerca de um terço da dose intermediária e a maior dose, 30 mg/kg, a três vezes o valor da mesma dose.

#### 3.2.5.3. Parâmetros Fisiológicos - Peso e Ingesta Alimentar:

Os animais LDLR KO foram avaliados de acordo com a ingesta alimentar diária e o peso semanal. O volume das soluções que foram administradas por gavagem (água destilada, FAE ou sinvastatina), foram ajustados de acordo com a variação de peso semanal dos animais. A ingesta alimentar foi verificada diariamente, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Ração fornecida ao grupo (g)} - \text{Ração que sobrou no dia seguinte} = \\ \text{Valor obtido} \div \text{"N" do grupo} = \text{Média da ingesta alimentar diária.}$$

#### 3.2.5.4. Ensaio Bioquímicos - Dosagem de Lipoproteínas (VLDL, LDL, HDL), colesterol total (CT), e triacilglicerol (TAG):

Os níveis de colesterol total (CT), lipoproteínas (VLDL, LDL e HDL) e ainda o triacilglicerol (TAG) foram mensurados através de ensaios enzimáticos descritos no item 3.1.2. Após os três meses de tratamento, foram retirados cerca de 0,4 a 0,6 mL de sangue total de cada camundongo previamente anestesiado, via punção da veia cava. Após a centrifugação do sangue (3000 rpm; 10 minutos), foram obtidas amostras de soro num volume de aproximadamente 0,3 mL, as quais foram devidamente aliquotadas em eppendorfes e armazenadas até a data das análises, sob temperatura de - 70°C. O aparelho Dade Behring (Dimension - AR), foi utilizado para a análise do soro. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises

Clínicas do Hospital Universitário da UFSC, sob supervisão da farmacêutica bioquímica Elisabeth Martins Hermes.

#### 3.2.5.5. Reatividade Vascular: Preparações isoladas de aorta torácica:

Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de quetamina (Francotar®) e cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompum®). Em seguida à laparotomia, à retirada do sangue e à separação do coração e arco aórtico, a aorta foi delicadamente removida e transferida para uma placa de Petri contendo solução fisiológica, retirando-se os tecidos adiposos e conectivos adjacentes (Andriambelason *et al*, 1997).

O vaso foi seccionado na forma de anéis de 2 mm de comprimento, os quais foram transferidos para cubas de vidro com volume total de 5 mL de solução de Krebs-Henseleit, de acordo com a seguinte composição (mM): NaCl 118; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 2,5; MgSO<sub>4</sub> 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,9; NaHCO<sub>3</sub> 25; glicose 11. A solução nutriente foi mantida à 37°C, pH 7,4 e aerada com uma mistura de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. Duas hastas metálicas foram inseridas na luz dos mesmos, sendo uma delas adaptada a um transdutor de tensão isométrica acoplado a um sistema de aquisição de dados Kitcad, da marca *Soft and Solutions*. A tensão de repouso das preparações correspondeu a 0,5 g e a solução nutriente foi substituída a cada 15 minutos. Uma vez que a aorta de camundongo é menos responsiva do que a aorta de rato, durante o procedimento de lavagem das preparações, foi adicionado fenilefrina (1µM) às cubas, de forma intercalar, no sentido de estimular levemente as

preparações. Nas duas lavagens que antecederam o início do experimento, nenhuma droga foi adicionada ao banho.

Após o período de equilíbrio de 90 minutos, foram realizadas curvas concentração-resposta (CCR) ao agonista  $\alpha$ -adrenérgico - fenilefrina (1 nM - 3  $\mu$ M) e, subseqüentemente à obtenção do efeito máximo desse agonista, procedeu-se a CCR ao agonista muscarínico - acetilcolina (1 nM - 3  $\mu$ M).

### 3.3. Apresentação dos resultados e análise estatística:

Nos ensaios bioquímicos realizados para determinar a atividade antioxidante das amostras, os resultados foram expressos em porcentagem  $\pm$  EPM, considerando-se 100% os valores médios da absorbância dos controles.

Os relaxamentos induzidos pelo VT e FAE no LAM, foram apresentados como porcentagem de relaxamento em relação à contração máxima induzida pela fenilefrina.

Nos experimentos de reatividade vascular com camundongos LDLR KO, os efeitos induzidos pela fenilefrina e pela acetilcolina, foram expressos pelos respectivos valores de contração e relaxamentos promovidos pelos agonistas, em gramas. As  $CI_{50}$  (concentrações inibitórias que promoveram 50% dos relaxamentos máximos obtidos) e as  $CE_{50}$  (concentrações efetivas que promoveram 50% da contração máxima do agonista), foram apresentadas como médias geométricas, acompanhadas de seus respectivos limites de confiança para 95% (Fleming *et al*, 1972). Os relaxamentos máximos ( $R_{máx}$ ) e as contrações máximas ( $E_{máx}$ ) foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Nas dosagens bioquímicas (CT, TAG e LPs), os resultados foram expressos em mg/dL.

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o teste *t* de Student para amostras não pareadas (Snedecor e Cochran, 1967), ou a análise de variância (ANOVA), seguida pelos testes de Dunnett ou Tukey como ANOVA-*post test*, para experimentos com mais de duas amostras. As diferenças ponto-a-ponto entre os valores experimentais obtidos com diferentes grupos, que apresentaram níveis de probabilidade iguais ou menores do que 5 % ( $p < 0,05$ ), foram consideradas estatisticamente significantes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Ensaio Bioquímicos

#### 4.1.1. Ensaio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - HPLC):

Todos os compostos fenólicos que foram investigados neste ensaio estão relacionados na Tabela 2. De acordo com a referida tabela, os ácidos cinâmico e clorogênico foram encontrados em todas as amostras analisadas, ambos em altas concentrações, principalmente na FAE. As amostras de VT e VB destacaram os ácidos protocatêico e cinâmico como principais componentes, chamando a atenção também para a quercetina, a qual em VT, obteve uma concentração de cerca de 4 vezes superior à concentração detectada em VB.

O HPLC da FAE detectou o ácido gálico como o principal componente da amostra, seguido dos ácidos cinâmico e clorogênico. No entanto, cabe ressaltar que em todas as amostras testadas, tivemos um interesse particular na detecção do *trans*-resveratrol, o qual foi detectado em pequenas concentrações na FAE e SU. Similar ao HPLC da FAE, o ácido gálico também foi o componente de maior concentração no SU, seguido do ácido *p*-cumárico. Com relação ao *trans*-resveratrol presente no SU, assim como na FAE, foi detectada novamente uma pequena concentração deste stilbeno na amostra do SU. No entanto, tal concentração foi bastante superior à FAE, acenando para a possibilidade da utilização do suco de uva como fonte de *trans*-resveratrol, sem as consequências deletérias à saúde humana, promovidas pelo uso do álcool presente em bebidas fermentadas como o vinho.

#### 4.1.2. Estudo da atividade antioxidante

##### 4.1.2.1. Capacidade seqüestradora do radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ):

No sistema fenazina/metasulfato/NBT, na concentração de 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , VT e principalmente a FAE (Figura 1A), inibiram significativamente a redução do NBT pelo  $O_2^{\cdot-}$ . De acordo com a Tabela 3, a FAE demonstrou ainda o menor valor de CI50 e IC 95%. De acordo com esses resultados, tanto VT quanto a FAE demonstraram uma maior capacidade sequestradora do radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), quando comparados às demais amostras testadas.

Neste ensaio, a enzima superóxido dismutase (SOD, 100 U/mL) foi utilizada como controle positivo, sendo que a inibição da redução do NBT obtida foi de  $75,0 \pm 2,3\%$ .

##### 4.1.2.2. Ensaio da degradação da desoxirribose (capacidade seqüestradora do radical OH):

As amostras de VT, VB, FAE e SU também foram avaliadas com relação à sua capacidade seqüestradora de radicais hidroxila e/ou de quelar metais como o ferro. O ensaio da desoxirribose mostrou que, muito embora VB e SU não tenham sido muito efetivos nem na maior concentração utilizada (0,03  $\mu\text{g/mL}$ ), VT e FAE inibiram a degradação da desoxirribose desde a baixa concentração de 0,003  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 1B). Todas as amostras testadas apresentaram uma inibição dose dependente da degradação da desoxirribose. Com relação aos valores de CI50, novamente a FAE foi mais potente que VT (Tabela 3).

O manitol (250 mM) foi utilizado como controle positivo deste ensaio e a inibição obtida foi de  $85,6 \pm 3,5$  %.

4.1.2.3. Ensaio da Peroxidação Lipídica (capacidade seqüestradora do radical LOO·):

As amostras de VT, VB, FAE e SU foram ainda avaliadas com relação a capacidade de inibir a lipoperoxidação induzida pelo peróxido de *t*-butila em homogenatos de fígado de ratos (Figura 1C). Neste ensaio, VT inibiu de forma concentração-dependente, a peroxidação lipídica. Por outro lado, a FAE protegeu contra a lipoperoxidação, em todas as concentrações utilizadas (Figura 1C). VB e SU não promoveram uma significativa inibição da peroxidação lipídica, nem mesmo na maior concentração utilizada no ensaio (1,0 µg/mL).

O controle positivo utilizado neste protocolo foi o BHT (10 mM) e a inibição correspondeu a  $96,0 \pm 0,3$  %.

Tabela 2: Compostos majoritários ( $\mu\text{g/mL}$ ) encontrados no vinho tinto (VT), vinho branco (VB), fração acetato de etila (FAE) e suco de uva (SU). Dados obtidos no ensaio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

COMPOSTOS	VT	VB	FAE	SU
Ácido protocatêico	48,92	0,38	*	2,34
Ácido clorogênico	17,88	0,27	43,24	4,87
Ácido cafêico	13,64	---	*	0,76
Ácido gálico	*	1,46	83,21	40,0
Ácido cinâmico	15,56	12,17	57,97	1,84
Ácido <i>p</i> -cumárico	7,42	---	22,81	8,40
Ácido <i>m</i> -cumárico	*	---	16,27	---
Quercetina	30,71	7,12	14,36	---
Hidroquinona	21,22	---	9,81	1,29
<i>t</i> -resveratrol	*	---	0,32	0,80
Epicatequina	---	---	---	3,99

\* O composto está presente mas não foi possível quantificar.



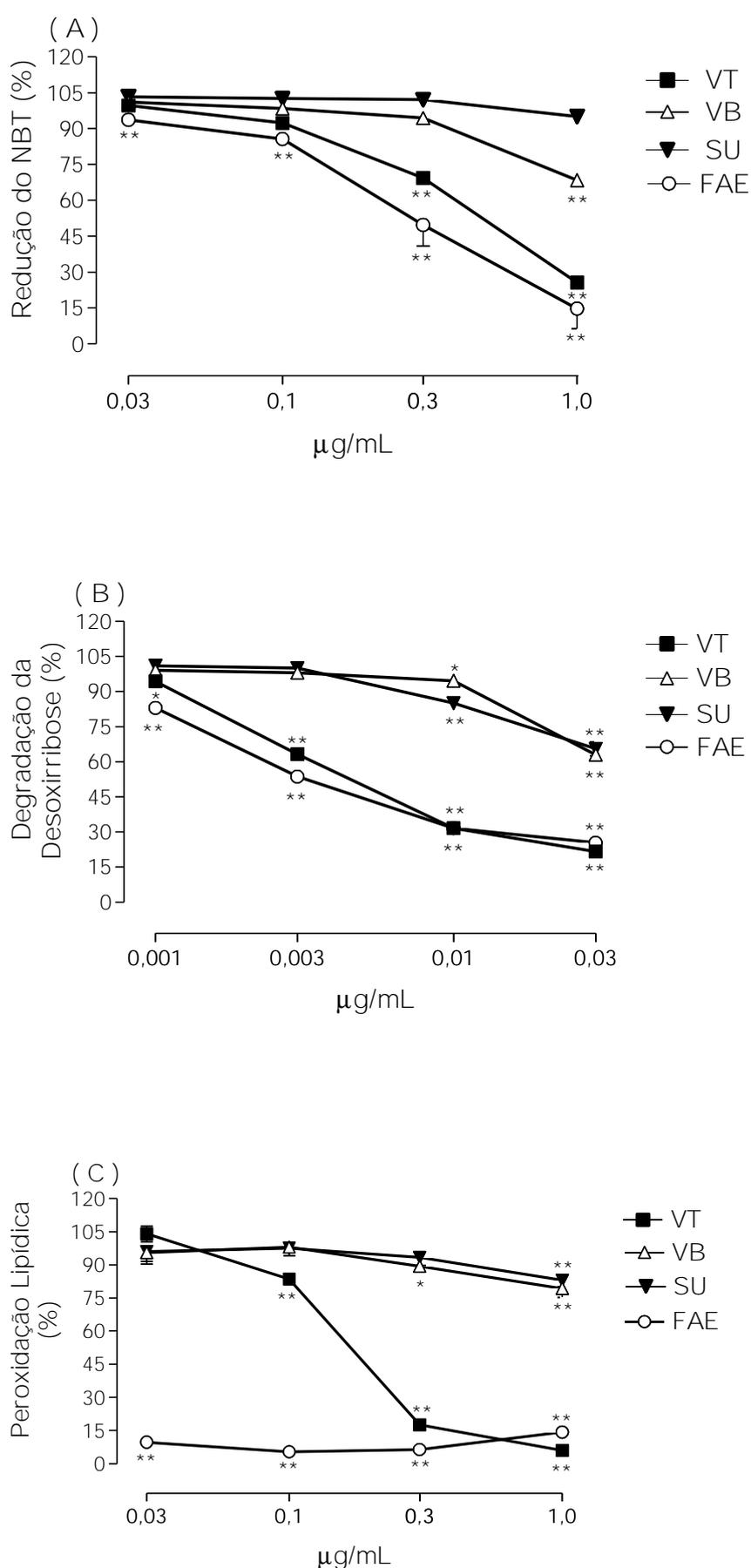


Figura 1: Curvas concentração-resposta dos efeitos inibitórios sobre a redução do NBT (A), degradação da desoxirribose (B) e peroxidação lipídica (C), conferida pelas amostras de VT, VB, SU e FAE. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M de 03 experimentos (em triplicata). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  em relação a 100% de redução do NBT, degradação da desoxirribose e peroxidação lipídica, respectivamente (ANOVA/Dunnet).

Tabela 3: Valores de CI50, respectivos intervalos de confiança e Inibição Máxima (%) de VT e FAE nos ensaios bioquímicos referentes ao estudo da atividade antioxidante.

Amostras	NBT	DESOXIRRIBOSE	PEROX. LIPÍDICA
VT	0,36 (0,30-0,43) µg/mL	3,27 (2,22-4,81) ng/mL	0,16 ( 0,15-0,17) µg/mL
	74,0 ± 1,3 %	78,3 ± 1,3 %	94,0 ± 0,6 %
FAE	0,25 (0,09-0,68) µg/mL	2,15 (1,51-3,06) ng/mL	< 0,03 µg/mL
	85,0 ± 8,40 %	74,6 ± 1,2 %	≅ 100 %

## 4.2. Protocolos Experimentais Farmacológicos

4.2.1. Reatividade Vascular em anéis de aorta torácica de ratos Wistar normotensos:

O gráfico da figura 2 ilustra os primeiros experimentos de reatividade vascular realizados com a FAE. De acordo com a CCRc obtida em anéis de aorta, podemos verificar que a FAE começou a relaxar as preparações apenas nas maiores concentrações, ou seja, somente a partir de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Os valores de  $\text{CI}_{50} + \text{IC}_{95\%}$ , seguido do relaxamento máximo ( $\text{R}_{\text{máx}}$ ), obtidos foram: 502,34 (257,5 - 980,0)  $\mu\text{g/mL}$ ;  $\text{R}_{\text{máx}} = 40,54 \pm 3,45$ .

