

VANESSA PATROCÍNIO DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIAS DOS POLIFENÓIS DO EXTRATO DE UVA (*Vitis vinifera* L.) E
DO α -TOCOFEROL NOS FATORES DE RISCO E NA LESÃO
ATEROSCLERÓTICA EM CAMUNDONGOS APO E-/-.**

Dissertação apresentada a
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência da Nutrição, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

O48i
2006

Oliveira, Vanessa Patrocínio, 1981-
Influências dos polifenóis do extrato de uva
(*Vitis vinifera* L.) e do α - tocoferol nos fatores de risco e
na lesão aterosclerótica em camundongos Apo E -/-
/ Vanessa Patrocínio Oliveira. – Viçosa : UFV, 2006.
xv, 73f. : il. ; 29cm.

Orientador: Maria do Carmo Gouveia Peluzio.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Alimentos funcionais. 2. Aterosclerose - Tratamento.
3. Antioxidantes - Uso terapêutico. 4. Polifenóis.
5. Uva - Aspectos da saúde. 6. Vitamina E. 7. Peroxidação
lipídica. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 613.2

VANESSA PATROCÍNIO DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIAS DOS POLIFENÓIS DO EXTRATO DE UVA (*Vitis vinifera* L.) E
DO α -TOCOFEROL NOS FATORES DE RISCO E NA LESÃO
ATEROSCLERÓTICA EM CAMUNDONGOS APO E-/-.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de setembro de 2006.

Prof^a.Cristina Maria Ganns C. Dias
(Co-Orientadora)

Prof^a. Céphora Maria Sabarense
(Co-Orientadora)

Prof^a. Lina Enriqueta F. P. de L. Rosado
Maldonado

Prof^a. Izabel R. dos S. C.

Prof^a. Maria do Carmo Gouveia Peluzio
(Orientadora)

*“O Senhor é minha luz e minha salvação, a quem temerei?
O Senhor é o protetor de minha vida, de quem terei medo?”
(Salmo 26:1)*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela maravilhosa vida que me proporciona e as maravilhosas pessoas que coloca em meu caminho todos os dias.

Aos grandes amores da minha vida Sr. Santos Dumont de Oliveira e a Dr^a. Silvia Catarina Patrocínio de Oliveira, seres fantásticos que eu tenho a sorte de ser filha. Muito obrigada meus queridos e amados pais pelo investimento emocional e financeiro, pelo apoio incondicional e amor extremo durante toda a minha caminhada.

Aos meus irmãos Ana Carolina (Aninha) e Lucas pelo apoio e admiração. Amo muito vocês!

A minha “mãe” Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Gouveia Peluzio, a nossa Carminha, não só pela orientação e pelos ensinamentos em nutrição e na ciência, mas pelo acolhimento desde a iniciação científica, estando sempre pronta a me ajudar sejam quais fossem os meus problemas.

As Professoras Céphora e Cristina pelos valorosos ensinamentos e orientação.

Aos companheiros fiéis de laboratório: Ana Paula, André, Angélica, Damiana, Josy, Monise, Prof^a. Sônia e Wallison. Foram horas e horas de trabalho e muita descontração séria no trabalho. Muito obrigada pela ajuda, apoio e amizade.

Aos meus afilhados queridos e amados Verônica, Henrique e Pedro, não sei o que seria de mim sem vocês. Obrigada pelo apoio sempre e no momento em que mais precisei. Agradeço a Deus por ter vocês em minha vida.

Aos meus amigos irmãos Marclênia, Isabella, Josiane, Lauro e Cibele pelo ombro amigo, pela admiração, pela inspiração e incentivo sempre.

Aos Professores do Departamento de Nutrição indispensáveis nessa caminhada.

Ao querido Sr. Adão do Biotério Central da UFV, pelos valorosos conselhos e o carinho ao longo de todos esses anos. Ao Juliano pelo carinho e cuidado com meus queridos e necessário ApoE-/-.

Aos Professores Sérgio da Matta e Marcelo Vilela pelos ensinamentos e amizade.

Aos Professores Everaldo Gonçalves de Barros e Renata Maria Strozi Alves Meira por abrirem as portas de seus laboratórios, cooperando para o desenvolvimento do presente estudo.

As meninas e meninos do mestrado pelos preciosos momentos de descontração e trabalho durante toda a caminhada em direção ao conhecimento.

A FAPEMIG por acreditar em meu trabalho e incentiva-lo.

A Universidade Federal de Viçosa por me tornar o que hoje sou. Obrigada pelas lágrimas, pelos sorrisos, pela saudade que guardarei no peito ao me lembrar dos preciosos momentos que passei nesse campus.

A Viçosa pela acolhida por mais de cinco anos.

A todos aqueles traídos pela minha memória e que não citei aqui, mas estão presentes em minha vida e em meu coração, colaborando para o meu crescimento pessoal e profissional.

ÍNDICE

LISTA DE QUADRO, TABELAS E FIGURAS	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT.....	xiv
Aterosclerose: influência do processo oxidativo e dos flavonóides e alfa-tocoferol no desenvolvimento da placa ateromatosa (Revisão da Literatura).....	1
Resumo.....	1
Introdução.....	2
Hipóteses da gênese do ateroma.....	3
Estresse oxidativo e defesa antioxidante na aterosclerose.....	6
Os Flavonóides e aterosclerose.....	8
Vitamina E e aterosclerose.....	11
Considerações finais.....	14
Referências Bibliográficas.....	15
Influências dos polifenóis do extrato de uva (<i>Vitis vinifera</i> L.) E do α -tocoferol nos fatores de risco e na lesão aterosclerótica em camundongos apo e-/-.....	22
1. Introdução	22
2. Objetivos.....	25
2.1 Objetivo Geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3. Materiais e Métodos.....	26
3.1 Animais e dietas.....	26

3.2 Amostras de Soro, Fígado, Coração e Aorta.....	27
3.3 Dosagem de Colesterol e Triacilgliceróis.....	28
3.4 Dosagem de Vitamina E.....	29
3.5 Dosagem de Polifenóis.....	31
3.6 Dosagem de Antocianinas do Extrato.....	31
3.7 Dosagem de Malondialdeído (MDA).....	32
3.8 Dosagem de Hidroperóxidos Lipídicos.....	32
3.9 Análise do Perfil de Ácidos Graxos.....	33
3.10 Análise Morfológica e Morfométrica.....	35
3.11 Análise Estatística.....	36
4. Resultados.....	37
4.1 Consumo alimentar e Crescimento dos Animais.....	37
4.2 Consumo do extrato de Uva e Teores de Polifenóis e Antocianinas do Extrato de Uva.....	38
4.3 Determinação do Colesterol Total e dos Triacilgliceróis Séricos, Hepáticos e Fecais.....	39
4.4 Determinação de Vitamina E e Polifenóis Séricos, Hepáticos e Fecais.....	42
4.5 Determinação de MDA e Hidroperóxidos Lipídicos Séricos e Hepáticos.....	44
4.6 Determinação do Perfil de Ácidos Graxos Hepáticos e Fecal.....	46
4.7 Análise Morfológica e Morfométrica das Lesões ateroscleróticas dos Grupos Experimentais de Camundongos ApoE-/-.....	49