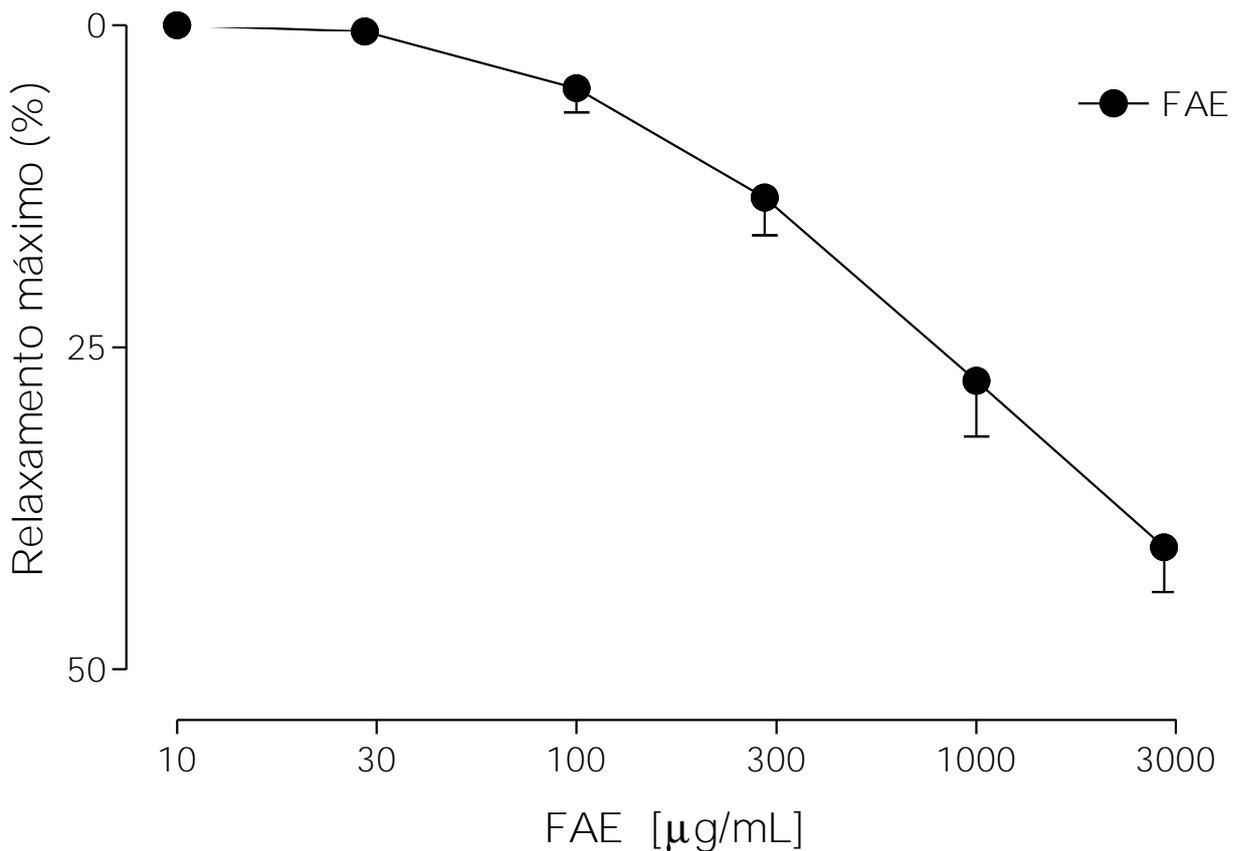


Figura 2: Curva concentração-resposta cumulativa à Fração Acetato de Etila - FAE (10 - 3000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), em anéis de aorta torácica de ratos normotensos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 10 experimentos.

4.2.2. Reatividade Vascular em Leito Arterial Mesentérico (LAM) de ratos normotensos:

Na figura 3 estão representadas as CCR ao VT e à FAE no leito arterial mesentérico. De acordo com a figura 3 e valores da Tabela 4, podemos verificar que a FAE foi mais eficiente em diminuir a pressão de perfusão das preparações, quando comparada com VT, principalmente nas concentrações de 100 e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A partir destes resultados, passamos a testar a FAE na presença de diferentes drogas e soluções.

Na figura 4, temos as CCR à FAE, na presença do inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o N $\omega$ -nitro-L-arginina (L-NOARG, 100  $\mu\text{M}$ ), o qual foi utilizado individualmente e em conjunto com Krebs-despolarizante (KCl) 40 mM. O ODQ (10  $\mu\text{M}$ ), inibidor da enzima guanilato ciclase, também foi utilizado individualmente para investigar a efetiva participação da via L-arginina/NO no efeito da FAE. Além disso, realizamos CCRs à FAE na presença individual de uma alta concentração de potássio, através da perfusão de KCl 80 mM.

Conforme podemos observar, a CCR à FAE na presença do KCl 80 mM, foi significativamente deslocada para a direita, quando comparada com a curva controle à FAE. Além disso, a presença simultânea de KCl e L-NOARG no líquido de perfusão, fez com que o deslocamento da CCR à FAE para a direita fosse ainda mais evidente; esse efeito é claramente evidenciado através dos valores de  $\text{CI}_{50}$  e  $R_{\text{máx}}$  da Tabela 4.

Assim como o L-NOARG, a perfusão de ODQ também promoveu o significativo deslocamento da CCR à FAE para a direita.

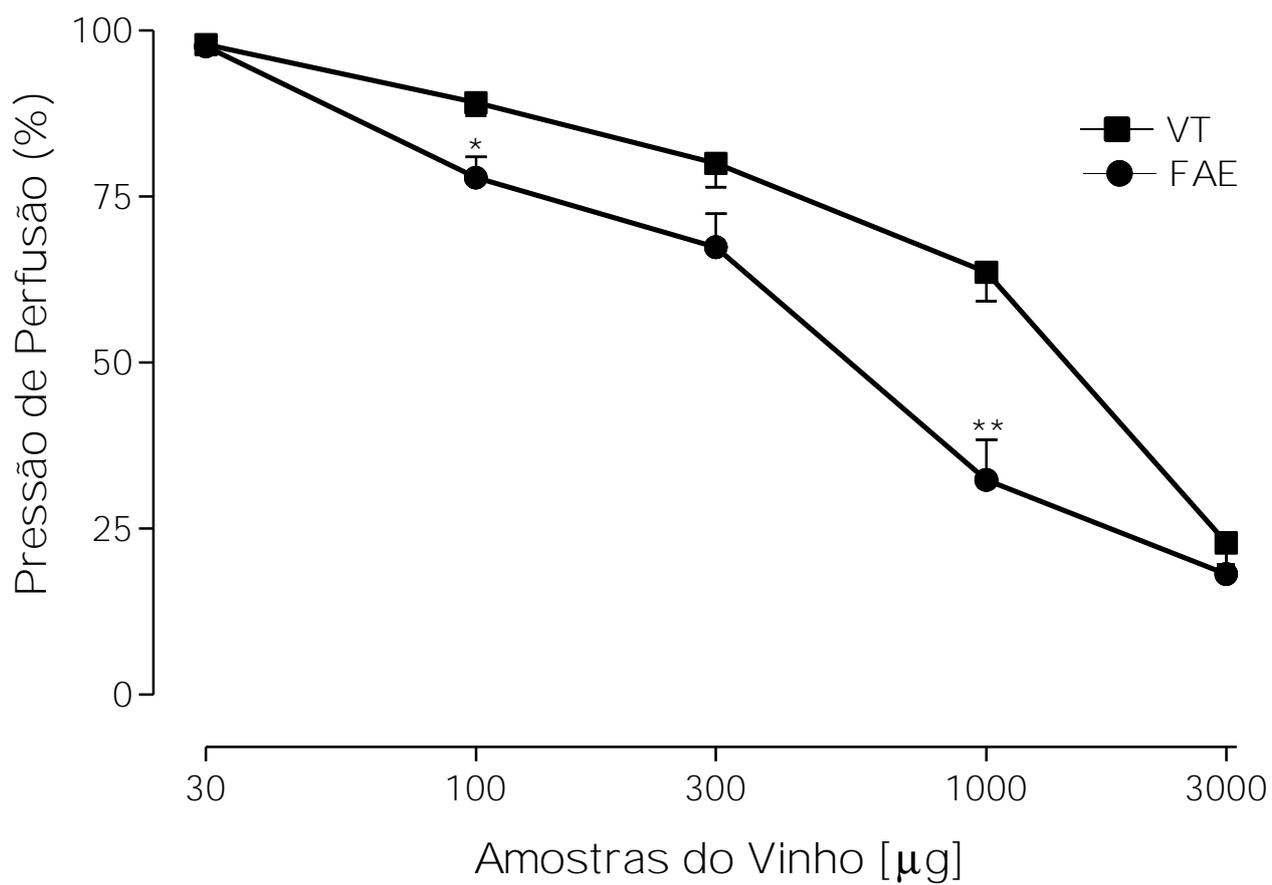


Figura 3: Curvas concentração -resposta ao VT e a Fração Acetato de Etila - FAE (30 - 3000  $\mu\text{g}$ , *bolus*), em leito arterial mesentérico de ratos normotensos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 5 a 6 experimentos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  indicam diferença significativa entre VT e FAE (teste *t* não pareado).

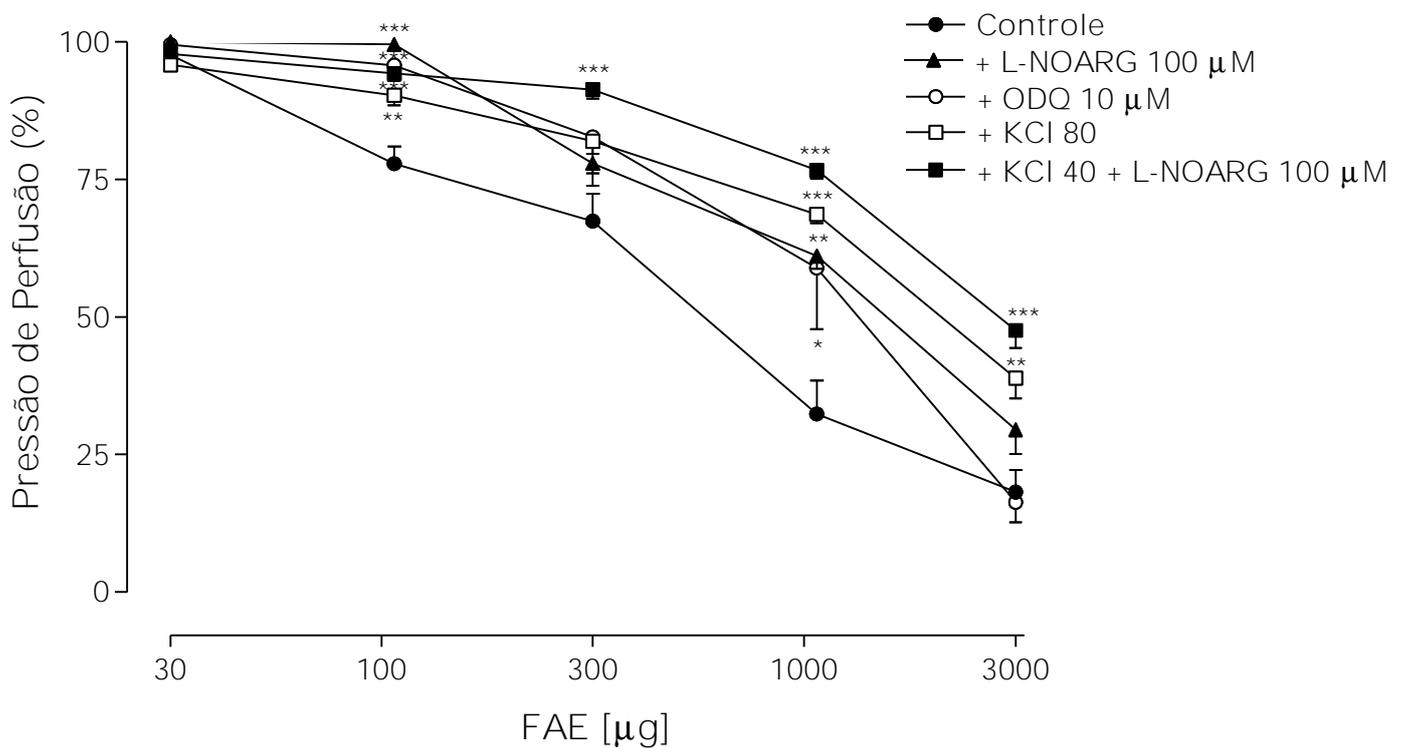


Figura 4: Curvas concentração -resposta à Fração Acetato de Etila - FAE ( 30 - 3000  $\mu\text{g}$ , *bolus*), na ausência e na presença de L-NOARG e diferentes concentrações de Krebs Despolarizante (KCl), em leito arterial mesentérico de ratos normotensos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 5 a 6 experimentos. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  indicam diferença significativa contra o grupo controle FAE (Controle).

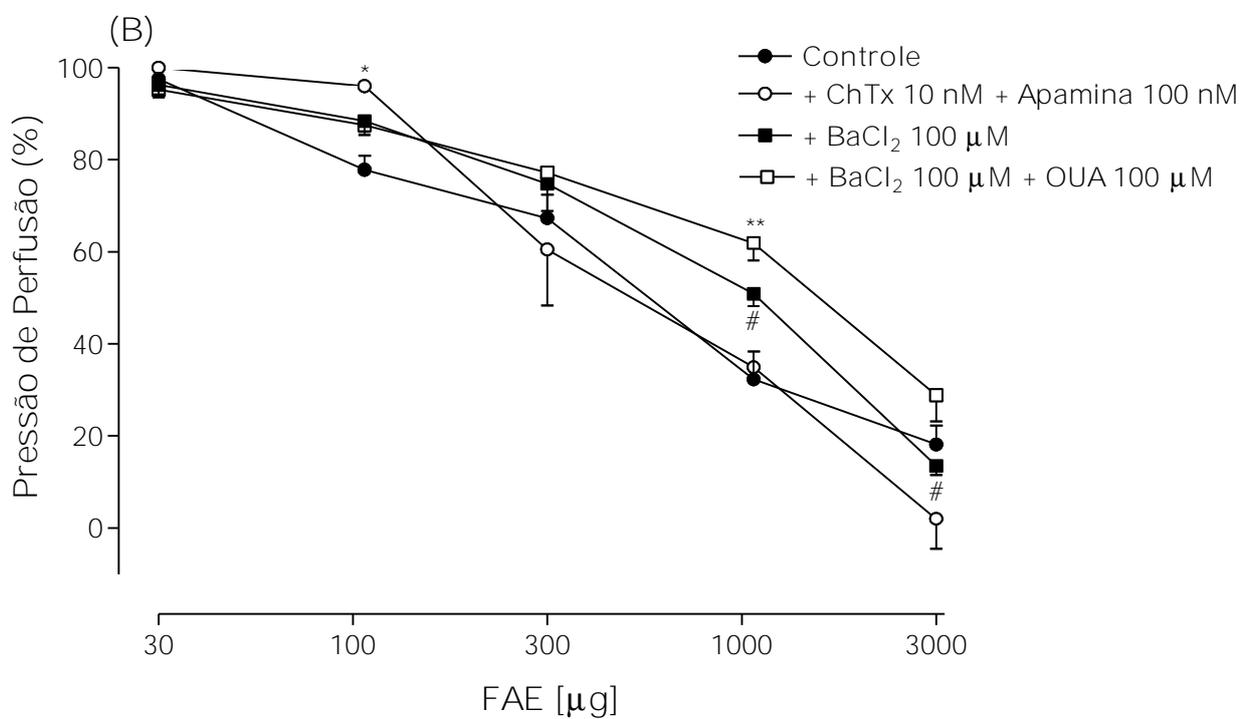
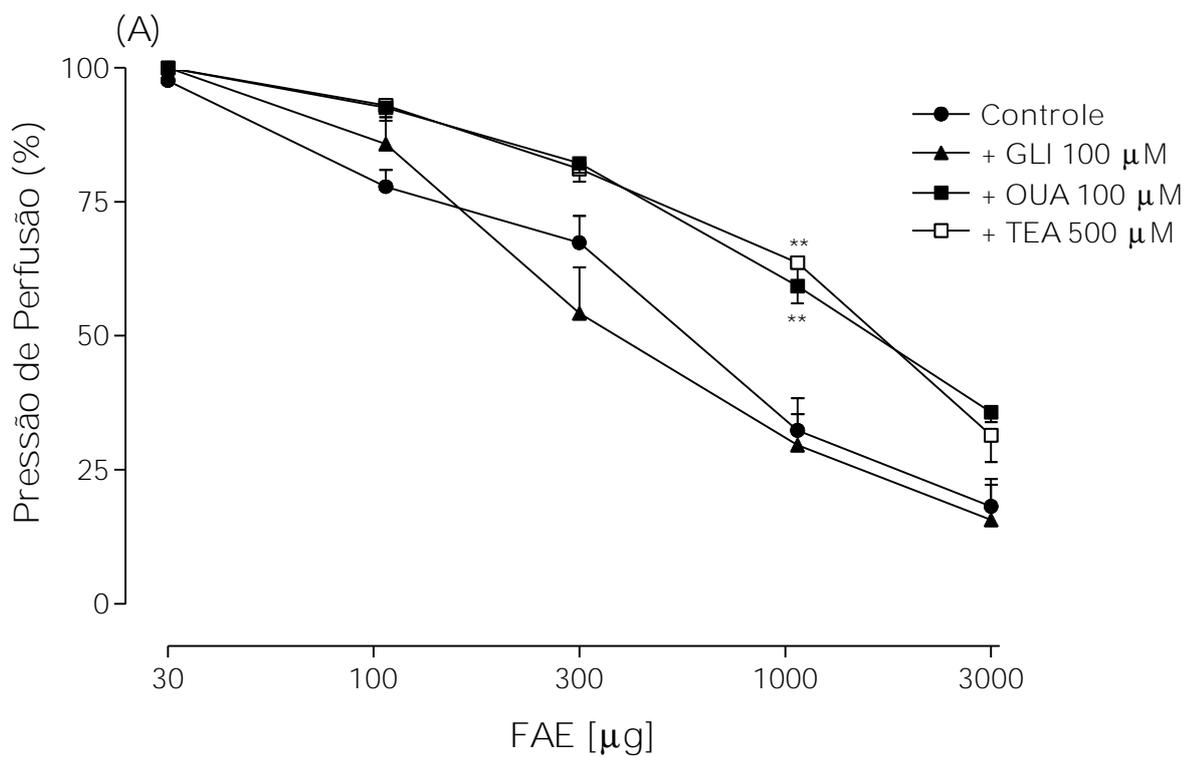


Figura 5: Curvas concentração-resposta à Fração Acetato de Etila - FAE ( 30 - 3000  $\mu\text{g}$ , *bolus*), na ausência e presença de diferentes drogas atuantes sobre canais de  $\text{K}^+$ , em leito arterial mesentérico de ratos normotensos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 5 a 6 experimentos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  indicam diferença significativa contra o grupo controle FAE (Controle). # $p < 0,05$ ; indica diferença significativa entre os grupos ( $\text{BaCl}_2$ ) X ( $\text{BaCl}_2$  + OUA); ANOVA/Tukey.

Tendo em vista que nossos resultados, utilizando diferentes concentrações de KCl, apontaram uma possível influência de canais de potássio sobre a diminuição da pressão de perfusão induzida pela FAE, investigamos subsequente o efeito desta fração na presença de diferentes drogas que atuam sobre estes canais. Na Figura 5A, temos as CCR à FAE, na presença de Glibenclamida (inibidor de canais de potássio dependentes de ATP); de Ouabaína (inibidor da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e de Tetraetilamônio (inibidor não seletivo de canais de  $\text{K}^+$ ). De acordo com esta figura e Tabela 4, a glibenclamida não alterou a pressão de perfusão induzida pela FAE. Com relação ao  $R_{\text{máx}}$ , adicionando glibenclamida à solução de perfusão, novamente obtivemos um valor de relaxamento máximo muito próximo à CCR controle da FAE. Com relação às demais drogas atuantes nos canais de  $\text{K}^+$ , a ouabaína e o tetraetilamônio promoveram significativos deslocamentos de suas respectivas CCR, para a direita (Figura 5A). Os valores da Tabela 4 ratificam a ilustração da Figura 5A, uma vez que a CCR à FAE na presença de ambas as drogas (ouabaína e tetraetilamônio), resultou em valores de  $\text{CI}_{50}$  superiores e  $R_{\text{máx}}$  inferiores, quando comparados à CCR controle da FAE. Na figura 5B estão representadas as CCR à FAE, na ausência e presença de bário (droga inibidora dos canais de potássio retificadores para influxo -  $\text{K}_{\text{IR}}$ ), bem como na presença de bário e ouabaína, na mesma perfusão. De acordo com a figura 5B e tabela 4, a inibição simultânea dos canais  $\text{K}_{\text{IR}}$  e da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase também promoveu um significativo deslocamento da CCR da FAE para a direita.

Tomando como base os valores encontrados na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Tabela 2), procuramos investigar o efeito isolado de alguns

compostos majoritários encontrados na FAE, sobre o Leito Arterial Mesentérico isolado. As CCR obtidas e demonstradas na Figura 6, revelam que, com exceção da quercetina que promoveu um discreto relaxamento nas maiores doses, nenhum dos ácidos fenólicos utilizados, nem mesmo o resveratrol, tiveram a capacidade de diminuir a pressão de perfusão no LAM.

Com o objetivo de verificar o efeito de uma droga conhecida sobre o LAM, o agonista colinérgico muscarínico - acetilcolina - foi utilizado como controle positivo e administrado antes da realização das CCR à FAE. O histograma da Figura 7 demonstra o efeito da acetilcolina nos diferentes protocolos experimentais realizados. Através destes resultados, constatamos que a acetilcolina, efetivamente diminui a pressão de perfusão do LAM. Além disso, assim como vários trabalhos descritos na literatura, nossos resultados também evidenciaram que o efeito deste agonista parece ser mediado preferencialmente via modulação de canais de potássio/EDHF do que via modulação do óxido nítrico (Figura 7).

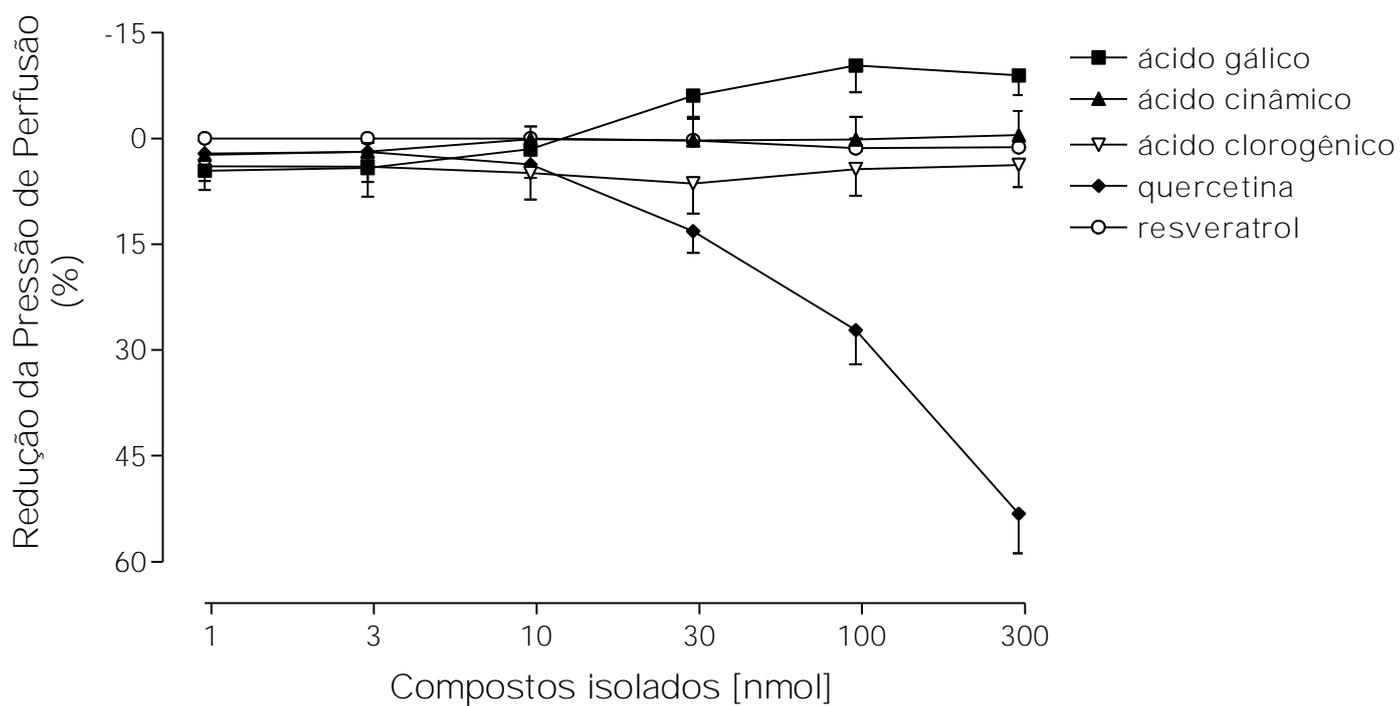


Figura 6: Curvas concentração-resposta à diferentes compostos majoritários presentes na FAE (1 nmol - 300 nmol, *bolus*), em leito arterial mesentérico de ratos normotensos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 6 a 8 experimentos.

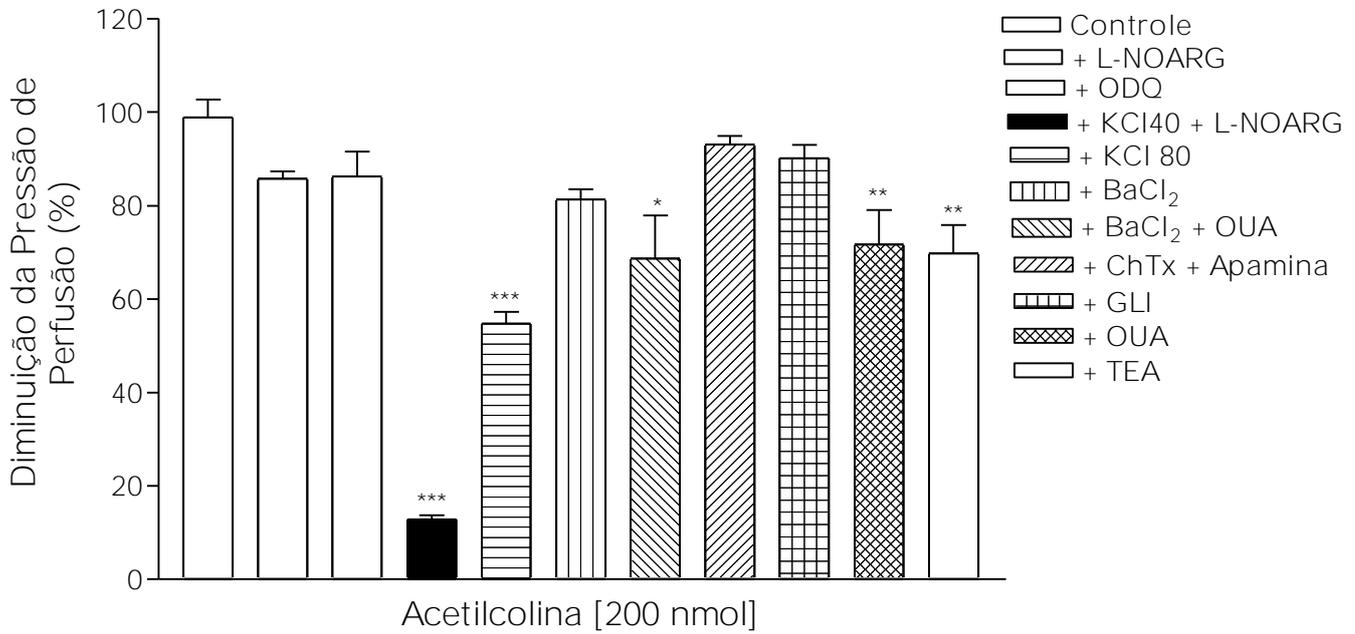


Figura 7: Histograma representando o relaxamento do leito arterial mesentérico de ratos normotensos, induzido pela Acetilcolina (200 nmol, *bolus*). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  indicam diferença significativa contra o grupo controle. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 4 a 6 experimentos (ANOVA/Tukey).

Tabela 4: Valores de CI50, intervalos de confiança (95%) e relaxamentos máximos (Rmáx), induzidos por VT e FAE, na ausência e na presença de diferentes soluções e drogas, em leito arterial mesentérico de ratos *Wistar* normotensos.

Grupo	CI50 ( a ) ( µg )	Rmáx ( b ) ( % )
VT	891,25 (538,10 - 1475,70) ***	78,40 ± 3,67
FAE (Controle)	390,84 (252,27 - 605,53)	81,88 ± 4,04
+ KCl 40 mM + L-NOARG)	1059,25 (906,06 - 1238,34) ***	49,68 ± 1,69 ***
+ KCl 80 mM	767,36 (457,35 - 1287,49) ***	61,11 ± 3,64**
+ L-NOARG	736,20 ( 330,17 - 1641,53)***	70,57 ± 4,38
+ ODQ	881,04 (370,13 – 2097,20)***	83,71 ± 3,62
+ GLI	252,34 (128,77 - 494,51)	82,01 ± 6,05
+ OUA	665,27 (474,14 - 933,45) ***	64,29 ± 1,80*
+ BaCl <sub>2</sub>	638,26 (275,43 - 1479,02) ***	86,53 ± 1,96
+ BaCl <sub>2</sub> + OUA	743,02 (312,70 - 1765,51) ***	71,16 ± 5,64
+ TEA	851,13 (543,30 - 1333,80) ***	68,60 ± 4,92
+ ChTx + Apamina	421,70 (210,71 – 843,94)	98,01 ± 6,45

( a ): CI50 é apresentada como média geométrica acompanhada pelo seu limite de confiança de 95%. \*\*\* $p < 0,001$  indicam diferenças significativas com relação ao grupo FAE (Controle). ANOVA/Tukey.

( b ): Rmáx é apresentado como média ± EPM, referente ao percentual de relaxamento máximo das preparações. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  indicam diferenças significativas com relação ao grupo FAE (Controle). ANOVA/Tukey.

### 4.3. Protocolos experimentais realizados com camundongos LDLR KO

#### 4.3.1. Parâmetros Fisiológicos - Peso e Ingesta Alimentar

Os histogramas da Figura 8 (A e B) demonstram, respectivamente, as médias e E.P.M. observados com relação a ingesta alimentar e ao peso dos camundongos LDLR KO, ao longo dos três meses de tratamento. De acordo com o histograma da figura 8A, nos dois primeiros meses de tratamento, não ocorreram diferenças significativas entre os grupos que receberam a dieta hipercolesterolêmica. Por outro lado, no terceiro mês de tratamento, o grupo FAE 3 e o grupo CP ingeriram uma quantidade maior de alimento, quando comparados ao CCD.

Em relação ao peso dos animais (Figura 8B), podemos verificar que a dieta hipercolesterolêmica foi efetiva, no sentido de que os animais do grupo CCD aumentaram de peso nos dois últimos meses, quando comparados ao grupo CSD. A figura 8B mostra ainda que, ao contrário do grupo CP, o grupo FAE 3 apresentou queda no peso em relação ao grupo CCD. Neste sentido, é importante ressaltar que, embora a média de peso do grupo FAE 3 tenha sido menor quando comparada ao grupo CCD, o grupo FAE 3 não perdeu peso ao longo dos três meses de tratamento com a dieta hipercolesterolêmica.

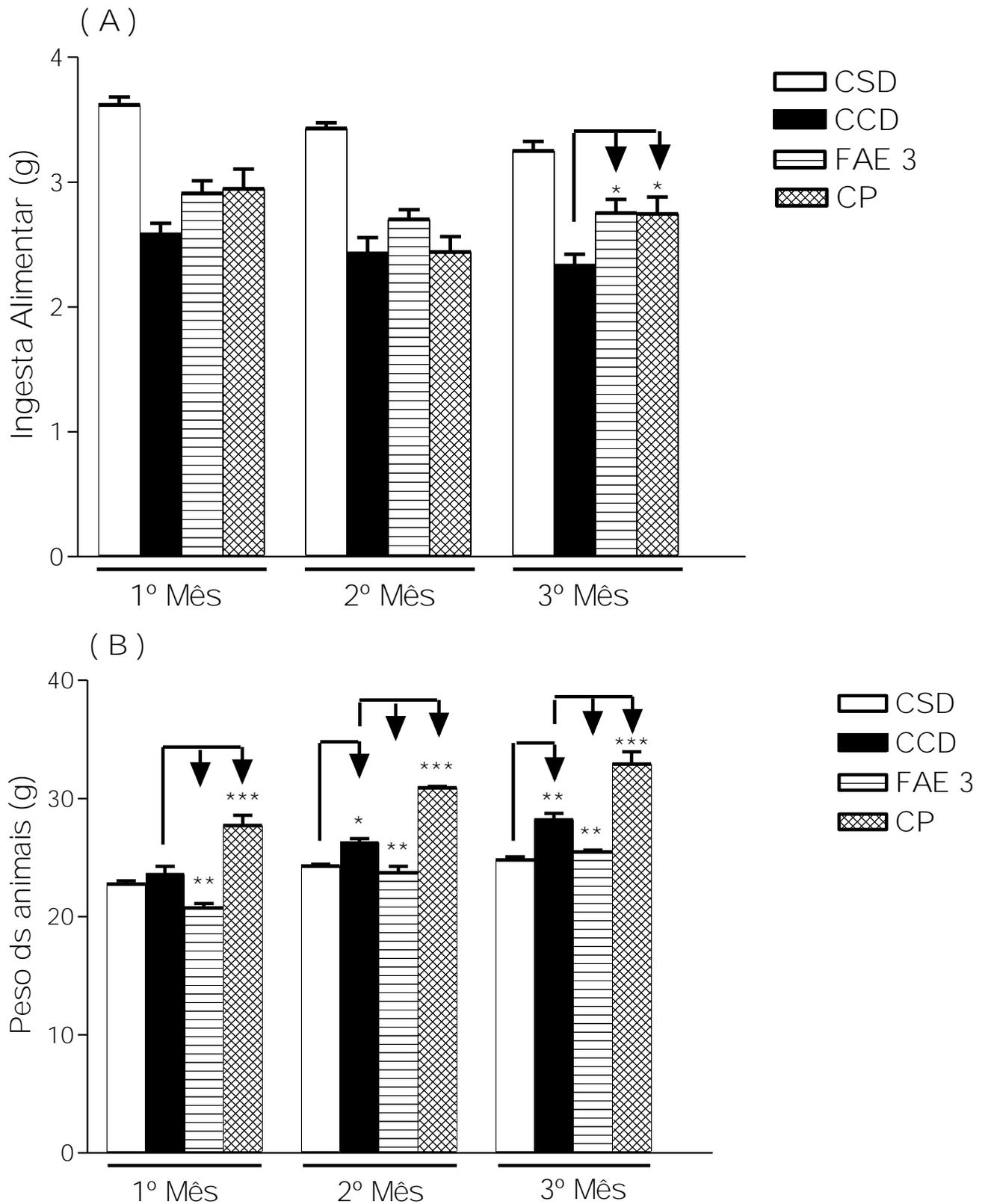


Figura 8: Histogramas representando a variação dos parâmetros fisiológicos - Ingesta alimentar (A) e Peso (B) dos camundongos LDLR KO (N = 5 - 6). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (ANOVA/Dunett). CSD = controle sem dieta; CCD= controle com dieta; FAE 3= tratado 3 mg/kg; FAE 10= tratado 10 mg/kg CP= controle positivo (sinvastatina 1 mg/kg).