5. Discussão.....	56
6. Conclusão.....	64
7. Referências Bibliográficas.....	65

LISTA DE QUADRO, TABELAS E FIGURAS

Quadro	Página
Quadro 1: Seis diferentes graus de lesão aterosclerótica (I a VI) e suas características morfológicas.....	35
Tabela	Página
Tabela 1: Parâmetros de crescimento dos animais, peso inicial e final, peso do fígado, peso relativo e consumo de dieta e α -tocoferol nos diferentes grupos experimentais de camundongos Apo E-/-.....	38
Tabela 2: Teor de polifenóis e antocianinas do extrato de uva oferecido aos diferentes grupos experimentais de camundongos Apo E-/-.....	39
Tabela 3: Níveis de colesterol total e triacilgliceróis séricos, hepáticos e fecais nos diferentes grupos experimentais de camundongos Apo E-/-.....	41
Tabela 4: Níveis de vitamina E e polifenóis, séricos, hepáticos e fecais nos diferentes grupos experimentais de camundongos Apo E-/-.....	43
Tabela 5: Parâmetros da peroxidação lipídica (malondialdeídos e hidroperóxidos lipídicos) nos diferentes grupos experimentais de camundongos Apo E-/-.....	45

Tabela 6: Perfil de ácidos graxos hepático nos diferentes grupos experimentais de camundongos Apo E-/-.....	47
--	----

Tabela 7: Perfil de ácidos graxos fecal nos diferentes grupos experimentais de camundongos Apo E-/-.....	48
---	----

Tabela 8: Classificação do grau de evolução das lesões ateroscleróticas nos diferentes grupos experimentais de camundongos Apo E-/-.....	50
---	----

Figura	Página
Figura 1: Cortes histológicos de placas ateromatosas apresentadas por camundongos ApoE -/- em dieta aterogênica.....	51
Figura 2: Cortes histológicos de placas ateromatosas apresentadas por camundongos ApoE -/- recebendo extrato de uva.....	52
Figura 3: Cortes histológicos de placas ateromatosas apresentadas por camundongos ApoE -/- tratados com α -tocoferol.....	53

Figura 4: Cortes histológicos de placas ateromatosas apresentadas por camundongos ApoE -/- recebendo extrato de uva e suplementação alimentar com α -tocoferol.54

Figura 5: Avaliação morfométrica da área da maior lesão aterosclerótica de camundongos ApoE-/- alimentados com dieta aterogênica (Controle), com extrato de uva (Uva), com α -tocoferol (Tocoferol) e extrato de uva e α -tocoferol (Uva e Tocoferol).....55

RESUMO

OLIVEIRA, Vanessa Patrocínio de, M.S. Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2006. **Influências dos polifenóis do extrato de uva (*Vitis vinifera* L.) E do α -tocoferol nos fatores de risco e na lesão aterosclerótica em camundongos apo e-/-**. Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio; Co-Orientadoras: Cristina Maria Ganns Chaves Dias e Céphora Maria Sabarense.

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo ocidental. Têm como principal alteração morfológica a formação de placas ateromatosas. Estudos epidemiológicos e experimentais demonstram ação benéfica de antioxidantes, como os polifenóis da uva e o α -tocoferol, sobre o desenvolvimento dessas doenças. Diante dessas especulações o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar o efeito da suplementação alimentar com polifenóis da uva e α -tocoferol sobre a evolução da aterosclerose em camundongos Apo E -/-. Camundongos com cinco semanas de vida receberam dieta aterogênica durante seis semanas. Após esse período foram divididos em quatro grupos: 'Controle', recebeu dieta aterogênica e água; 'Uva', recebeu dieta aterogênica e extrato de uva; 'Tocoferol', recebeu dieta aterogênica suplementada com 400 UI/ Kg de dieta de acetato de α -tocoferol e água; e 'Uva e Tocoferol', que recebeu dieta aterogênica suplementada com 400 UI/ Kg de dieta de acetato de α -tocoferol e extrato de uva. O tratamento prosseguiu por onze semanas. Na última semana as fezes foram recolhidas. Após eutanásia foram retirados sangue, aorta, coração e fígado. Foram dosados colesterol total, triacilgliceróis, polifenóis totais do soro, fígado e fezes. No soro e fígado foram

dosados vitamina E e hidroperóxidos lipídicos. No fígado e fezes foram analisados o perfil de ácidos graxos. Coração e aorta foram processados histologicamente e feita a análise morfológica e morfométrica. Os tratamentos apresentaram considerável efeito hipocolesterolêmico com redução dos níveis séricos e hepáticos de colesterol. Houve aumento da excreção fecal de colesterol com a suplementação com antioxidantes. Não houve alteração nos triacilgliceróis, polifenóis e malondialdeído no tecido hepático dos animais. A formação de hidroperóxidos lipídicos mostrou uma tendência a ser menor quando os animais receberam os dois antioxidantes. Os grupos suplementados apresentaram maiores níveis de vitamina E séricos e hepáticos. No perfil de ácidos graxos não observou-se diferença estatística, contudo nota-se uma maior tendência a preservação dos ácidos graxos poliinsaturados quando houve suplementação com polifenóis da uva. A análise morfológica revelou menor grau de evolução da placa dos animais que receberam α -tocoferol. Não houve diferença no tamanho da maior lesão encontrada. Os resultados sugerem que a suplementação com os dois antioxidantes obteve melhor efeito sobre a evolução da aterosclerose pois reduziu os níveis de colesterol, importante fator de risco, e melhorou o potencial antioxidante no organismo dos animais.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Vanessa Patrocínio de, M.S. Universidade Federal de Viçosa, September 2006. **Influences of Polyphenol from Grape Extract (*Vitis vinifera* L.) and of the α -tocopherol on the risk factors and the atherosclerotic damage in Apo e^{-/-} mice.** Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio; Co-Advisers: Cristina Maria Ganns Chaves Dias and Céphora Maria Sabarense.

Cardiovascular diseases are the main cause of death in the Western world. They have as the main morphological change the formation of atheromatose plates. Epidemiological and experimental studies demonstrate beneficial action from anti-oxidants, such as the grape polyphenols and the α -tocopherol, on the development of these diseases. With these speculations this work was developed with the objective of verifying the effect of the food supplement with grape polyphenols and the α -tocopherol on the atherosclerosis evolution in Apo E ^{-/-} mice. Five-week old mice received an atherogenic diet for six weeks. After this time they were divided into four groups: 'Control' received an atherogenic diet and water, 'Grape', received an atherogenic diet and grape extract; 'Tocopherol', received an atherogenic diet supplemented with 400 UI/ Kg of a diet of α -tocoferol acetate and water ; and the 'Grape and Tocopherol', which received an atherogenic diet supplemented with 400 UI/ Kg of a diet of α -tocopherol acetate and grape extract. The treatment lasted for eleven weeks. On the final week the feces were collected. After sacrificing the mice (euthanasia) we extracted the blood, aorta, heart and liver. We measured total cholesterol, triacilgliceroids, total polyiphenols from the serum, liver and feces. In the serum and liver we measured

vitamin E and hydroperoxide lipids. In the liver and feces we analysed the fatty acids profile. The heart and aorta were processed histologically and a morphological- morphometric analysis was done. The treatments showed considerable hypocholesterolemic effect with decrease of the seric and hepatic levels of cholesterol. There was an increase of fecal excretion of cholesterol with the supplementation with anti-oxidants. There was no change in the triacilgliceroids, polyphenols and malondialdeid on the hepatic tissue of the animals. The formation of hydroperoxide lipids showed a trend of being less when the animals received both anti-oxidants. The supplemented groups showed greater levels of vitamin E seric and hepatic. On the fatty acids profile we did not observe any statistical difference, however it is noticeable a greater trend in preserving polyunsaturated fatty acids when there was a supplementation of grape polyphenols. The morphologic analysis revealed a lower level of evolution of the animals atheromatose plates that received α -tocopherol. There was no difference in the size of the larger damage found. The results suggest that the supplementation with both anti-oxidants obtained a better effect on the evolution of the atherosclerosis since it lowered the levels of cholesterol, important risk factor, and it improved the anti-oxidant potential on the animals' organism.

ATEROSCLEROSE: INFLUÊNCIA DO PROCESSO OXIDATIVO E DOS FLAVONÓIDES E DO ALFA-TOCOFEROL NO DESENVOLVIMENTO DA PLACA ATEROMATOSA.

Resumo:

As doenças cardiovasculares têm como principal causa a formação de placas ateromatosas. Processo caracterizado pela deposição de lipídios na íntima vascular, provocando a obstrução e enrijecimento da parede vascular, comprometendo o suprimento de oxigênio aos tecidos, assim como a resposta vascular a diversos estímulos. Na aterogênese estão envolvidos diversos mecanismos, entre eles pode ser destacada a modificação oxidativa da LDL. A LDL modificada além de ser endocitada sem controle por macrófagos, formando as células espumosas, tem efeitos quimiotáticos e citotóxicos, que culminam na promoção e progressão da aterosclerose. O papel chave da modificação oxidativa da LDL vem sendo posto a prova com experimentos que utilizam antioxidantes como os flavonóides e o alfa-tocoferol. Estudos epidemiológicos mostram relação inversa entre o consumo dessas substâncias e a incidência de doenças cardiovasculares. Os estudos clínicos ainda são controversos, porém os modelos animais se fazem adequados para o estudo da ação dessas substâncias na aterogênese, revelando o efeito modulador no processo antiaterogênico desempenhado tanto por flavonoides como pelo alfa-tocoferol.

Termos de Indexação: Aterosclerose, flavonóides, alfa-tocoferol.

Introdução:

No Brasil, as doenças cardiovasculares representam 27,22% das causas de morte estando a frente das neoplasias, que representam 13,22% das causas de morte da população¹. Em países desenvolvidos não é diferente, o governo americano gastou cerca de U\$326,6 bilhões com o tratamento cirúrgico e emergencial em 2001². A Organização Mundial da Saúde considera as doenças cardiovasculares como uma epidemia nos países em desenvolvimento que adquirem os hábitos ocidentais³.

As doenças cardiovasculares englobam uma magnitude de síndromes que vão além da aterosclerose, principal causa das manifestações clínicas. Incluem as cardiopatias isquêmicas, doença arterial coronariana, infarto do miocárdio, embolias e acidentes vasculares cerebrais³.

Os fatores de risco para o desenvolvimento dessas doenças são estilo de vida (estresse, hábito de fumar, obesidade, sedentarismo e dieta rica em gordura), altas taxas de Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL; *Low Density Lipoprotein*), baixo nível de Lipoproteína de Alta Densidade (HDL; *High Density Lipoprotein*) e alta taxa de Proteína C Reativa (PCR), Amilóide A (AA) e homocisteína plasmáticas, idade, sexo e *Diabetes Mellitus*³.

A aterosclerose se caracteriza pelo acúmulo de macrófagos repletos de colesterol na parede arterial, levando a proliferação de certos tipos celulares que gradualmente diminuem a luz vascular, impedindo o fluxo sanguíneo. Além disso aumentam a rigidez da parede vascular³. Porém, a gênese da lesão aterosclerótica, o ateroma, permanece incerta.

Estudos epidemiológicos mostram que há associação entre o consumo de alimentos ricos em substâncias antioxidantes e a redução na incidência de doenças cardiovasculares^{4,5}. Entre eles destacam-se os flavonóides^{5,6} e a vitamina E⁷.

Diante do exposto o objetivo dessa revisão foi elucidar os principais mecanismos de ação de antioxidantes na aterogênese.

Hipóteses da gênese do ateroma:

As primeiras hipóteses sobre a gênese do ateroma relacionavam-se a deposição de fibrina⁸ e lipídios complexados a mucopolissacarídeos⁹. Contudo essas hipóteses refletiam o aspecto passivo do acúmulo de lipídios na placa ateromatosa. Em 1973, Ross & Glomset introduziram a hipótese da “resposta à injúria”, onde a aterogênese passava de um caráter passivo a um caráter ativo. Sendo então considerada uma reação inflamatória, uma resposta à lesão vascular de diferentes origens¹⁰.

A lesão inicial levaria a uma disfunção endotelial culminando em uma série de respostas compensatórias que alterariam a homeostase vascular, entre elas o aumento da permeabilidade vascular a leucócitos e plaquetas, aumentando o processo de coagulação no local. O endotélio vascular também seria responsável pela liberação de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento que promoveriam a instalação da resposta inflamatória, assim como, sua perpetuação no processo aterogênico. A alteração física, como o turbilhonamento do fluxo sanguíneo; a infecção por agentes biológicos, aumentando o estresse oxidativo e

conseqüentemente liberação de radicais livres e a alteração na composição sangüínea, como o aumento de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (quilomicrons e lipoproteína de muito baixa densidade-VLDL; *Very Low Density Lipoprotein*) também poderiam ser estímulos iniciais para a formação da placa aterosclerótica³.