4.3.2. Dosagem de colesterol total (CT), triacilglicerol (TAG) e Lipoproteínas (LPs - VLDL, LDL, HDL):

Os histogramas da Figura 9 (A e B), demonstram os resultados obtidos nas dosagens de CT e TAG. Com relação à dosagem de CT, os grupos que receberam ração padrão normal, ou seja, os grupos CSD e SD+FAE, tiveram os níveis de CT significativamente reduzidos ao final dos três meses de tratamento. No entanto, é importante ressaltar que o FAE 3, o qual recebeu dieta hipercolesterolêmica, idêntica ao grupo CCD, obteve um índice de CT significativamente inferior quando comparado ao CCD (Figura 9A).

Em relação à dosagem do TAG, todos os grupos tiveram seus níveis significativamente reduzidos ao final do tratamento (Figura 9B).

Na Figura 10 estão representados os valores obtidos com as dosagens de LPs. Com relação à dosagem de LDL (Figura 10A), os resultados foram semelhantes aos obtidos na dosagem do CT, ou seja, além dos grupos que receberam a dieta padrão, somente o FAE 3 teve seus níveis de LDL diminuídos ao final do tratamento de três meses. Na dosagem do VLDL, por outro lado, todos os grupos com dieta normal e também os grupos que receberam a FAE nas diferentes concentrações, tiveram os níveis dessa LP diminuídos (Figura 10B). Finalmente, visto que a HDL em camundongos LDLR KO apresenta valores de referência desejáveis por volta dos 90 mg/dL, todos os grupos tiveram os valores dessa lipoproteína sensivelmente aumentados (Figura 10C).

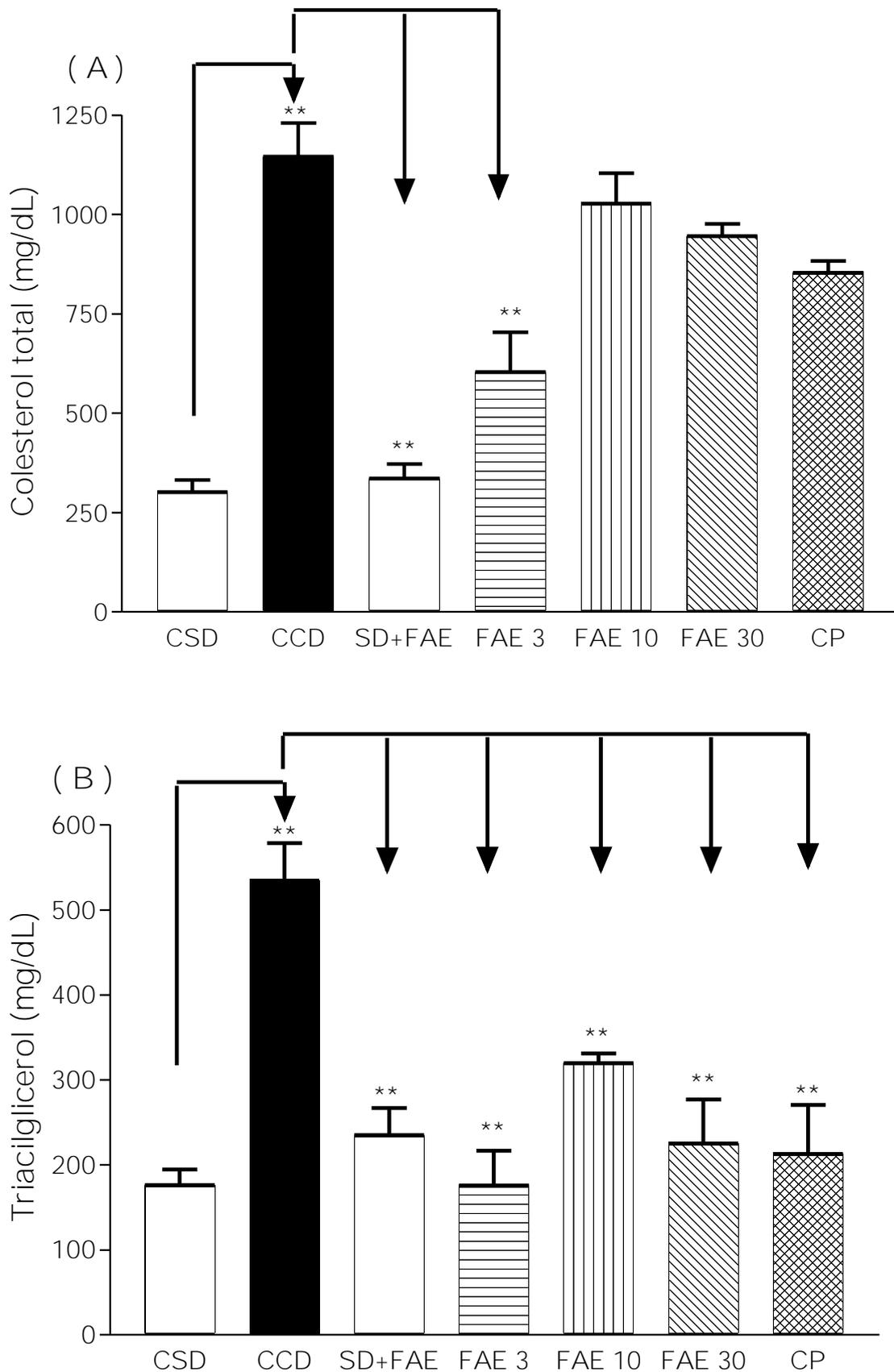


Figura 9: Histogramas representando as médias (mg/dL)  $\pm$  E.P.M. das dosagens de colesterol total (A) e triacilglicerol (B), realizadas nos diferentes grupos experimentais de camundongos LDLR KO. \*\* $p < 0,01$ (ANOVA/Dunnett). Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de 3 a 6 dosagens. CSD= controle sem dieta; CCD= controle com dieta; SD+FAE= controle sem dieta + FAE 30 mg/kg; FAE 3= tratado 3 mg/kg; FAE 10= tratado 10 mg/kg; FAE 30= tratado 30mg/kg; CP= controle positivo (sinvastatina 1 mg/kg).

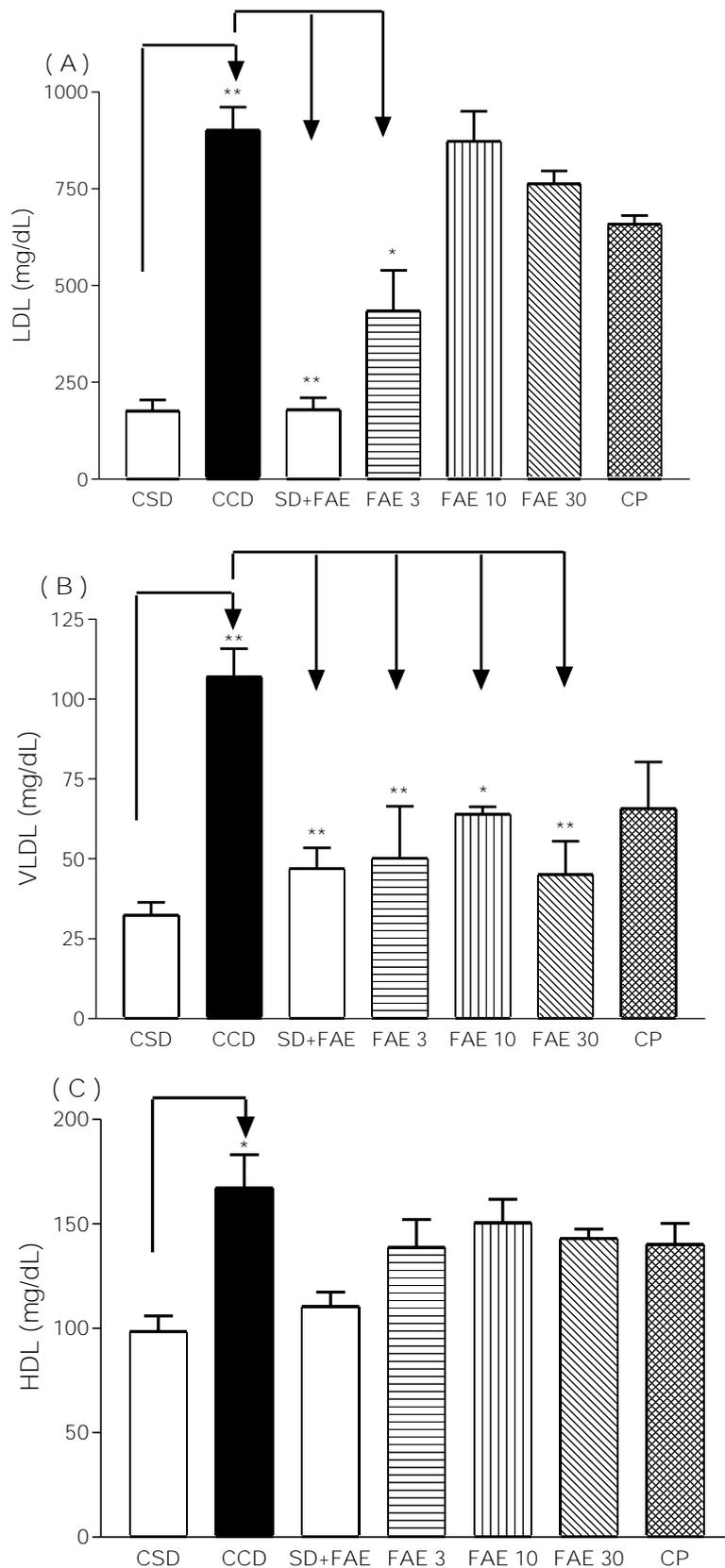


Figura 10: Histogramas representando as médias (mg/dL)  $\pm$  E.P.M. das dosagens de LDL (A), VLDL (B) e HDL (C), realizadas nos diferentes grupos experimentais de camundongos LDLR KO. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (ANOVA/Dunnett). Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de 3 a 6 dosagens. CSD= controle sem dieta; CCD= controle com dieta; SD+FAE= controle sem dieta + FAE 30 mg/kg; FAE 3= tratado 3 mg/kg; FAE 10= tratado 10 mg/kg; FAE 30= tratado 30mg/kg; CP= controle positivo (sinvastatina 1 mg/kg).

#### 4.3.3. Reatividade Vascular: Preparações isoladas de aorta torácica:

As Figuras 11 e 12 ilustram os resultados obtidos na reatividade vascular dos camundongos LDLR KO. De acordo com a Figura 11, o agonista  $\alpha$ -adrenérgico - Fenilefrina - promoveu seu efeito dependente da concentração, formando CCR cumulativas. Embora neste tipo de preparação a resposta ao agonista seja bem inferior a outros tipos de preparação - como por exemplo em aorta torácica de rato - podemos observar claramente que o efeito contrátil da fenilefrina foi melhor evidenciado nos grupos CSD, CSD + FAE, FAE 3 e CP. Tal efeito também pôde ser constatado com relação à contração das preparações onde mais uma vez os mesmos grupos mencionados anteriormente, foram os que apresentaram um maior efeito máximo (Tabela 5).

Na Figura 12 estão representadas as CCRc ao agonista colinérgico muscarínico - a Acetilcolina . De acordo com nossos resultados, o agonista promoveu um maior relaxamento nos grupos experimentais CSD, FAE 3 e CP. Aqui também é importante ressaltar que, assim como nos experimentos com a fenilefrina, o menor valor de CI50 não está necessariamente relacionado ao maior efeito de relaxamento. Um exemplo claro pode ser evidenciado na Tabela 6, onde o CCD indicou um valor de CI50 dentro da faixa de outros grupos experimentais mas, em contrapartida, promoveu o menor efeito máximo ( $0,068 \pm 0,018$  g). Conforme a Tabela 6, não foi possível determinar os valores de CI50 e IC 95% para o grupo FAE 30, uma vez que os relaxamentos obtidos não foram dependentes da concentração do agonista.

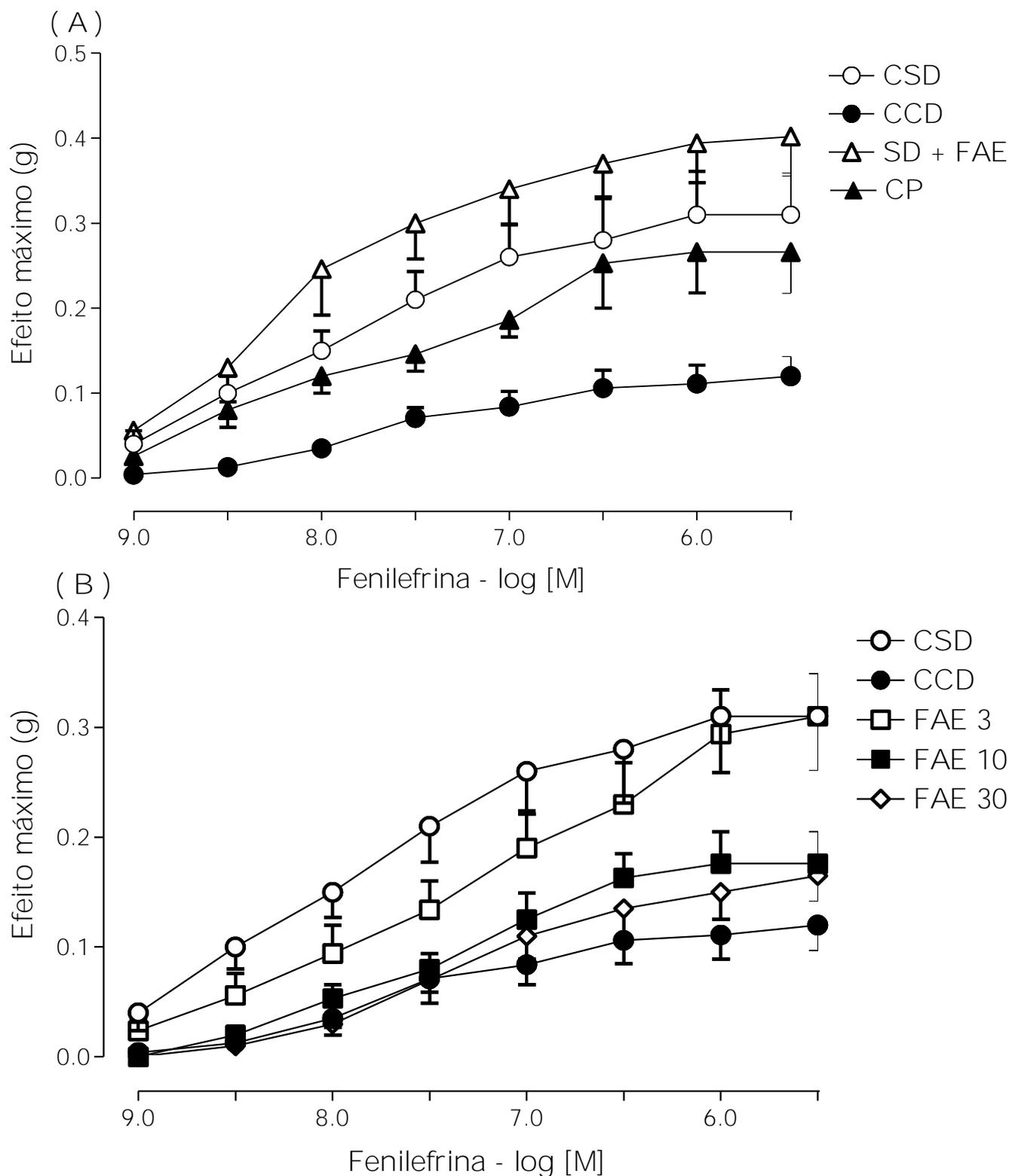


Figura 11: Curvas concentração-resposta cumulativas à fenilefrina (1nM - 3 $\mu$ M), em anéis de aorta torácica de camundongos LDLR KO. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 4 a 9 experimentos. (A): CSD= controle sem dieta; CCD=controle com dieta; SD+FAE= controle sem dieta + FAE 30 mg/kg; CP= controle positivo (sinvastatina 1 mg/kg). (B): CSD, CCD, FAE 3= tratado 3 mg/kg; FAE 10= tratado 10 mg/kg; FAE 30= tratado 30mg/kg.