Diante do fato da aterosclerose se caracterizar pelo acúmulo de lipídios na íntima vascular, uma hipótese a ser considerada é a retenção de lipoproteínas como o evento iniciador da aterogênese. Sabe-se que a entrada espontânea de lipoproteína na parede vascular se restringe às moléculas menores do que 70 nm de diâmetro¹¹. Assim, lipoproteínas de baixíssima densidade como as VLDL e os Quilomicrons, lipoproteínas conhecidamente aterogênicas cujas partículas apresentam volumes de 100 e 75 nm, respectivamente, devem sofrer ação da Lipase Lipoprotéica (LPL), para a redução de seu tamanho inicial. Após a redução dos seus volumes seriam capazes de ultrapassar a barreira vascular e atingir o espaço subendotelial. Uma vez no espaço subendotelial as lipoproteínas ficariam retidas de acordo com sua composição química e interação com a matriz extracelular. Nesse sentido, as apolipoproteínas constituintes das moléculas de lipoproteínas têm grande importância. Resíduos das apolipoproteínas B-100 e B-48, constituintes da VLDL e Quilomicrons respectivamente e associadas a LDL, têm alta afinidade por proteoglicanas do endotélio vascular, aumentando sua adesão no vaso¹². A adesão das partículas de lipoproteínas é aumentada pela ação de enzimas lipossomais do endotélio vascular como a catepsina e lipase ácida lipossomal. Uma vez retida na íntima vascular a LDL sofre ação dessas

enzimas e da LPL formando agregados de lipoproteínas¹³, altamente endocitados por macrófagos e pela musculatura lisa¹⁴.

Por fim, tem-se a hipótese da “*modificação oxidativa*”, onde a LDL tem ação aterogênica apenas quando sofre modificação oxidativa. Os radicais livres formados pelo estresse oxidativo, poderiam oxidar a LDL, tornando-a altamente oxidada (LDL-OX). Estudos *in vitro* mostram que a LDL por si só não é aterogênica sendo, portanto, a modificação oxidativa da molécula o fator que a torna altamente lesiva ao endotélio^{15,16}.

O processo de modificação oxidativa da LDL se dá em cascata, com a formação de radicais peroxil provenientes dos lipídios da camada externa da lipoproteína. A cadeia de reações oxidativas se propaga para o centro da lipoproteína, modificando os ácidos graxos e o colesterol. Por fim o dano oxidativo atinge as proteínas da molécula resultando em uma completa modificação da estrutura inicial da lipoproteína¹⁷.

As LDL-OX passam a ser endocitadas por células epiteliais, músculos lisos e principalmente macrófagos, por meio dos receptores “*scavengers*”. Dentro do citoplasma as LDL-OX não são degradadas, formando as células espumosas, características do início da lesão¹³. A LDL-OX também estimula a produção de citocinas que induzem a modificação na expressão fenotípica vascular promovendo a migração de monócitos e a ativação plaquetária. Pode ainda ter um efeito citotóxico direto no endotélio acarretando a liberação de lipídios e de enzimas lisossomais agravando a injúria vascular¹⁸.

Estresse oxidativo e defesa antioxidante na aterosclerose:

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre as substâncias oxidantes e a defesa antioxidante. Esse desequilíbrio tem como consequência o aumento dos radicais livres no organismo, o que pode levar aos danos em cascatas bioquímicas e comprometimentos celulares¹⁹.

Os radicais livres são espécies químicas capazes de existir independentemente de outras substâncias e que apresentam pelo menos um elétron desemparelhado. São formados a partir de inúmeras reações no organismo, como parte de seu metabolismo normal. Bons exemplos são a formação de íons superóxidos por células da defesa imunológica e a partir do oxigênio molecular (O_2) por meio da respiração mitocondrial, assim como a formação de óxido nítrico como mecanismo de vasodilatação vascular²⁰.

Podem ser moléculas com átomo de carbono centralizado ($C\bullet$); ânions superóxido ($O_2^-\bullet$); radicais hidroperoxil ($HO_2\bullet$), peroxil ($RO_2\bullet$), alcóxil ($RO\bullet$), hidroxil, ($HO\bullet$), tiil ($RS\bullet$) e pertiil ($RSS\bullet$); óxido nítrico ($\bullet NO$), dióxido nítrico ($\bullet NO_2$) e os metais de transição. O ataque oxidativo se dá por meio da reação do radical livre com átomos de hidrogênio de moléculas não radicais. A denominação dada para a reação em cascata desencadeada pelos radicais livres é peroxidação lipídica. O processo tem início com a perda do átomo de hidrogênio do ácido graxo, por meio da reação com o radical livre, e a formação do radical lipídico ($L\bullet$). Este, por ser altamente reativo, imediatamente reage com moléculas de oxigênio se transformando no radical peroxil lipídico ($LOO\bullet$) que propaga a reação formando novos radicais $L\bullet$ e moléculas de hidroperóxidos lipídicos ($LOOH$)³.

Os radicais livres parecem ser uma das principais causas da disfunção endotelial que precede e promove a aterogênese. Os radicais livres, principalmente as substâncias reativas de oxigênio (ROS), são capazes de as lesar membranas celulares e o núcleo. Interagem com mediadores vasomotores, inativando seus efeitos vasodilatadores²¹. E, principalmente, são capazes de oxidar os lipídios da LDL, elemento chave na aterosclerose¹⁷.

Para a proteção do organismo contra os possíveis danos provocados pelos radicais livres, existem espécies químicas capazes de neutralizar o radical, atuando geralmente em concentrações muito menores que a substância oxidante³.

A defesa antioxidante consiste na interrupção da cascata de oxidação, como visto na peroxidação lipídica, por meio da doação de um átomo de hidrogênio da molécula antioxidante para o radical oxidante²². No organismo, essa defesa é realizada por enzimas (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, tiol-dissulfeto oxidoreductase e peroxiredoxinas), sequestradores de metais (proteínas ligadoras de metais e as heme oxidases) e as substâncias não protéicas oriundas da dieta (polifenóis, vitaminas antioxidantes, ácido alfa-lipóico, etc.)^{4,9}.

Nesse sentido, a LDL, como um ponto chave na aterogênese, é protegida da ação de radicais livres, principalmente ROS, pela ação de antioxidantes lipofílicos em sua estrutura. Os principais antioxidantes da LDL são o alfa-tocoferol, os carotenóides e o ubiquinol-10²³.

Diante da ligação entre a oxidação da LDL e a aterogênese, forma-se um forte campo investigativo sobre os possíveis efeitos dos antioxidantes na prevenção do desenvolvimento e da progressão da doença aterosclerótica. Neste

contexto destacam-se como os antioxidantes de interesse para essa revisão, os flavonóides e a vitamina E (alfa-tocoferol).

Os Flavonóides e aterosclerose:

Os flavonóides são compostos não nutritivos, com potente atividade antioxidante devido a presença de inúmeros radicais fenólicos. São amplamente distribuídos no reino vegetal e com diversas estruturas químicas, podendo ser classificados em: antocianinas, flavonas, isoflavonas, flavonóis, calconas, catequinas, dihidroflavonóis e lignanas²⁴.

Estudos citados por Cheng⁵, demonstraram a relação entre os flavonóides presentes no chá verde e a disfunção endotelial. Um dos flavonóides mais ativos desse tipo de chá, a epicatequina-gálica, pode ativar a óxido nítrico sintase endotelial pela via da fosfatidilinositol-3-OH-quinase, proteína quinase dependente do AMPc e pela via dependente da ativação do Akt levando à vasodilatação do endotélio. Esses flavonóides podem ainda, inibir a hiperplasia endotelial e suprimir a proliferação de tecido muscular endotelial⁵.

Em 2001, Riemersa *et al*⁶ associaram o consumo de chá verde, fonte de substâncias polifenólicas, e o aumento do potencial antioxidante no plasma. Kasoaka *et al*, demonstraram claramente que a ingestão de flavonóides pela dieta é capaz de suprimir a oxidação da LDL. O uso dessas substâncias é recomendado quando a dieta é insuficiente em vitaminas com atividade antioxidante ou quando aumentam as necessidades destas vitaminas no organismo, como nos indivíduos fumantes²⁵.

Stangl *et al*, estudaram o efeito de flavonóides encontrados na maçã, sobre a expressão de moléculas de adesão e a agregação plaquetária em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVERCs) e observaram uma redução do estímulo da expressão de moléculas de adesão endotelial (VCAM, ICAM e selectina-E) via TNF- α e IL-1 β . Nas plaquetas diminuiu a Difosfato e Adenosina (ADP) reduzindo assim a agregação plaquetária estimulada pelo ADP. Tais resultados mostraram o efeito benéfico dos flavonóides sobre a instalação e progressão das doenças cardiovasculares²⁶.

Apesar dos resultados expressivos sobre a ação dos flavonóides na aterogenicidade *in vitro*, os seus efeitos *in vivo* ainda são controversos, mas mostram evidências benéficas no consumo alimentar dessas substâncias.

Aviram *et al* estudaram o efeito do suco de romã no desenvolvimento da aterosclerose tanto em humanos quanto em camundongos geneticamente modificados (“*knock out*” para o gene Apo E, homozigóticos). Observaram que o consumo das substâncias polifenólicas da romã estava associado à redução na agregação plaquetária e monocitária, à redução da susceptibilidade da LDL à oxidação e à retenção da LDL no citoplasma celular. Verificaram redução do tamanho da placa de ateroma e diminuição das células espumosas nos cortes histológicos da aorta dos camundongos¹⁷. Em outro estudo realizado com o mesmo modelo animal o extrato de romã apresentou efeito sobre placas ateromatosas avançadas. Além da redução do estresse oxidativo em macrófagos e a redução no fluxo de colesterol na célula²⁶.

Em camundongos deficientes em Apo E, alimentados com extratos polifenólicos do gengibre²⁸ e com ácido caféico (flavonóide encontrado na própolis e no mel)²⁹, foi observada atenuação da aterogênese. Sendo esse efeito atribuído à redução do estresse oxidativo sistêmico durante o processo patológico.

Além do efeito antioxidante os flavonóides parecem atuar também sobre a HDL aumentando seu nível no plasma, como demonstrado no estudo de Yang & Koo³⁰. Atuam ainda inibindo as enzimas cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), reguladoras do metabolismo de ácidos graxos poliinsaturados e da formação dos eicosanóides³¹, e inibindo a agregação plaquetária, um dos principais mecanismos do infarto do miocárdio e da angina pectoris³².

Dentre as várias fontes vegetais de flavonóides, como o chá verde, a cebola, o cacau, a soja, o aipo e a chicória²⁴, destacam-se as uvas e vinhos³³.

Estudos epidemiológicos relacionam menores índices de doenças cardiovasculares na França ao consumo de vinho, visto que tais índices em outros países desenvolvidos, com fatores de risco semelhantes, são significativamente maiores³³. O consumo regular de vinho tinto está associado à diminuição na formação de placa aterosclerótica, ao aumento nos níveis plasmáticos de HDL e à inibição da agregação plaquetária³⁴. Sendo encontrado efeito significativo do consumo de suco de uva na diminuição da agregação plaquetária e oxidação da LDL *in vitro*^{35,36}.

Os principais flavonóides encontrados nas uvas são: flavonóis, ácidos fenólicos, antocianinas, catequinas, proantocianinas, epicatequinas, flavina, cianidina, miricetina e quercitina, encontrados principalmente na casca e sementes²⁴.

Cui *et al* demonstraram que o consumo de extrato de uva teve efeito cardioprotetor, recuperando com maior eficiência a isquemia ventricular em ratos com ingestão oral do extrato durante três meses³⁷.

O efeito cardioprotetor parece estar relacionado, ainda, com o aumento da liberação de óxido nítrico pelas plaquetas, diminuição na liberação de radicais superóxidos, aumento dos níveis de alfa-tocoferol e aumento na atividade antioxidante de proteínas plasmáticas³⁴.

Vison *et al*, em estudo com hamsters apresentando estria gordurosa pré-induzida, observaram maior efeito antiaterogênico do suco de uva quando comparado com o vinho tinto³⁸. Resultado semelhante foi encontrado por Strocker & O'Halloram, em estudo com camundongos Apo E deficientes. Observaram ainda, efeito sinérgico dos polifenóis encontrados no vinho tinto sem álcool com a administração de vitamina E. Contudo não observaram redução na peroxidação lipídica na parede vascular³⁹.

Vitamina E e aterosclerose:

Vitamina E é o nome genérico de oito compostos constituídos de anel cromanol ligado a uma cadeia lateral alifática, denominados tocoferóis e tocotrienóis. O composto com maior atividade vitamínica é o alfa-tocoferol, sendo considerado o mais potente antioxidante lipossolúvel encontrado na natureza.

Sua ação antioxidante resulta da doação de um átomo de hidrogênio de sua molécula ao radical peroxil, formando o hidroperóxido estável denominado radical tocoferil. Esse radical pode reagir com os radicais cromanoxil, alcoxil ou peroxil, podendo ser transformando novamente em alfa-tocoferol⁴⁰.

As principais fontes alimentares da vitamina E são de óleos vegetais, tais como o óleo de girassol, de oliva e de amêndoas, cuja isoforma predominante da vitamina é o alfa-tocoferol. Os demais óleos vegetais, como o óleo de soja, são ricos em gama-tocoferol. Este por sua vez é a principal isoforma da vitamina E encontrada na dieta ocidental⁴¹.

Na aterogênese in vivo o alfa-tocoferol: inibe a expressão de moléculas de adesão de monócitos no endotélio^{42,43}, recupera a disfunção endotelial desencadeada pela LDL-OX, preserva a vasodilatação endotélio-dependente, reduz a agregação e adesão plaquetária, previne a modificação oxidativa da LDL⁴⁴, modifica a proteína AP-1 inibindo a proliferação de células musculares lisas, evita a hemólise e modula o metabolismo do ácido araquidônico, protegendo os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa contra a oxidação e modulando a síntese dos ecosanóides, moduladores da resposta inflamatória⁴⁵.