Tabela 5: Valores de CI50, intervalos de confiança (95%) e efeitos máximos (Emáx), induzidos pela fenilefrina (1 nM - 3 μM), em preparações isoladas de aorta torácica de camundongos LDLR KO.

Grupo Experimental	CI50 ( a ) ( nM )	Emáx ( b ) ( g )
CSD	10,0 ( 6,0 - 17,0 )	0,32 ± 0,049***
CCD	16,0 ( 5,0 - 52,0 )	0,12 ± 0,023
SD + FAE	7,0 ( 2,0 - 17,0 )	0,40 ± 0,046***
FAE 3	30,0 ( 5,0 - 166,0 )	0,31 ± 0,039**
FAE 10	26,0 ( 9,0 - 78,0 )	0,176 ± 0,029
FAE 30	55 ( 17,0 - 174,0 )	0,165 ± 0,023#
CP	20,0 ( 8,0 - 47,0 )	0,266 ± 0,048

( a ) CI50 é apresentada como média geométrica acompanhada pelo seu limite de confiança de 95%.

( b ) Emáx é apresentado como média ± E.P.M., referente a contração máxima das preparações, em gramas. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  indicam diferenças significativas com relação ao CSD. # $p < 0,05$  indica diferença significativa com relação ao FAE 3 ANOVA/Tukey.

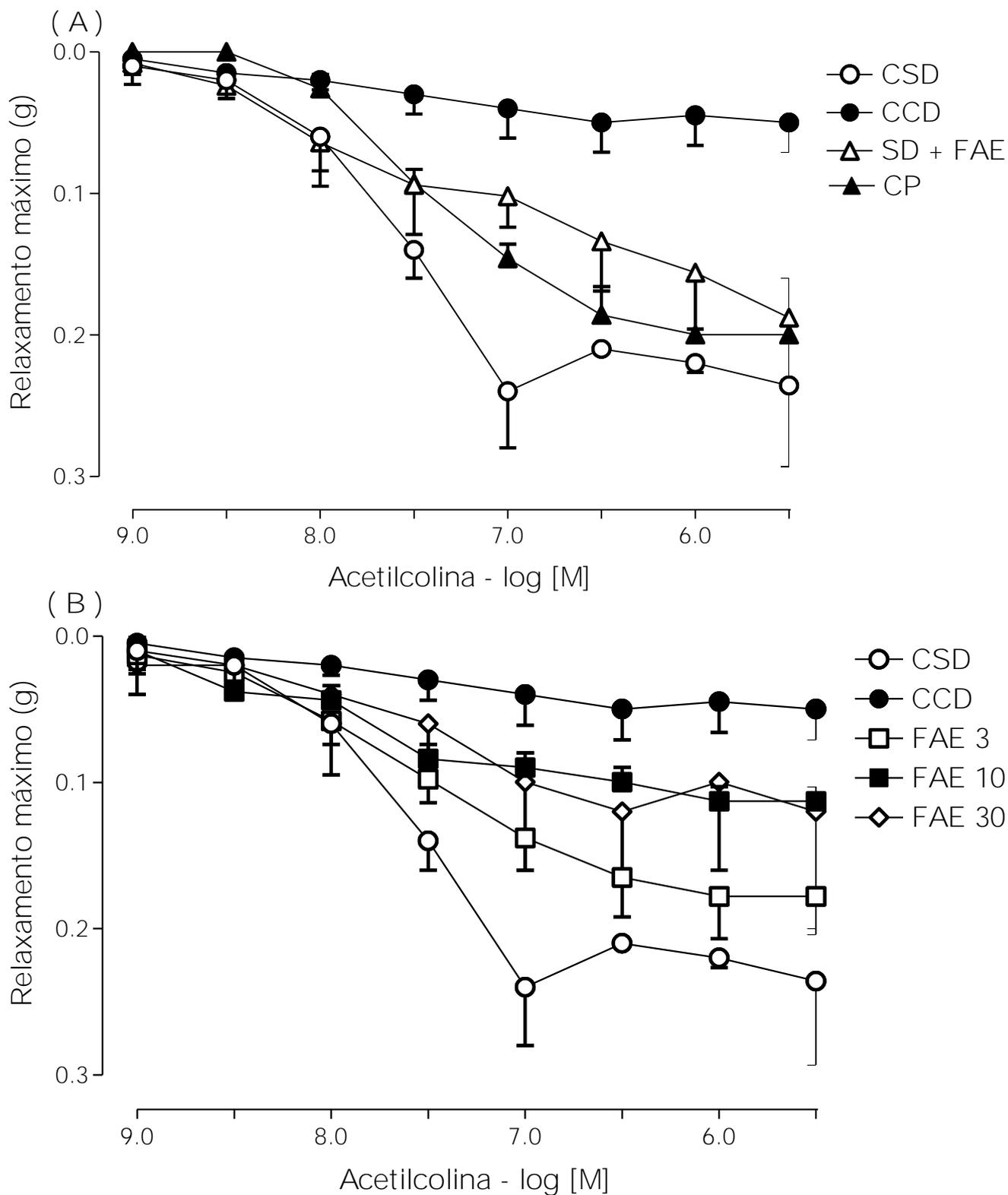


Figura 12: Curvas concentração-resposta cumulativas à acetilcolina (1nM - 3 $\mu$ M), em anéis de aorta torácica de camundongos LDLR KO. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 4 a 9 experimentos. (A): CSD= controle sem dieta; CCD=controle com dieta; SD+FAE= controle sem dieta + FAE 30 mg/kg; CP= controle positivo (sinvastatina 1 mg/kg). (B): CSD, CCD, FAE 3= tratado 3 mg/kg; FAE 10= tratado 10 mg/kg; FAE 30= tratado 30mg/kg.

Tabela 6: Valores de CI50, intervalos de confiança (95%) e relaxamentos máximos (Rmáx), induzidos pela acetilcolina (1 nM - 3 μM), em preparações isoladas de aorta torácica de camundongos LDLR KO.

Grupo Experimental	CI50 ( a ) ( nM )	Rmáx( b ) ( g )
CSD	38,0 ( 0,6 - 2340 )	0,23 ± 0,057
CCD	30,0 ( 6,0 - 137,0 )	0,068 ± 0,018
SD + FAE	36,0 ( 9,0 - 142,0 )	0,19 ± 0,043
FAE 3	21,0 ( 7,0 - 58,0 )	0,18 ± 0,026
FAE 10	10,0 ( 4,0 - 24,0 )	0,11 ± 0,017
FAE 30	*	0,12 ± 0,08
CP	33,0 ( 5,0 - 211,0 )	0,20 ± 0,040

( a ) CI50 é apresentada como média geométrica acompanhada pelo seu limite de confiança de 95%.

( b ) Rmáx é apresentado como média ± E.P.M., referente ao relaxamento máximo das preparações, em gramas.

\* não foi possível determinar.

---

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Ensaio para determinar a atividade antioxidante

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são constantemente geradas sob condições fisiológicas como consequência do metabolismo aeróbico. As EROs caracterizam-se por serem espécies em frequente transição, altamente reativas e promovendo efeitos deletérios ao DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos. O estresse oxidativo, diretamente relacionado ao desequilíbrio entre a produção e destruição das EROs, está implicado em muitas patologias, como o Mal de Alzheimer, Aids, Mal de Parkinson e aterosclerose (Yoshikawa *et al*, 2000; Curtin *et al*, 2002).

Os ensaios bioquímicos para avaliar o poder antioxidante, ponto de partida deste trabalho, foram realizados com o objetivo de verificar primariamente a capacidade *scavenger* das amostras de VT, VB, SU e FAE.

No sistema fenazina/metassulfato/NBT, VT e FAE foram mais efetivos em inibir a redução do NBT, quando comparados com VB e SU (Figura 1A). A inibição da redução do NBT reflete, de maneira indireta, a capacidade destas amostras em sequestrar o radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). A importância da descoberta de substâncias capazes de neutralizar o  $O_2^{\cdot-}$  reside no alto poder deste radical em gerar outras espécies reativas. Nos sistemas biológicos, o  $O_2^{\cdot-}$  reage rapidamente com o NO, gerando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), o qual, sendo mais reativo que o NO e o  $O_2^{\cdot-}$ , tem sido implicado na patofisiologia de inúmeras doenças como a aterosclerose,

artrite reumatóide e a síndrome da distrofia respiratória (Demiryurek *et al*, 1998; Persinger *et al*, 2002).

Para investigar o efeito de VT, VB, SU e FAE sobre os radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e peroxila ( $\text{LOO}\cdot$ ), foram realizados dois tipos de ensaios, a saber: o ensaio da desoxirribose foi realizado para verificar se as amostras seriam capazes de proteger um carboidrato - a desoxirribose - da oxidação promovida pelo radical gerado no sistema, o  $\cdot\text{OH}$ ; o ensaio envolvendo o homogenato de fígado foi realizado para verificar o efeito das amostras sobre a oxidação de lipídeos. De acordo com nossos resultados, tanto os extratos quanto a fração promoveram uma inibição da degradação da desoxirribose, com valores inferiores a  $0,003 \mu\text{g/mL}$  (Figura 1B). Com relação aos valores de CI50, a FAE obteve o melhor resultado, seguida de VT (Tabela 3).

O efeito de VT e FAE sobre o radical hidroxila vai ao encontro de dados da literatura. De acordo com Rice Evans e Miller (1996), em soluções aquosas, amostras contendo o maior número de compostos fenólicos contendo grupamentos OH, são mais efetivas quanto à sua capacidade antioxidante. Além da capacidade de seqüestrar EROs, a atividade antioxidante dos compostos fenólicos neste ensaio, pode ainda ser atribuída à sua capacidade de quelar metais de transição (Rodrigo e Rivera, 2002). Neste contexto, Sestilli e colaboradores mostraram que, em baixas concentrações, determinados componentes polifenólicos são capazes de quelar metais como por exemplo, o ferro (Sestilli *et al.*, 2002).

O poder antioxidante de VT, VB, SU e FAE também diminuiu a peroxidação lipídica, induzida pelo peróxido de *t*-butila (Figura 1C). De acordo com a Tabela 2, a FAE apresenta componentes fenólicos, os quais apresentam somente uma hidroxila ligada ao anel aromático, como os ácidos cinâmico e p-cumárico. Se relacionarmos

as estruturas destas moléculas com sua capacidade *scavenger* e atividade antioxidante, estes compostos oferecem pouca proteção contra as EROs (Galato *et al*, 2001). No entanto, a FAE também apresenta uma significativa variedade de compostos polihidroxiados, dentre eles o ácido gálico, o ácido clorogênico e a quercetina, o que justifica o alto poder antioxidante da fração do vinho. Alguns estudos têm reportado que determinados compostos fenólicos, como a quercetina e o ácido clorogênico, têm alto poder antioxidante, sendo tal atividade superior ao Trolox, um análogo solúvel da vitamina E (Lotito and Frei, 2004). Ainda com relação à quercetina, a estrutura química deste flavonóide permite que este facilmente doe elétrons ao meio, tendo portanto, um dos requisitos indispensáveis a um agente antioxidante (Pekkarinen *et al*, 1999; Sestili *et al*, 2002; Drummen *et al*, 2004).

É importante ressaltar que todos os compostos majoritários de maior interesse, ou seja, compostos que, de acordo com a literatura, apresentam maiores propriedades antioxidantes, foram encontrados em quantidades bastante superiores em VT, quando comparados à VB (Tabela 2). Tais resultados explicam o fato das propriedades antioxidantes de VT serem muito superiores à VB. De acordo com os resultados obtidos nos ensaios bioquímicos realizados para determinar a atividade antioxidante, as amostras de VT e FAE foram as que apresentaram uma maior ação seqüestradora de EROs. Tais resultados estão diretamente relacionados aos dados obtidos na cromatografia líquida (HPLC), a qual demonstrou que VT e FAE apresentam uma maior diversidade e concentração de compostos fenólicos, quando comparados com VB e SU (Tabela 2).

Na última década, muitos estudos têm apontado o t-resveratrol como um importante metabólito secundário de vinhos tintos, com relevante ação na doença arterial coronária, principalmente por proteger a LDL contra a oxidação (Maraschin

*et al*, 2000; Maraschin *et al*, 2001). Embora alguns estudos atribuam parcialmente este efeito ao álcool presente nos vinhos, outros autores apresentaram claras evidências da bioatividade do resveratrol (Bhat *et al*, 2001).

O HPLC das amostras testadas (Tabela 2), mostrou que a FAE (0,32 µg/mL) e o SU (0,80 µg/mL), apresentam maiores concentrações de *t*-resveratrol quando comparadas com vinhos tintos como o Cabernet Sauvignon (0,09 µg/mL – *Vitis vinifera*) e o Pinot Noir (0,21–0,23 µg/mL – *Vitis vinifera*) ambos produzidos na California, EUA (Lamuella-Raventós *et al*, 1993).

A atividade antioxidante de derivados fenólicos e flavonóides derivados de plantas e alimentos tem sido vastamente reportada na literatura (Krings and Berger 2001; McDonald *et al*, 2001; Schuldt *et al*, 2004). Nesta primeira etapa do trabalho, verificamos que as amostras de VT, SU e FAE apresentaram uma significativa atividade antioxidante, visto que as mesmas foram capazes de proteger a desoxirribose e o homogenato de fígado do dano oxidativo, sendo também capazes de inibir a redução do NBT, induzida pelo radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Dentre as amostras que promoveram maior proteção contra as EROS, a FAE, obtida a partir do extrato dealcoolizado (VT), foi eleita para os experimentos subseqüentes.

5.2. Reatividade vascular em aorta torácica e leito arterial mesentérico de ratos

A natureza dinâmica dos vasos sanguíneos - que a muito tempo deixaram de ser encarados como meros condutores de oxigênio e nutrientes para órgãos e tecidos - evidencia claramente que o sistema circulatório é o mais ativo e reativo dos sistemas fisiológicos.

O endotélio vascular exerce uma importante influência na modulação da vasodilatação. Este processo é mediado via liberação de óxido nítrico, produção de prostaciclina e ainda através de um terceiro e importante mecanismo, resistente a inibição simultânea de análogos da NOS e ciclooxigenase, que exerce seu efeito vasodilatador através de uma hiperpolarização sensível a altas concentrações de potássio (Hecker, 2000; Savage *et al*, 2003). Muitos pesquisadores têm assumido uma postura cautelosa (Anderson *et al*, 2001; Lacy *et al*, 2000; Jiang and Dusting, 2001), afirmando que este terceiro mecanismo é promovido por um agente que passaram a denominar de fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF - *endothelium-derived hyperpolarizing factor*). Por outro lado, vários estudos têm apontado o íon potássio ( $K^+$ ), como o verdadeiro responsável pelos efeitos mediados via EDHF (Edwards *et al*, 1998; Hecker, 2000; Dora and Garland, 2001). Outros autores têm ainda apontado alguns candidatos como possíveis EDHF, dentre eles, certos metabólitos do ácido araquidônico (ácidos epoxi-eicosatrienóicos e seus análogos - EETs); o peróxido de hidrogênio e as junções comunicantes ou "gap junctions" (Matoba *et al*, 2000; Goto *et al*, 2000; Matoba *et al*, 2002). Dada a atual controvérsia com relação à identidade do agente promovedor do relaxamento em vasos de pequeno calibre, muitos autores têm simplesmente descrito este mecanismo como um efeito "EDHF-like" (Coleman *et al*, 2001; Savage *et al*, 2003).

Os polifenóis, presentes em plantas de uso medicinal e também em bebidas como a erva mate e o vinho, apresentam uma efetiva atividade vasodilatadora (Fitzpatrick *et al*, 1995; Andriambeloson *et al*, 1997; Wazlawik *et al*, 1997; Schuldt *et al*, 2000). Visto que a FAE é composta por uma grande mistura de ácidos fenólicos e flavonóides aos quais são atribuídos efeitos vasodilatadores e hipotensores,

realizamos vários protocolos testando o VT e principalmente a FAE, na aorta e também no leito arterial mesentérico (LAM) de ratos normotensos.

Na figura 2, temos os primeiros protocolos realizados com a FAE, em anéis de aorta torácica. Visto que a FAE apresenta uma série de compostos com conhecida atividade vasorelaxante (Duarte *et al.*, 1993; Chen e Pace-Asciak, 1996, Guerrero *et al.*, 2001), esperava-se que FAE promovesse o efetivo relaxamento destas preparações. No entanto, ao contrário do esperado, a FAE não promoveu um relaxamento importante neste tipo de preparação isolada, nem nas maiores concentrações utilizadas. Um dos possíveis motivos que podem explicar tal efeito, reside no fato de a FAE apresentar uma expressiva concentração de ácido gálico em sua composição. De acordo com a tabela 2, podemos constatar que, dentre todos os compostos quantificados no HPLC, o ácido gálico encontra-se em maior concentração na amostra da FAE. Neste sentido, nossos resultados vão ao encontro de um estudo realizado por Sanae e colaboradores, o qual demonstrou que o ácido gálico aumenta a resposta vasoconstritora da fenilefrina, além de inibir o vasorelaxamento induzido pela acetilcolina e pelo nitroprussiato de sódio, em aorta torácica de ratos (Sanae *et al.*, 2002).

A partir dos resultados obtidos no vaso de condutância, passamos a investigar o efeito de VT mas, principalmente da FAE, em vasos de pequeno calibre.

Na figura 3 estão representadas as CCR ao VT e à FAE, em leito arterial mesentérico. Ao contrário do resultado obtido em anéis de aorta, o VT e, principalmente a FAE, promoveram um vasorelaxamento bastante significativo nestas preparações. A partir dos compostos majoritários de VT e da FAE representados na tabela 2, podemos constatar que a FAE apresenta uma concentração maior de ácidos fenólicos e flavonóides, quando comparada com VT.

Esta maior concentração de compostos possivelmente foi responsável pelo maior relaxamento do LAM, induzido pela FAE. Em se tratando de um extrato bruto, VT muito provavelmente apresenta certos componentes que poderiam estar interferindo na diminuição da pressão de perfusão do LAM. Esta interferência dar-se-ia pela presença de algum composto com atividade vasoconstritora ou ainda devido à associação de algum composto importante para o efeito vasorelaxante, a um polifenol, diminuindo sua atividade.

Fazendo uma análise comparativa dos efeitos da FAE na aorta e no LAM, resolvemos dar continuidade ao nosso estudo investigando quais seriam as vias mais relevantes em relação à atividade supra citada. Para isso, efetuamos alguns protocolos nos quais foram realizadas CCR à FAE, na ausência e na presença de algumas drogas e soluções inibidoras, atuantes na via L-arginina/NO e canais de potássio.

O gráfico da figura 4, ilustra as CCR realizadas na ausência e na presença de diferentes concentrações de  $K^+$ . Além disso, em um dos protocolos, além da concentração elevada de  $K^+$  (KCl 40 mM), adicionamos ainda o L-NOARG à solução fisiológica de Krebs despolarizante. Conforme podemos observar, a presença de altas concentrações de  $K^+$  causou um significativo desvio da CCR à FAE para a direita (Tabela 4). Este efeito pôde ser ainda melhor evidenciado quando adicionamos o L-NOARG à solução despolarizante.

Nas duas CCR acima mencionadas, podemos afirmar que a FAE promoveu um efeito *EDHF-like*, pois ao adicionarmos o  $K^+$  em grandes concentrações e inibirmos com isso, a via EDHF, o efeito vasorelaxante da FAE tornou-se notadamente menor (Tabela 4). No entanto, a via do NO parece também ser

importante para o efeito da FAE pois quando adicionamos o análogo da NOS, o L-NOARG, ocorreu uma diminuição ainda maior do efeito da FAE.

De acordo com a tabela 1, a FAE é formada por vários compostos, dentre eles ácidos fenólicos, resveratrol e flavonóides como a quercetina. Em um estudo realizado por Martin e colaboradores (2002), o resveratrol e a quercetina foram capazes de promover o aumento da concentração de cálcio intracelular pela inibição das enzimas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases do retículo endoplasmático das células endoteliais. Desta forma, o aumento do cálcio promoveu, em última análise, o aumento da produção de NO nestas células, favorecendo o vasorelaxamento subsequente da musculatura lisa. A figura 4 demonstra também as CCR à FAE, obtidas na presença individual de L-NOARG ou ODQ, ambas drogas inibidoras da via L-arginina/NO. De acordo com o gráfico, a via L-arginina/NO tem um papel relevante na atividade da FAE, visto que, na presença destas drogas, ocorreu um significativo deslocamento da CCR à FAE para a direita.

Alguns autores têm descrito a via EDHF como a via mais importante no relaxamento de vasos de pequeno calibre. Estes mesmos estudos afirmam ainda que as prostaciclina e principalmente o NO desempenham um papel relativamente menor quando comparado à via EDHF (Parkington *et al*, 2002; Busse *et al*, 2002; Dabisch *et al*, 2004). Em nossos experimentos, assim como na literatura, também evidenciamos que o relaxamento induzido pela acetilcolina, promoveu pouca alteração quando o efeito do NO foi abolido. Por outro lado, a inibição da via EDHF, tornou o relaxamento induzido pelo agonista substancialmente menor quando comparado com o controle (Figura 7). Neste contexto, analisando conjuntamente todas as CCR à FAE da figura 4 e os relaxamentos induzidos pela acetilcolina na

figura 7, constatamos que, ao contrário do agonista muscarínico, a FAE parece exercer sua atividade de uma forma muito mais dependente da liberação de NO.

Para uma investigação mais apurada em relação a principal via de atuação da FAE, realizamos outros protocolos experimentais, onde as CCR à FAE foram realizadas na ausência e presença de drogas atuantes em canais de potássio, a saber: a glibenclamida, inibidor de canais de potássio dependentes de ATP ( $K_{ATP}$ ); a ouabaína, inibidor da bomba de  $Na^+/K^+$ -ATPase; o tetraetilamônio (TEA), inibidor não-seletivo de canais de potássio, o cloreto de bário, inibidor de canais de potássio retificadores para influxo ( $K_{IR}$ ), a charibdotoxina (ChTx), inibidor não-seletivo de canais de potássio ativados pelo cálcio ( $K_{Ca}$ ), de média e alta condutância; e a apamina, inibidor seletivo de canais de potássio ativados pelo cálcio ( $K_{Ca}$ ), de baixa condutância. Nesta etapa dos resultados, a ouabaína e o TEA, inibiram significativamente a diminuição da pressão de perfusão induzida pela FAE (Figura 5A), efeito que pode ser confirmado pelos valores de  $CI_{50}$  e  $IC_{95\%}$  da Tabela 4. Ainda de acordo com a mesma tabela, a glibenclamida não teve efeito sobre a atividade da FAE. Em um trabalho realizado por Edwards e colaboradores, o relaxamento atribuído ao EDHF foi significativamente inibido pela ouabaína, em artérias mesentéricas e hepáticas de ratos. De acordo com estes autores, o efluxo de  $K^+$  das células endoteliais, através de canais de potássio ativados pelo cálcio ( $K_{Ca}$ ), estimula a hiperpolarização da musculatura lisa vascular subjacente. Esta hiperpolarização ocorre através da ativação dos canais de potássio retificadores para influxo ( $K_{IR}$ ), e da bomba de  $Na^+/K^+$ -ATPase, ambos presentes nas células lisas vasculares (Edwards *et al*, 1998). Alguns pesquisadores afirmam, por outro lado, que os canais  $K_{IR}$  não necessariamente estariam localizados nas células lisas vasculares para promover a hiperpolarização. Segundo estes pesquisadores, o

efluxo de potássio via canais  $K_{Ca}$ , pode ativar de maneira autócrina, os canais  $K_{IR}$  presentes no endotélio. Desta forma, através de uma amplificação de sinal feita por intermédio das junções comunicantes, a hiperpolarização das células endoteliais se estenderia até as células lisas vasculares, promovendo a hiperpolarização destas e conseqüentemente, o relaxamento dos vasos (Doughty *et al*, 1999; Lacy *et al*, 2000; Dora and Garland, 2001; Busse *et al*, 2002).

Tomando como base os trabalhos supra citados, quando investigamos o efeito da FAE na presença simultânea de cloreto de bário e ouabaína (Figura 5B), obtivemos um valor de CI50 muito próximo ao valor obtido nos protocolos onde utilizamos somente o krebs despolarizante, com altas concentrações de  $K^+$  (KCl 80 mM). Tal resultado estabelece, novamente, o envolvimento da via EDHF no vasorelaxamento induzido pela FAE.

Alguns trabalhos têm postulado que os flavonóides são capazes de abrir canais de potássio do tipo  $K_{Ca}$  (Li *et al*, 1997; Naderali *et al*, 1997). Através de um experimento de eletrofisiologia realizado com oócitos da espécie *Xenopus laevis*, certos pesquisadores verificaram que os flavonóides cujas estruturas químicas apresentam duas hidroxilas no primeiro anel, uma hidroxila no segundo anel e ainda um íon hidrogênio e uma hidroxila no terceiro anel, foram bastante eficazes na abertura de canais de potássio do tipo  $K_{Ca}$  (Li *et al*, 1997). A estrutura química apontada pelo estudo eletrofisiológico, que mais favoreceu a passagem do potássio através dos canais  $K_{Ca}$  (também conhecidos como canais maxi- $K^+$  ou  $BK_{Ca}$ ), é bastante semelhante à quercetina, flavonóide presente na fração utilizada em nosso estudo. O resveratrol promove também a abertura de canais de potássio do tipo  $k_{Ca}$ , em células endoteliais humanas. O aumento do efluxo de  $K^+$  após a ativação dos canais  $K_{Ca}$  pelo resveratrol, aumenta a concentração desse cátion no espaço

mioendotelial com consequente hiperpolarização das células lisas vasculares (Li *et al.*, 2000).

A partir dos estudos descritos na literatura, os quais apontam uma possível atividade dos compostos presentes no vinho e também na FAE, sobre canais  $K_{Ca}$ , resolvemos investigar a relevância destes canais e sua relação com o mecanismo de ação da FAE, no LAM. Neste contexto, ao contrário do esperado, não foi possível estabelecer uma relação direta de efeito da FAE via abertura destes canais, uma vez que a inibição dos canais  $K_{Ca}$ , não impediu de forma significativa, o relaxamento induzido pela FAE, nestas preparações (Figura 5B). O não deslocamento da CCR à FAE para a direita, na presença de ChTx e apamina, pode ter ocorrido em função da baixa concentração de ambos os inibidores, os quais foram administrados em concentrações nanomolares e portanto, muito inferiores às concentrações utilizadas para as demais drogas. No entanto, um estudo recente demonstrou que a administração simultânea de charybdotoxina e apamina, promove uma significativa redução da atividade vasorelaxante de um determinado extrato de vinho tinto, em LAM de ratos; o mesmo estudo demonstrou ainda, que a administração de ambos os inibidores, juntamente com um inibidor clássico da NOS, o L-NAME, resulta numa potencialização deste mesmo efeito (Soares de Moura *et al.*, 2004). Em nosso estudo não foi possível avaliar o efeito da FAE na presença simultânea dos três inibidores supra citados. Todavia, analisando individualmente as CCRs, obtidas na presença de L-NOARG e/ou altas concentrações de  $K^+$  (Figura 4), sugerimos que o efeito da FAE possa ocorrer devido a uma combinação de diferentes mecanismos. A FAE, por intermédio do sequestro de EROs, atua de forma a aumentar a concentração e a meia vida do NO. O NO, por sua vez, sendo capaz de modular a abertura de canais  $K_{Ca}$  presentes em células endoteliais (Brakemeier *et al.*, 2003),

atuaria de maneira autócrina sobre estes canais, favorecendo o efluxo de potássio, a hiperpolarização das células lisas vasculares subjacentes e o subsequente relaxamento vascular.

A Figura 6 mostra que, com exceção do discreto relaxamento induzido pela quercetina nas maiores doses, o resveratrol e os ácidos fenólicos - ácido gálico, cinâmico e clorogênico - não promoveram qualquer efeito vasodilatador sobre o leito arterial mesentérico. Em relação ao ácido gálico, especificamente, chegamos até a evidenciar um pequeno efeito contrátil do mesmo sobre as preparações testadas. Neste contexto, muito embora a atividade vasoconstritora do ácido gálico tenha sido verificada somente nos experimentos com o LAM, tal efeito poderia explicar, ao menos em parte, a baixa atividade vasorelaxante da FAE, nos experimentos realizados com preparações isoladas de aorta torácica (Figura 2). Apesar dos ácidos fenólicos serem conhecidos devido ao seu alto poder antioxidante (pela presença de radicais hidroxila nas moléculas), a atividade da FAE no LAM parece estar diretamente relacionada com compostos arrançados numa configuração do tipo C6-C3-C6, (configuração geral dos flavonóides). Além disso, não podemos descartar que a FAE exerça sua atividade vasorelaxante através de um sinergismo químico-farmacológico entre seus componentes.

### 5.3. Tratamento crônico: atividade da FAE em camundongos LDLR KO:

Muitos estudos que buscam determinar as mais variadas atividades biológicas de polifenóis, são realizados através de ensaios *in vitro*, os quais necessitam, portanto, a investigação e comprovação de efeitos através de experimentos *in vivo*. Os recentes avanços das técnicas de biologia molecular têm permitido o acesso as mais diferentes investigações, dentre elas, a utilização de modelos animais, mais

especificamente camundongos *knockout*, para diferentes enzimas e receptores (Praticô *et al*, 2000; Zabalawi *et al*, 2003).

Em nosso estudo, realizamos um tratamento crônico durante um período de doze semanas, utilizando camundongos machos C57BL/6, com ablação gênica para receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDLR KO).

Com o objetivo de verificar se as diferentes dietas e tratamentos empregados poderiam de alguma forma exercer influência sobre os parâmetros fisiológicos destes animais, a ingesta alimentar e o peso dos camundongos foram anotados semanalmente, para posterior interpretação.

Analisando o histograma da figura 8A, podemos constatar que o grupo FAE 3 ingeriu uma quantidade maior de alimento, quando comparado ao grupo CCD, sendo que essa diferença foi mais expressiva no terceiro e último mês de tratamento. Essa maior ingestão de DH do grupo FAE 3, no entanto, não promoveu neste mesmo grupo, um aumento de peso significativo, visto que a média de peso do grupo FAE 3 foi semelhante às médias do grupo CSD, ao longo dos três meses de tratamento (Figura 8B). O grupo FAE 3, portanto, manteve o peso estável durante todo o tratamento, ao nível do grupo que não recebeu a DH. Por outro lado, ao compararmos o peso dos animais dos grupos CSD e CCD, podemos verificar que ocorreu um claro aumento de peso dos animais referentes ao grupo CCD.

Este resultado é muito relevante pois comprova que a diminuição da colesterolemia verificada no grupo FAE 3, demonstrada nos resultados subsequentes, deve-se, portanto, a outro fator que não, simplesmente, a uma diminuição de peso deste mesmo grupo, em consequência de uma menor ingestão de alimento.

Com relação ao grupo CP, muito embora a ingesta alimentar tenha sido semelhante ao grupo FAE 3, o tratamento com a sinvastatina (1,0 mg/Kg/dia), favoreceu a um aumento de peso, superior inclusive ao grupo CCD.

Em nosso estudo, optamos pela administração da sinvastatina devido a sua frequente utilização na clínica (Bea *et al*, 2003; Deedwania *et al.*, 2005; van Wijk *et al.*, 2005). De acordo com Johnston e colaboradores, a eficácia das estatinas em promover a diminuição dos níveis lipídicos do plasma, está correlacionada positivamente com a sua hidrossolubilidade. A sinvastatina, assim como a atorvastatina e a lovastatina, são estatinas pouco solúveis em água, obedecendo a seguinte ordem, de acordo com sua hidrossolubilidade: atorvastatina>sinvastatina>lovastatina (Johnston *et al*, 2001). Em nosso experimento, também observamos a baixa hidrossolubilidade deste fármaco. Neste sentido, para a administração ideal de nosso controle positivo nos camundongos LDLR KO, dissolvemos a droga em Tween 80 (0,01%). Muito embora tenhamos conseguido dissolver facilmente a sinvastatina na baixa concentração de Tween 80 mencionada, o aumento de peso do grupo CP pode ser devido a uma diminuição na biodisponibilidade da sinvastatina, relacionada a sua baixa hidrossolubilidade. Além da baixa solubilidade em água, o pouco efeito da sinvastatina sobre o peso dos animais e níveis lipídicos, pode ser ainda somada ao fato de a sinvastatina ser uma lactona inativa, ou seja, uma pró-droga, que necessita ser hidroxilada para exercer sua atividade (Johnston *et al*, 2001).

Na figura 9 estão representadas as médias e EPM referentes às dosagens de CT e TAG realizadas ao fim dos três meses de tratamento. De acordo com o histograma da figura 9A, no grupo FAE 3 ocorreu uma diminuição nos níveis de CT, quando comparado ao grupo controle CCD. Além disso, o tratamento crônico com a

FAE no grupo FAE 3, foi capaz de manter os níveis de CT próximos ao do grupo CSD. De acordo com um estudo realizado por Pal e colaboradores (2002), um determinado extrato dealcoolizado de vinho tinto foi capaz de inibir em 50% a secreção de apolipoproteínas B100 (apoB100), em hepatócitos humanos. Os mesmos autores verificaram também que o extrato do vinho impediu o acúmulo de colesterol intracelular, na sua forma livre e esterificada. Visto que a apoB100 é uma das principais apolipoproteínas das VLDL, a diminuição da secreção das apoB100, diminuiu, em última análise, a liberação desta lipoproteína, e, conseqüentemente, do colesterol, para o plasma (Boren *et al*, 1994; Mohammadi *et al*, 1998; Pal *et al*, 2002). Em outro estudo feito por Borradaile e colaboradores (2002), alguns flavonóides presentes na soja e em frutas cítricas, foram capazes de diminuir a secreção de apoB100 do fígado, sendo que esta diminuição foi atribuída a uma degradação das apoB100.