Estudos epidemiológicos, apesar de controversos, mostram efeito benéfico do alfa-tocoferol na progressão da aterosclerose⁷. Estudo com a suplementação de 200UI de acetato de alfa-tocoferol em homens fumantes por 2 meses, foi observado a redução da susceptibilidade da LDL plasmática à oxidação além do aumento na concentração de alfa-tocoferol na LDL e HDL, comprovando o efeito antioxidante da vitamina⁴⁶. Em indivíduos com fator de risco para doença cardiovascular o alfa-tocoferol, administrado em baixas doses, não foi capaz de diminuir os níveis de colesterol²⁴.

Os estudos clínicos revisados por Mutcanu, et al mostram que a presença de fatores confundidores como idade, sexo, polimorfismo genético, além da falta de padronização das metodologias de pesquisa, tornam os resultados desses

estudos controversos⁷. Esses resultados podem ser explicados pela complexa ação molecular da vitamina E na modificação oxidativa da LDL. Visto que mesmo em níveis normais da vitamina no organismo observam-se deposição de lipídios oxidados⁴⁶. Jachéc *et al* estudaram os níveis de produtos da peroxidação lipídica em lesões ateroscleróticas extraídas cirurgicamente de humanos. Observaram propagação do processo oxidativo na lesão apesar de uma correlação inversa entre os metabólicos da peroxidação lipídica e os níveis de vitamina E⁴⁷.

Peluzio *et al* estudaram o efeito da suplementação dietética de α -tocoferol (400mg/Kg de dieta) em camundongos geneticamente modificados (“*knock out*” para o gene Apo E, homozigóticos) sobre o desenvolvimento da placa ateromatosa. Demonstraram a eficiência no retardo do desenvolvimento de estrias gordurosas na aorta dos animais, sugerindo que o uso da vitamina pode ser efetivo na prevenção da aterosclerose⁴². Resultado semelhante foi encontrado por Zhao *et al*, no mesmo modelo de experimentação. Observaram que a suplementação de 2000UI/Kg na ração resultou em menor desenvolvimento da placa de ateroma. Justificaram tal efeito pela redução da peroxidação lipídica via lipoxigenase⁴⁸.

Cyrus *et al*, em estudo com camundongos *knock out* para receptores de LDL, alimentados com uma dieta suplementada com 2,1UI/g de dieta com alfa-tocoferol, apresentaram redução da progressão da placa de aterosclerose, redução em parâmetros do processo inflamatório. Contudo, não observaram alteração no metabolismo lipídico dos animais⁴⁹.

Considerações finais:

Evidências ligando a ingestão de antioxidantes à aterosclerose em humanos ainda são circunstanciais, embora alguns estudos mostrem uma relação inversa entre o consumo de antioxidantes e a incidência de doenças cardiovasculares. Isso se deve à limitação dos estudos dos vários estágios da aterosclerose em humanos. Deste modo, estudos experimentais permitem uma investigação minuciosa, isenta de fatores confundidores durante todo o processo de aterogênese⁴.

Os estudos do desenvolvimento da aterosclerose *in vivo* exigem modelos animais específicos. Os modelos animais mais utilizados para esses estudos são coelhos hipercolesterolêmicos e camundongos Apo E deficientes e *knock out* para o receptor de LDL. Esses modelos apresentam maior proximidade com o metabolismo humano de lipoproteínas⁵⁰.

Os estudos apresentados mostram que a ação dos flavonóides e do alfa-tocoferol vão além de suas propriedades antioxidantes. Influenciam, também, na modulação de várias rotas da patogênese da aterosclerose. Entretanto, os estudos não apresentam resultados consensuais sobre a quantidade dessas substâncias que seria a mais adequada para a promoção dos efeitos benéficos, e, principalmente, se essa quantidade seria viável para o consumo de humanos.

Diante do exposto pode-se concluir que são necessário estudos adicionais que evidenciem o mecanismo de ação dos flavonóides e do alfa-tocoferol com o objetivo de estabelecer a quantidade adequada a ser recomendada para a produção dos efeitos benéficos, antioxidantes, e para evitar os efeitos pró-oxidantes dessas substâncias, quando administrados em altas doses

Após a elucidação dos mecanismos envolvidos e a determinação da dose ótima para a promoção dos efeitos antioxidantes, essas substâncias poderão ser uma alternativa na prevenção e no tratamento das doenças cardiovasculares.

Referências Bibliográficas:

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Banco de Dados do Sistema Único de Saúde (DATASUS). 2005. [Citado em outubro de 2005]. Disponível em <<http://www.datasus.gov.br>>.
2. Lefkowitz RJ, Willerson JT. Prospects for cardiovascular research. JAMA. 2001;285(1):581-587.
3. Strocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. Physiol Rev. 2004; 84(1):1384-1478.
4. Kaliora AC, Dedoussis GVZ, Schimidt H. Dietary antioxidants in preventing atherosclerosis. Atherosclerosis. 2006; 187(1):1-17.
5. Cheng TO. All teas not created equal. The Chinese green tea and cardiovascular health. International Journal of Cardiology. 2006; 108(4):301-308.
6. Riesmersma RA, Rice-Evans CA, Tyrrell RM, Clifford MN, Lean ME. Tea flavonoids and cardiovascular health. QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians. 2001;94(1):277-282.
7. Muntcanu, A; Zingg, J-M; Azzi, A. Anti-atherogenic effects of vitamin E-myth or reality? J Cell Mol Med, 2004; 8(1): 59-76.

8. Rokitsky C. A manual of pathology anatomy. In: Strock R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004; 84(1):1384-1478.
9. Virchow R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological history. Lecture XVI-Atheromatous affection of arteries 1852. *Nutr Rev.* 1989; 47(1): 23-25.
10. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* 1973; 180(1):1332-1339.
11. Simionescu M, Simionescu N. Proatherosclerotic events: pathobiochemical changes occurring in the arterial wall before monocyte migration. *FASEB J.* 1993; 7(1): 1359-1366.
12. Camejo G, Fager G, Rosengren B, Hurt-Camejo E, Bondjers G. Binding of low density lipoprotein by proteoglycans synthesized by proliferating and quiescent human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1993; 268(19): 1431-1437.
13. Hakala JK, Oksjoki R, Laine P, Du H, Grabowski GA, Kovanen PT, Pentikäinen MO. Lysosomal enzymes are released from cultured human macrophages, hydrolyze LDL in vitro, and are present extracellularly in human atherosclerotic lesions. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(1):1430-1436.
14. Ismail NA, Alavi MZ, Moore S. Lipoprotein-proteoglycan complexes from injured rabbit aortas accelerate lipoprotein uptake by arterial smooth muscle. *Atherosclerosis.* 1994; 105(1): 79-87.

15. Witztun JL, Streinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991; 88(1):1785-1790.
16. Heinecke JW. Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 2003;91(suppl):12A-16A.
17. Aviram L, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and plaque aggregation: studies in human and in atherosclerotic apolipoprotein E- deficient mice. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71(5): 1062-1076.
18. Matsuoka H. Endothelial dysfunction associated with oxidative stress in human. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 2001; 54(suppl): s65-s72.
19. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15(1):1512-1531.
20. Madamanchi, NR; Vendrov, A; Runge, MS. Oxidative stress and cardiac disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(1):29-38.
21. Wever JW, Luscher TF, Consetino F, Rabelink TJ. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 1998;97(1):108-112.
22. Violi F, Micheletta F, Iuliano L. Antioxidants and atherosclerosis. *European heart Journal Supplements.* 2002; 4:b17-b21.

23. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med.* 1992; 13(4):341-390.
24. Arts ICW, Holman PCH. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81(1): 3317S-325S.
25. Kasaoka S, Hase K, Morita T, Kiriya S. Green tea flavonoids inhibits the LDL oxidation on osteogenic disorders rats fed a marginal ascorbic acid diet. *J Nutr Biochem.* 2002; 13:96-102
26. Stangl V, Lorenz M, Ludwig A, Grimbo N, Guether C, Sanad W, et al. The flavonoid phloretin suppresses stimulated expression of endothelial adhesion molecules and reduces activation of human platelets. *J Nutr,* 2005; 135(1): 172-178.
27. Kaplan M, Hayek T, Raz A, Coleman A, Dornfeld L, Vaya J, Aviram M. Pomegranate juice supplementation to atherogenic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *J Nutr.* 2001; 131(1):2082-2089.
28. Fuhrman B, Rosenblat M, Hayek T, Coleman R, Aviram M. Ginger extract consumption reduces plasma cholesterol, LDL oxidation and attenuates development of atherosclerosis in atherogenic, apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr.* 2000(1); 130:1124-1131.
29. Hishikawa K, Nakaki T, Fujita T. Oral flavonoids supplementation attenuates atherosclerosis development in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(1):442-446.

30. Yang TT, Koo MV. Inhibitory effect of Chinese green tea on endothelial cell-induced LDL oxidation. *Atherosclerosis* 2000; 148(1): 411-423.
31. Moreira AVB, Mancini-Filho, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecido de ratos. *Revista Nutrição Campinas*. 2004; 17(4):411-424.
32. Vita JA. Polyphenols and cardiovascular disease: Effects on endothelial and platelet function. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81(1): 292S-297S.
33. Renaud S, Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 1992; 339(1): 1523-1526.
34. Freedman JE, Parker C, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V, Deak LR, Iqbal MD, Folts JD. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation*. 2001; 103(1): 2792.
35. Stein JH, Keevil JG, Wiebe AD, Aeschlimann S, Folts JD. Purple grape juice improves endothelial functions and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1999; 100(1): 1050-55.
36. Durak I, Koseoglu MH, Kacmaz M, Buyukkocak S, Cimen MB, Ozturk HS. Black grape enhances plasma antioxidant potential. *Nutrition Research*. 1999; 19(7): 973-977.
37. Cui J, Cordis GA, Tosaki A, Maulik N, Das DK. Reduction of myocardial ischemia reperfusion injury with regular consumption of grapes. *Annals of the New York Academy of Science*. 2002; 957(1): 302-307.

38. Vison JA, Teufel K, Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in hamster model. *Atherosclerosis* 2001; 156(1):67-72.
39. Strocker R, O'Halloran RA. Dealcoholized red wine decreases atherosclerosis in apolipoprotein E gene-deficient mice independent of inhibition of lipid peroxidation in artery wall. *Am J Clin Nutr* 2004; 79(1):123-130.
40. Tucker JM, Townsend DM. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2005;59(1):380-387.
41. Dutta A, Dutta, AK. Vitamin E and its role in prevention of atherosclerosis and carcinogenesis: a review. *J Am Coll Nutr*. 2003; 22(1):258-268.
42. Peluzio MCG, Homem APP, Cesar GC, Azevedo GS, Amorim R, Cara DC, Saliba H, Vieira EC, Arantes RE, Alvarez-Leite J. Influences of α -tocopherol on cholesterol metabolism and fatty streak development in apolipoprotein E-deficient mice fed an atherogenic diet. *Brazil J Med Biolog Res*, 2001; 34(12): 1539-1545.
43. Koga T, Kwan P, Zubik L, Ameho C, Smith D, Meydani M. Vitamin E supplementation suppress macrophage accumulation and endothelial cell expression of adhesion molecules in aorta of hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*. 2004; 176(1):265-272.
44. Kaul, N; Devaraj, A; Jialal, I. α -tocopherol and atherosclerosis. *EBM* 2001; 226(1):5-12.

45. Azzi A, Boscoboinik D, Marilley D, Ozer NK, Stauble B, Tasinato A.. Vitamin E: a sensor and an information transducer of cell oxidation state. *A J Clin Nutr.* 1995; 62():13375S-13465S.
46. Thomas SR, Strocker R. Molecular action of vitamin E in lipid peroxidation: implications for atherosclerosis. *Free Radical Biology and medicine.* 2000;28(12):1795-1805.
47. Jachec W, Tomasik A, Ceglarek W, Wos S, Wodniecki J, Wojciechowska C, et al. Lipid peroxidation and vitamin E in human coronary atherosclerosis lesions. *Clinica Chimica Acta.* 2003;330(1-2):121-129.
48. Zhao L, Praticò D, Rader, D J, Funk CD. 12/15-Lipoxygenase gene transcription and vitamin E administration diminish atherosclerosis and oxidative stress in apolipoprotein E deficient mice through a final common pathway. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 2005; 78(1):185-193.
49. Cyrus T, Yao Y, Rokach J, Tang LX, Pratico D. Vitamin E reduces progression of atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor mice with established vascular lesions. *Circulation* 2003; 107(1):521-523.
50. Hofker MH, van Vlijmen BJM, Havekes LM. Transgenic models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1998;137(1):1-11.

INFLUÊNCIAS DOS POLIFENÓIS DO EXTRATO DE UVA (*Vitis vinífera* L.) E DO α -TOCOFEROL NOS FATORES DE RISCO E NA LESÃO ATEROSCLERÓTICA EM CAMUNDONGOS APO E-/-.

1. Introdução:

As principais causas de morte no mundo ocidental são as doenças cardiovasculares, cujas principais manifestações são o infarto, as embolias e os acidentes vasculares cerebrais (AVC) (MITCHELL, 2005). Essas doenças estão relacionadas a diversos fatores do mundo moderno que vão desde o estresse físico, mental, emocional e químico, aos fatores clássicos como sedentarismo, hábito alimentar inadequado, hábito de fumar e alcoolismo (STOCKER & KEANEY, 2004).