Analisando simultaneamente os baixos níveis de CT do grupo FAE 3 (da figura 9A), com os resultados obtidos na dosagem de VLDL (Figura 10B), podemos sugerir que nossos resultados vão ao encontro dos trabalhos supra citados. Os polifenóis presentes na FAE poderiam ter influenciado a secreção das apoB100 as quais, por sua vez, não estariam sendo devidamente incorporadas às partículas de VLDL. Desta forma, tal qual verificamos em nossas dosagens, os níveis de VLDL no plasma estariam significativamente diminuídos. Visto que a VLDL é convertida em LDL no plasma, a diminuição das VLDL acarreta em uma diminuição subsequente nos níveis de LDL, no plasma destes animais.

O receptor hepático de LDL é o mais importante carreador de colesterol da circulação sanguínea e sua interação com as apoB100, presentes nas LDL, faz com que estas lipoproteínas permaneçam distantes dos sítios aterogênicos (Brown and

Goldstein, 1998). Neste contexto, de acordo com Pal e colaboradores, os compostos fenólicos existentes no vinho promovem seus efeitos de forma semelhante às estatinas. Os compostos fenólicos aumentam a expressão de receptores para LDL, inibem reversivelmente a HMG-CoA redutase (enzima geradora de colesterol) e, conforme já foi mencionado, degradam as apoB100 inibindo a sua incorporação em VLDL e liberação pelas células do fígado (Pal *et al*, 2002).

A partir do entendimento de que, a incorporação das partículas de LDL, via interação do receptor de LDL com a apoB100, é fundamental para um dos mecanismos de ação propostos aos componentes da FAE e, analisando os resultados obtidos em nosso estudo, como explicar a significativa diminuição nos níveis de colesterol total, triacilgliceróis, LDL e VLDL do grupo FAE 3, em camundongos *knockout* para o receptor de LDL?

Um fator importante e diferencial, que pode explicar grande parte dos resultados obtidos em nosso modelo experimental, diz respeito ao metabolismo de lipídios, em roedores. O fígado de ratos e camundongos produz duas versões de apoLP B, que são: apoB100 e apoB48, ambas incorporadas em VLDL (Chan, 1992; Higuchi *et al*, 1992). Em humanos, ratos e camundongos, as partículas de VLDL portadoras de apoB100, originam partículas remanescentes (lipoproteínas de densidade intermediária - IDL), as quais são removidas do plasma, principalmente pelos receptores de LDL. Entretanto, no fígado de ratos e camundongos, também ocorre a produção de VLDL que contém apoB48, sendo que, em humanos, esta última é encontrada somente nos quilomicrons (Chan, 1992; Higuchi *et al*, 1992). As VLDL constituídas de apoB48, assim como os quilomicrons, originam, em camundongos e ratos, remanescentes que podem ser captados por um segundo receptor, denominado receptor de remanescentes de quilomicrons - RRQ (Mahley,

1988; Brown *et al*, 1991). Os remanescentes dos quilomicrons e das VLDL que contém apoB48 são removidos rapidamente do plasma, mesmo na ausência dos receptores de LDL, não originando, portanto, concentrações consideráveis de LDL na circulação (Kita *et al*, 1982; Catanozi *et al*, 2003).

Analisando conjuntamente os histogramas da figura 9B e figura 10B, podemos observar que em ambos os resultados, todos os grupos tratados com a FAE (via gavagem) promoveram uma significativa diminuição nos níveis de triacilgliceróis e VLDL, respectivamente. Visto que os triacilgliceróis são encontrados em maior concentração nos quilomicrons e nas partículas de VLDL, os compostos presentes na FAE, através dos mecanismos propostos, parecem atuar conjuntamente com a via alternativa de metabolização de lipídios. A FAE, promovendo a inibição da enzima HMG-CoA redutase no interior dos hepatócitos, favoreceria a uma diminuição da síntese do colesterol. Além disso, a FAE, atuando na degradação de apoB100, favoreceria uma maior interação de VLDL e quilomicrons remanescentes, via apoB48. Este fato, em última análise, permitiria uma maior incorporação de triacilgliceróis e de colesterol total pelas células e, finalmente, favoreceria a diminuição nos níveis de LDL, no plasma destes animais.

O índice aterogênico é um importante parâmetro, que permite verificar o risco de doença cardiovascular em humanos (Vinson *et al*, 2001). Tomando como base a equação do índice aterogênico: nível de colesterol total/nível de HDL, um indivíduo adulto, com níveis de colesterol e HDL normais (200 mg/dL de CT; 40 mg/dL de HDL), teria um índice aterogênico correspondente a 5,0. De acordo com um estudo realizado por Vinson e colaboradores, o tratamento crônico com suco de uva e vinho, diminuiu significativamente os níveis de LDL e colesterol total em hamsters. Por outro lado, não ocorreram diferenças significativas com relação aos níveis de

HDL, no grupo tratado com o extrato de vinho tinto, quando comparado com o grupo controle. Entretanto, os pesquisadores, tomando como base a equação citada acima, verificaram que o índice aterogênico dos hamsters que receberam o suco de uva, atingiu o valor de 4,31. Em nosso experimento, o grupo FAE 3 também atingiu um índice aterogênico quase idêntico ao trabalho citado, no valor de 4,35. Por outro lado, os grupos CCD, FAE 10 e FAE 30 atingiram valores mais altos em relação ao grupo FAE 3: 6,85, 6,84 e 6,60, respectivamente. A FAE em baixas doses é, portanto, capaz de diminuir os níveis de colesterol, mantendo estáveis os níveis de HDL, em nosso modelo experimental.

Na figura 11A e 11B, temos representadas as CCRc ao agonista  $\alpha$ -adrenérgico, a fenilefrina, nos diferentes grupos de camundongos LDLR KO. Nestes experimentos, observamos que os grupos CSD, SD + FAE, FAE 3 e CP, foram mais responsivos à fenilefrina, quando comparados às preparações do grupo CCD. Por outro lado, nos grupos experimentais FAE 10 e FAE 30 ocorreu uma visível diminuição da contração induzida pela fenilefrina, semelhante ao grupo CCD. De acordo com nossos resultados, o tratamento crônico com a FAE, em baixas doses, parece ter poupado a musculatura lisa vascular, dos efeitos provocados pela DH. De fato, durante o procedimento de dissecação dos vasos nos grupos CCD, FAE 10 e FAE 30 observamos claramente que os depósitos de gordura localizavam-se não somente no arco aórtico mas também em alguns pontos da aorta torácica e abdominal destes animais. O acúmulo de placas de gordura ao longo da aorta comprometeu, portanto, o efeito contrátil da fenilefrina nestas preparações (Figura 11). Tal efeito pode ser melhor evidenciado através dos valores de relaxamento máximo dos diferentes grupos, representados na tabela 5. Nesta tabela, embora os valores de CI50 + IC95% dos grupos CCD e FAE 10 sejam inferiores com relação ao

FAE 3, não ocorreu uma correlação positiva entre valores de IC50 e relaxamento máximo.

O sério comprometimento da musculatura lisa vascular nos camundongos LDLR KO pôde ser melhor evidenciado nos experimentos realizados com o agonista colinérgico muscarínico, a acetilcolina (figura 12A e 12B).

Tomando como base um estudo morfológico realizado por Jorge e colaboradores, segmentos de aortas de coelhos hipercolesterolêmicos foram analisados através de microscopia eletrônica. Paralelamente, assim como em nossos experimentos com os camundongos LDLR KO, a função endotelial destes segmentos vasculares foi verificada através da realização de curvas concentração-resposta à acetilcolina. Os autores constataram que, ainda em estágios iniciais de uma dieta rica em colesterol, ocorre uma evidente disfunção endotelial sem qualquer alteração morfológica do endotélio ou da íntima arterial. Tal constatação sugere que a alteração mais precoce na aterogênese é a disfunção endotelial (Jorge, 1997).

Em nossos experimentos, o número reduzido de camundongos LDLR KO não nos permitiu realizar cortes histológicos nos diferentes grupos, ainda nos estágios iniciais do tratamento. No entanto, ao final dos três meses, foram realizadas CCRc à acetilcolina em todos os grupos experimentais. Assim como no trabalho descrito acima, verificamos que o acúmulo de gordura sob a forma de placas, comprometeu significativamente a camada de células endoteliais de todos os grupos que receberam a DH, prejudicando conseqüentemente o relaxamento endotélio-dependente do agonista. Entretanto, embora a formação de placas de gordura tenha ocorrido em todos os grupos que receberam a DH, nas CCRc à acetilcolina, realizada nos segmentos de aorta do grupo FAE 3, ocorreram níveis de relaxamento bastante próximos ao grupo CSD (Figura 12A e 12B).

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram os efeitos de uma fração rica em polifenóis, obtida a partir de um vinho tinto fabricado no oeste do estado de Santa Catarina. A FAE, através dos diferentes protocolos realizados ao longo desta investigação, revelou alguns efeitos biológicos importantes:

- Promove uma efetiva atividade antioxidante, comprovada nos ensaios bioquímicos *in vitro*;
- Apresenta uma atividade vasorelaxante sobre vasos de pequeno calibre, mais precisamente, sobre o leito arterial mesentérico de ratos normotensos. Com relação ao mecanismo de ação da FAE, os resultados obtidos estabelecem uma relação direta entre aumento da biodisponibilidade do NO e sua atuação sobre canais de potássio e subsequente hiperpolarização;
- Atividade hipolipidemiante na menor dose utilizada (3 mg/kg), verificada após tratamento crônico em camundongos LDLR KO, submetidos à DH. As maiores doses da FAE (10 e 30 mg/kg), não promoveram a mesma atividade, possivelmente devido a uma atividade pró-oxidante dos componentes da FAE;

Muitos estudos têm relatado que a associação de drogas redutoras do colesterol plasmático e substâncias antioxidantes, seja uma proposta lógica para a reversão de doenças de origem cardiovascular. Inúmeros trabalhos, das mais

diversas fontes, têm ainda apontado os "produtos de origem natural", como efetivos promovedores de saúde e bem estar, sem mínimas contra-indicações. Neste contexto, visto se tratar de um produto de ampla comercialização e aceitação popular, o presente estudo pretendeu esclarecer alguns pontos relacionados às efetivas e reais atividades atribuídas aos compostos presentes na uva e vinho tinto.

\* \* \* \* \*

## 6. Referências Bibliográficas

Amarante JOA de. Vinhos do Brasil e do Mundo para conhecer e beber. São Paulo: *Summus*, 1983.

Ames RP. The effects of antihypertensive drugs on serum lipids and lipoproteins. *Drugs*, 1986, 32: 260-278.

Anderson TJ. Endothelial function. Introduction, *Coron. Artery Dis.* 2001, 12: 431-433.

Andreassi MG. Coronary arteriosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. *Mutation Res.* 2003, 543: 67-86.

Andriambelison E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Nitric Oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 1997, 120: 1053-1058.

Araim O, Ballantyne J, Waterhouse AL, Sumpio BE. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation with red wine and red wine polyphenols. 2002, 35: 1226-1232.

Aviram M, Fuhrman B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2002, 957: 146-161.

Bagchi D, Bagchi M, Sthos SJ, Ray SD, Sem CK, Preuss HG. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Ann N Y Acad. Sci.* 2002, 957: 260 - 270.

- Baht KPL, Kosmeder II JW, Pezzuto JM. Biological Effects of Resveratrol. *Antiox Redox Signal*. 2001, 3(6): 1041-1064.
- Bea F, Blessing E, Shelley MI, Schultz JM, Rosenfeld ME. Simvastatin inhibits expression of tissue factor in advanced atherosclerotic lesion of apolipoprotein E-deficient mice independently of lipid lowering: potential role of simvastatin-mediated inhibition of Egr-1 expression and activation. *Atherosclerosis*, 2003, 167: 187-194.
- Beretz A, Briancon-Scheid F, Stierle A, Corre G, Anton R, Cazenave JP. Inhibition of human platelet cyclic AMP phosphodiesterase and of platelet aggregation by a semisynthetic flavonoid amentoflavone hexaacetate. *Biochem Pharmacol*. 1986, 35(2): 257-262.
- Boren J, Rustaeus S, Olofsson SO. Studies on the assembly of apolipoprotein B<sub>100</sub> and B<sub>48</sub> containing very low density lipoprotein in McArdle RH-7777 cells. *J. Biol. Chem*. 1994, 269: 25879-25888.
- Borradaile NM, de Breu LE, Wilcox LJ, Edwards JY, Huff MW. Soya phytoestrogens, genistein and daidzein, decrease apolipoprotein B secretion from HepG2 cells through multiple mechanisms. *Biochem J*. 2002, 366: 531-539.
- Bowry VW, Mohr D, Cleary J, Stocker R. Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. *J. Biol. Chem*. 1995, 270 (11): 5756-5763.
- Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986, 232: 34-47.
- Brown MS, Hertz J, Kowal RC, Goldstein JL. The low density lipoprotein receptor-related protein: double agent or de decoy? *Curr. Opin. Lipidol*. 1991, 2: 65-72.

Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston A. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol. Sci.* 2002, 23 (8): 374-380.

Catanozi S, Rocha JC, Nakandakare, ER, Passarelli M, Mesquita CH, Silva AA, Dolnikoff MS, Harada LM, Quintão ECR, Heimann JC. The rise of the plasma lipid concentration elicited by dietary sodium chloride restriction in Wistar rats is due an impairment of the plasma triacylglycerol removal rate. *Atherosclerosis*, 2001, 158: 81-86.

Catanozi S, Rocha JC, , Passarelli M, Guzzo ML, Alves C, Furukawa LNS, Nunes VS, Nakandakare, ER, Heimann JC, Quintão ECR. Dietary sodium chloride restriction enhances aortic wall lipid storage and raises plasma lipid concentration in LDL receptor knockout mice. *J. Lip. Res.* 2003, 44: 727-732.

Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, Cohen RA. Chronic inhibition od nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler. Thromb.* 1994, 14: 753-759.

Chan L. Apolipoprotein B, the major protein component of tryglyceride-rich and low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 1992, 267: 25621-25624.

Chan MM, Mattiacci JA, Hwang H, Shah A, Fong D. Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochem Pharm* 2000, 60: 1539-1548.

Chen CK, Pace-Asciak CR. Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *Gen. Pharmacol.* 1996, 27: 363-366.

Chen H, Tappel A. Protection by multiple antioxidants against lipid peroxidation in rat liver homogenate. *Lipids* 1996, 31 (1): 47-50.

Chun YJ, Kim MY, Guengerich FP. Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999, 262: 20-24.

Coleman HÁ, Tare M, Parkington HC. EDHF is not K<sup>+</sup> but may be due to spread of current from the endothelium in guinea pig arterioles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001, 280 (6): H2478-2483.

Collins R, Peto R, Macmahon S, Herbert P, Fiebach NH, Eberlein KA, Goldwin J, Qizilbash N, Taylor JO, Hennekens CH. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, short-term reductions in blood pressure; overview of randomized drug trials in their epidemiological context. *Lancet* 1990, 335: 827-838.

Corder R, Douthwaite JÁ, Lees DM. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature.* 2001, 414 (6866): 863-864.

Crook ED, Flack JM, Salem M, Salahudeen AK, Hall J. Primary renal disease as a cardiovascular risk factor. *Am. J. Med. Sci.* 2002, 234 (3): 138-145.

Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Meth.* 2002, 265: 49-72.

Dabisch PA, Liles, JT, TaylorJT, Sears, BW, Saenz R, Kadowitz PJ. Role of potassium channels in the nitric oxide-independent vasodilator response to acetylcholine. *Pharmacol. Res.* 2004, 49: 207-215.

Davingnon J, Cohn JS. Triglycerides: a risk factor for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1996, 124: S57-S64.

Dell'Agli M, Buscialà A, Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovas. Res.* 2004, 63: 593-602.

Demiryurek AT, Cakici I, Kanzik I. Peroxynitrite: a putative cytotoxin. *Pharmacol. Toxicol.* 1998, 3: 113-117.

Dora KA, Garland CJ. Properties of smooth muscle hyperpolarization and relaxation to K<sup>+</sup> in the rat isolated mesenteric artery. *Am. J. Physiol. Heart Physiol.* 2001, 280: H2424-H2429.

Doughty JM, Plane F, Langton PD. Charybdotoxin and apamin block EDHF in rat mesenteric artery if selectively applied to the endothelium. *Am J Physiol.* 1999, 276: 1107-1112.

Dragsted LO, Strube M, Larsen JC. Cancer protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. *Pharmacol. Toxicol.* 1993, 72 (1): 116-135.

Drummen GPC, Makkinje M, Verkleij AJ, Op den Kamp, JAF, Post JÁ. Attenuation of lipid peroxidation by antioxidants in rat-1 fibroblasts: comparison of the lipid peroxidation reporter molecules *cis*-parinaric acid and C11-BODIPY<sup>581/591</sup> in a biological setting. *Biochem. Biophys. Acta*, 2004 (*in press*).

Duarte J, Pérez Vizcaíno F, Utrilla P, Jiménez J, Tamargo J, Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen. Pharmacol.* 1993, 24 (4): 857-862.

Ealton SB, Konner M. Paleolithic nutrition. A consideration for its nature and current implications. *N. Engl. J. Med.* 1985, 312 (5): 283-289.

Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature.* 1998, 396: 269-272.

Fekete S. Animal models in experimental atherosclerosis: a critical review. *Acta Vet. Hung.* 1993, 41 (1-2): 3-9.

Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Ricci T, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. *J. Cardiovasc Pharmacol.* 1995, 26: 90-95.

Fleming WW, Westphall DP, de la Lande IS, Jellet LB. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1972, 181: 339-345.

Frankel EN, Waterhouse AL, Teissedre PL. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43: 890-894.

Frankel EN, Meyer AS. Antioxidants in grapes and grape juices and their potential health effects. *Pharm. Biol.* 1998, 36: 14-20.

Fuhrman B, Volkova N, Suraski A, Aviram M. White wine with red wine-like properties: increased extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidant capacity of the derived white wine. *J. Agr. Food Chem.* 2001, 49: 3164-3168.

Fuhrman B, Aviram M. Preservation of paraoxonase activity by wine flavonoids. Possible role in protection of LDL from lipid peroxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 2002, 957: 321-324.

Galato D, Ckless K, Susin MF, Giacomelli C, Ribeiro-do-Valle RM, Spinelli A. Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: correlation among electrochemical,

visible spectroscopy methods and structure-antioxidant activity. *Redox Report* 2001, 6 (4): 243 – 250.

Guerrero MF, Carrón R, Martín ML, San Román L, Reguero MT. Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract from *Croton schiedeanus* Schlecht in rats. *J. Ethnopharm.* 2001, 75: 33-36.

Goto K, Fujii K, Kansui Y, Abe I, Iida M. Critical role of gap junctions in endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric arteries. *Clin Exp. Pharmacol. Phys.* 2000, 29: 595-602.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. *FEBS Letters* 1981, 128: 347-352.

Hansson GK. Inflammation and immune response in atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 1999, 1 (2): 150-155.

Hazen SL, Zhang R, Shen Z, Wu W, Podrez EA, MacPherson JC, Schmitt D, Mitra SN, Mukhopadhyay C, Chen Y, Cohen PA, Hoff HF, Abu-Soud HM. Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes-mediated protein nitration and lipid peroxidation in vivo. *Cir. Res.* 1999, 85: 950-958.

Hecker M. endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Fact or Fiction? *News Physiol. Sci.* 2000, 15: 1-5.

Hen V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczek RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature.* 1998, 391(6667): 591-594.

Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB, Kilbride M, Breitbart RE, Chun M, Schönbeck U. Expression of neutrophil collagenase (matrix

- metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation*. 2001, 104 (16): 1899-1904.
- Higuchi K, Kitagawa K, Kogishi K, Takeda T. Developmental and age-related changes in apolipoprotein B mRNA editing in mice. *J. Lipid Res*. 1992, 33: 1753-1764.
- Husain SR, Cillard J, Cillard P. Hydroxy radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*. 1987, 26: 2489-2492.
- Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest*. 1993, 92: 883-893.
- Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, Burns DK. Massive xanthomatosis in cholesterol-fed low density receptor-negative mice. *J. Clin. Invest*, 1994, 93: 1885-1893.
- Jiang F, Dusting GL. Endothelium-dependent vasorelaxation independent of nitric oxide and K<sup>+</sup> release in isolated renal arteries of rats. *Br. J. Pharmacol*. 2001, 132 (7): 1558-1564.
- Johnston TP, Nguyen LB, Chu WA, Shefer S. Potency of select statin drugs in a new mouse model of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Int. J. Pharm*. 2001, 23 (1-2): 75-86.
- Jorge PAR. Endotélio, lípidos e aterosclerose. *Arq. Bras. Cardiol*. 1997, 68 (2): 129-134.
- Kalin R, Righi A, Del Bosso A, Bagchi D, Generini S, Cerinic MM, Das DK. Activin, a grape seed-derived proanthocyanidin extract, reduces plasma levels of oxidative stress and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin) in systemic sclerosis. *Free Rad. Res*. 2002, 36 (8): 819-825.

- Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, McNamara PM. Serum cholesterol, lipoproteins and the risk of coronary heart disease. *Ann. Intern. Med.* 1971, 74: 1-22.
- Krings U, Berger RG. Antioxidant activity of some roasted foods. *Food Chem.* 2001, 72: 223-229.
- Kita T, Brown MS, Bilheimer DW, Goldstein JL. Delayed clearance of very low density and intermediate density lipoproteins with enhanced conversion to low density lipoprotein in WHHL rabbits. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 1982, 79: 5693-5697.
- Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, Neaton JD, Brancati FL, Ford CE, Shulman NB, Stamler J. Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N. Engl. J. Med.* 1996, 334 (1): 13-18.
- Kritharides L, Stocker R. The use of antioxidant supplements in coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 2002, 164 (2): 211-219.
- Kurokawa K. Salt, kidney and hypertension: why and what to learn from genetic analyses? *Nephron.* 2001, 89 (4): 369-376.
- Lacy PS, Pilkington G, Hanvesakul R, Fish HJ, Boyle JP, Thurston H. Evidence against potassium as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat mesenteric small arteries. *Br. J. Pharmacol.* 2000, 129: 605-611.
- Lamuela-Raventós RM, Waterhouse A. Occurrence of resveratrol in selected California wines by a new HPLC method. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41 (4): 521-523.
- Lemos da Luz , P. [www.drauziovarella.com.br/entrevistas/aterosclerose.asp](http://www.drauziovarella.com.br/entrevistas/aterosclerose.asp) 2004.
- Leopold AC, Ardrey R. Toxic substances in plants and the food habits of early man. *Science.* 1972, 176 (34): 512-514.

Li Y, Starrett JE, Meanwell NA, Johnson G, Harte WE, Dworetzky SI, Boissard CG, Gribkoff VK. The discovery of novel openers of Ca<sup>2+</sup>-dependent large-conductance potassium channels: pharmacophore search and physiological evaluation of flavonoids. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 1997, 7 (7): 759-762.

Li HF, Chen SA, Wu SN. Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> current in vascular endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 2000, 45: 1035-1045.

Libby P, Mach F, Schönbeck U, Bourcier T, Aikawa M. Regulation of the thrombotic potential of atheroma. *Thromb. Haemost.* 1999, 82 (2): 736-741.

Libby P. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. *Am J. Cardiol.* 2000, 86 (8B): 3J-8J.

Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation.* 2001, 104: 365-372.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002, 420: 869-874.

Libby P. Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *Am. J. Cardiol.* 2003, 91:3A-6A.

Lind L. Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2003 169: 203-214.

Lotito S, Frei B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting *in vitro* and *in vivo* effects. *Free Rad. Biol. Med.* 2004; 36 (2): 201-211.

Mach F, Schönbeck U, Libby P. CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis? *Atherosclerosis*, 1998, 137: S89-S95.

- Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, Luster AD. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J. Clin. Invest.* 1999, 104 (8): 1041-1050.
- Mach F, Schönbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40 induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation*, 1997, 96 (2): 396-399.
- MacMahon S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J, Abbot R, Godwin J, Dyer A, Stamler J. blood pressure, stroke, and coronary hearth disease. Part 1, prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet*, 1990, 335: 765-774.
- Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science (Wash, DC)*. 1988, 240:622-630.
- Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, Chopp M. Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1993, 13: 355-358.
- Maraschin M, Passos R, Dias PF, Araujo PS, Oltramari AC, Fontana J, Caro MSB. Isolation and *trans*-resveratrol analysis in Brazilian red wine by <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance. In: (Webb, GA *et al.*, Eds) - *Magnetic resonance in food science – a view to the future*. Royal Soc. Chem. 2000, 136-141.
- Maraschin RP, Caro MSB, Maraschin M. A saúde vem embalada em garrafas de vinho. *Ciência Hoje* 2001, 29 (173): 88-89.
- Martin S, Andriambelason E, Takeda K, Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. *Br. J. Pharmacol.* 2002, 135: 1579-1587.

- Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J. Clin Invest.* 2000, 106: 1521-1530.
- Matoba T, Shimokawa H, Kubota H. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002, 290: 909-913.
- McDonald S, Prenzler PD, Antolovich M, Robards K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chem.* 2001, 73: 73-84.
- Mohammadi A, Macri J, Newton R, Romain T, Dulay D, Adeli K. Effects of atorvastatin on the intracellular stability and secretion of apolipoprotein B in HepG2 cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998, 18 (5): 783-793.
- Naderali EK, Buttell N, Taggart MJ, Bullock AJ, Eisner DA, Wray S. The role of the sarcolemmal Ca<sup>(2+)</sup>-ATPase in the pH transients associated with contraction in rat smooth muscle. *J. Physiol.* 1997, 505 (Pt2): 329-336.
- Naruse K, Shimizu K, Muramatsu M, Toki Y, Miyazaki Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T. Long-term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta: PGH<sub>2</sub> does not contribute to impaired endothelium-dependent relaxation. *Arterioscler. Thromb.* 1994, 14:746- 752.
- Negre-Salvagyre A, Salvagyre R. Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized low-density lipoproteins by macrophages. *Free Rad. Biol. Med.* 1992, 12: 101-106.
- Neel JV, Salzano FM, Junqueira PC, Keiter F, Lewis DM. Studies on the Xavante indians of the Brazilian Mato Grosso. *Am. J. Hum. Gen.* 1964, 16: 52-60.
- Nilsson A, Hansson BG, Hökfelt B. Beta-blockers and lipid metabolism. *Br. Med. J.* 1977, 2: 126.
- Nishida Y, Yoshizawa K, Akamatsu T. Preparation of iron (III) complex with nitrilotriacetic acid and origin of its unique reactivity. *Chem Letters.* 1991, 1521 - 1524.

Niu XL, Yang X, Hoshiai K, Tanaka K, Sawamura S, Koga X, Nakazawa H. Inducible nitric oxide synthase deficiency does not affect the susceptibility of mice to atherosclerosis but increases collagen content of lesions. *Circulation*, 2001, 103: 1115 - 1120.

Oliver WJ, Cohen EL, Neel JV. Blood pressure, sodium intake, and sodium related hormones in the Yanomano indians, a "no-salt" culture. *Circulation*. 1975, 52: 146-151.

Orellana M, Araya J, Guajardo V, Rodrigo R. Modulation of cytochrome P450 activity in the kidney of rats following long-term red wine exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2002, 132 (3): 399-405.

Pace-Asciak CR, Rounova O, Hahn SE, Diamandis EP, Goldberg DM. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy subjects. *Clin Chem Acta*. 1996, 246 (1-2): 163-182.

Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams, RA. Quantitative assessment of atherosclerosis lesions in mice. *Atherosclerosis*. 1987, 68: 231-240.

Pal S, Ho N, Santos C, Dubois P, Mamo J, Croft K, Allister E. Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of apoB100 from human HepG2 cells. *Am. Soc. Nutr. Sci.* 2002, 700-706.

Parkington HC, Chow JM, Evans RG, Coleman HÁ, Tare M. Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular tone in rat mesenteric and hindlimb circulations in vivo. *J. Physiol* 2002, 542: 929-937.

Pekkarinen SS, Heinonen IM, Hopia AI. Flavonoids quercetin, myricetin, kaempferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. *J. Sci. Food Agri.* 1999, 79: 499-506.

- Persinger RL, Poynter ME, Ckless K, Janssen-Heininger YMW. Molecular mechanisms of nitrogen dioxide induced epithelial injury in the lung. *Mol. Cell Biochem.* 2002, 234/235: 71-80.
- Praticô D, Cyrus T, Li H, Fitzgerald GA. Endogenous biosynthesis of tromboxane and prostacyclin in 2 distinct murine models of atherosclerosis. *Blood.* 2000, 96 (12): 3823-3826.
- Psaty BM, Furberg CD. Clinical implications of the World Health Organization-International Society of Hypertension statement on calcium antagonists. *J. Hypertens.* 1997, 15 (11): 1197-1200.
- Rice-Evans CA, Miler NJ. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem. Soc. Trans.* 1996, 24:790-795.
- Robak J, Griglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* 1988, 37: 837-841.
- Rodrigo R, Rivera G. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Rad. Biol. Med.* 2002, 33(3): 409-422.
- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 1999, 340: 115-126.
- Ruf JC. Wine and polyphenols related to platelet aggregation and atherothrombosis. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1999, 25: 125-131.
- Sanae F, Miyaichi Y, Hayashi H. Potentiation of vasoconstrictor response and inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by gallic acid in rat aorta. *Planta Med.* 2002, 68: 690-693.

Santos, RD. III Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Guideline of Atherosclerosis Prevention from Atherosclerosis Department of Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq. Bras. Cardiol.* 2001, 77 (3): 1-48.

Savage D, Perkins J, Hong Lim C, Bund SJ. Functional evidence that K<sup>+</sup> is the non-nitric oxide, non-prostanoid endothelium-derived relaxing factor in rat femoral arteries. *Vascul. Pharmacol.* 2003, 40 (1): 23-28.

Schönbeck U, Mach F, Libby P. CD154 (CD40 ligand) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2000, 32 (7): 687-693.

Schuldt EZ, Ckless K, Simas ME, Farias MR, Ribeiro-Do-Valle RM. Butanolic fraction from *Cuphea carthagenensis* Jacq McBride relaxes rat thoracic aorta through endothelium-dependent and endothelium-independent mechanisms. *J. Cardiovas. Pharmacol.* 2000, 35: 234-239.

Schuldt EZ, Farias MR, Ribeiro-Do-Valle RM, Ckless K. Comparative Study of Radical Scavenger Activities of Crude Extract and Fractions from *Cuphea Carthagenensis* Leaves. *Phytomedicine* 2004,11:523-529.

Sem CK, Bagchi D. Regulation of inducible adhesion molecule expression in human endothelial cells by grape seed proanthocyanidin extract. *Mol Cell Biochem.* 2001, 216 (1-2): 1-7.

Sestili P, Diamantini G, Bedini A, Cerioni L, Tommasini I, Tarzia G, Cantoni O. Plant-derived phenolic compounds prevent the DNA single-strand breakage and cytotoxicity induced by tert-butylhydroperoxide via an iron-chelating mechanism. *Biochem. J.* 2002, 364: 121-128.

Shwan J, England JDF, Hua ASP. Beta-blockers and plasma tryglycerides. *Br. Med. J.* 1978, 1: 986.

- Silva EL, Moriel P, Chang YH, Abdalla DS. Plasma antioxidant enzymes and oxidized lipoproteins in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995, 36 (3): 679-687.
- Snedecor, GW, Cochran, WG. Statistical methods, Ames, Iowa State University Press, 1967.
- Souza Filho JM de. Vinho e Saúde. viticultura e enologia - atualizando conceitos, 1998, p.1-15.
- Stocker R, O'Halloran RA. Dealcoholized red wine decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-gene-deficient mice independently of inhibition of lipid peroxidation in the artery wall. 2004.
- Szilvassy Z, Csont T, Páli T, Droy-Lefaix MT, Ferdinandy P. Nitric oxide, peroxynitrite and cGMP in atherosclerosis-induced hypertension in rabbits: beneficial effects of cicletanine. *J. Vas. Res.* 2001, 38: 39-46.
- Van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J. Leukoc. Biol.* 2000, 67 (1): 217.
- Vesselinovitch D. Animal models and the study of atherosclerosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1988, 112 (10): 1011-1017.
- Vinson JA, Teufel K, Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis* 2001, 156: 67-72.
- Wazlawik, E.; Silva, M. A.; Peters, R. R.; Correia, J.F.G.; Farias, M.R.; Calixto, J.B.; Ribeiro-Do-Valle, R.M. Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. *J. Pharm. Pharmacol.* 1997, 49: 433-437.
- Witting PK, Mohr D, Stocker R. Assessment of prooxidant activity of vitamin E in human low-density lipoprotein and plasma. *Methods Enzymol.* 1999, 299: 362-375.

Yokode Y, Hammer RE, Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL. Diet-induced hypercholesterolemia in mice: prevention by overexpression of LDL receptors. *Science*. 1990, 250: 1273-1275.

Yoshikawa T, Toyokuni S, Yamamoto Y, Naito Y (Eds). *Free Rad. Chem. Biol. Med. OICA 2000*, London. 518 p.

Yu BP, Chung HY. Oxidative stress and vascular aging. *Diab. Res. Clin. Prac.* 2001, 54 (2): S73-S80.

Zabalawi M, Bhat S, Laughin T, Thomas MJ, Alexander E, Cline M, Bullock B, Willingham M, Sorci-Thomas MG. Induction of fatal inflammation in LDL receptor and ApoAI double-knockout mice fed dietary fat and cholesterol. *Am J. Pathol.* 2003, 163 (3): 1201-1213.