A aterosclerose é a principal representante da síndrome de alterações que envolvem as doenças cardiovasculares. É caracterizada pelo acúmulo de lipídios no interior de macrófagos, dando origem as células espumosas. Essas células acumulam-se na íntima de artérias e veias, diminuindo a luz vascular e comprometendo o fluxo sanguíneo. A gênese do ateroma, ou seja, o início da lesão aterosclerótica parece estar diretamente ligada a modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade- LDL (*Low Density Lipoprotein*). (STOCKER & KEANEY, 2004).

Durante o metabolismo energético várias espécies químicas instáveis, denominadas radicais livres, são formados. Os principais radicais livres formados no organismo são os radicais derivados do oxigênio, as espécies reativas de

oxigênio (ROS- *Reactive Oxygen Species*). Essas espécies são formadas na mitocôndria por meio da cadeia respiratória. São capazes de reagir com lipídios livres no citoplasma celular, lipídios das membranas, proteínas, RNA e DNA alterando a fisiologia celular. Para restaurar o equilíbrio fisiológico celular, ou evitar a ação deletéria dos radicais livres, existe um aparato de defesa antioxidante. Ou seja, existem umas séries de substâncias químicas endógenas e exógenas que inibem a cascata de reações promovida pelos radicais livres. Estas reações poderem culminar em dano para os sistemas orgânicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A defesa antioxidante do organismo conta com proteínas de transporte e enzimas quelantes de íons ferro e cobre, altamente reativos, antioxidantes oriundos da alimentação como vitaminas (A,C e E), polifenóis e moléculas de baixo peso molecular como o ácido lipóico.

O desequilíbrio entre os radicais livres e a defesa antioxidante é a característica básica do estresse oxidativo, processo esse que pode dar origem a uma série de eventos patológicos, entre eles a aterosclerose (SIES, 2000).

Os alvos mais susceptíveis a ação dos radicais livres são os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, encontrados principalmente em membranas celulares e na camada externa das lipoproteínas. A oxidação desses lipídios resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos. Diante da susceptibilidade dos lipídios a oxidação, o estresse oxidativo é um dos principais responsáveis pela modificação oxidativa da LDL (ESTERBAUER *et al*, 1992).

A LDL oxidada induz a uma série de eventos inflamatórios, como a expressão de quimiocinas, de fatores de crescimento e de moléculas de adesão e

agregação monocitária. Induzem também a proliferação e a migração da musculatura lisa e quimiotaxia de células inflamatórias (BATOLUNI, 1997).

Os monócitos atraídos pelos fatores quimiotáticos se diferenciam em macrófagos na íntima vascular. Esses passam a endocitar as moléculas oxidadas de LDL, por meio de receptores varredores ou garis, conhecidos como *scavengers*, adquirindo um aspecto espumoso. Essa característica morfológica se deve ao fato da lipoproteína modificada não ser metabolizada, acumulando-se no citoplasma celular (BATOLUNI, 1997). Os macrófagos repletos de colesterol são chamados de células espumosas (*foam cells*), que são as unidades básicas da lesão aterosclerótica. Em adição a LDL, outras lipoproteínas contendo ApoB, chamadas lipoproteínas (a) e remanescentes, podem acumular-se na camada íntima e promover aterosclerose (LUSIS, 2000).

Nesse sentido os antioxidantes são fundamentais para o combate à modificação oxidativa da LDL. Em situações críticas desencadeadas pela exposição a agentes patológicos de diferentes origens, a defesa antioxidante endógena ficará comprometida, sendo necessária a ação de antioxidantes da dieta (KATIOLA *et al*, 2005).

2. Objetivo:

2.1 Objetivo geral:

Avaliar o efeito do consumo de polifenóis do extrato de uva níagara (*Vitis vinifera* L.) e da suplementação alimentar de α -tocoferol no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos Apo E^{-/-}, e do possível efeito sinérgico do uso simultâneo dos antioxidantes.

2.2 Objetivos específicos:

2.2.1 Verificar se há modificação nas concentrações de colesterol, triacilgliceróis e polifenóis no soro, no fígado e nas fezes dos animais;

2.2.2 Verificar se há modificação nas concentrações de vitamina E sérica e hepática;

2.2.3 Verificar se há redução na formação de malondialdeídos e hidroperóxidos lipídicos;

2.2.4 Verificar se há modificação no perfil de ácidos graxos hepáticos e fecais;

2.2.5 Avaliar o grau de evolução das placas ateroscleróticas formadas pelos camundongos ApoE^{-/-} estudados;

2.2.6 Avaliar o tamanho das lesões ateroscleróticas.

3. Materiais e Métodos:

3.1 Animais e Dietas:

O estudo foi realizado com 49 camundongos C57BL/6 deficientes no gene da Apo E, de ambos os gêneros, mesma idade e pesos similares. Animais com cinco semanas de vida receberam dieta aterogênica, por seis semanas, e após esse período os animais foram separados em quatro grupos com diferentes tratamentos. Os tratamentos experimentais consistiam em: a) Controle, recebendo dieta aterogênica e água; b) Uva, recebendo dieta aterogênica e extrato de uva Níagara; c) Tocoferol, recebendo dieta aterogênica suplementada com 400mg/Kg de acetato de α -tocoferol e água; e d) Uva/Tocoferol, recebendo dieta aterogênica suplementada com 400mg/Kg de dieta de acetato de α -tocoferol e extrato de uva Níagara. O tratamento perdurou por onze semanas, e os animais receberam dieta, extrato e água *ad libitum*. O peso e consumo alimentar dos animais foram acompanhados semanalmente.

As dietas experimentais foram preparadas segundo protocolo da A.O.A.C., 1989, contendo: Sacarose (50%), caseína (20%), celulose (5%), óleo de soja (1%), colesterol (1%), banha de porco (15%), mistura vitamínica (1%), mistura mineral (5%) e bitartarato de colina (1%). A dieta suplementada continha ainda um acréscimo de 0,04% de acetato de α -tocoferol.

O extrato de uva foi preparado com uvas Níagaras Rosadas (*Vitis vinifera* L.) produzidas na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil, adquiridas no comércio local do município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. As frutas passaram por limpeza em água corrente e higienização em solução de hipoclorito a 500ppm.

Após esse procedimento 1,5kg de frutas foram processadas em liquidificador, sofrendo um acréscimo de 10,0 mL de água destilada. Após o processamento a mistura foi coada em pano de algodão limpo para a retirada do extrato inicial. O resíduo retido no pano foi novamente processado no liquidificador com o acréscimo de 10,0 mL de água destilada e posteriormente coagem em pano de algodão limpo, para a retirada do extrato final. O extrato foi acondicionado em sacos plásticos e armazenado em freezer (-25°C), protegido de luz e oxigênio. O extrato de uva foi ministrado para os animais na diluição de 1:5 extrato/água destilada. Foram dosados polifenóis solúveis e o teor de antocianinas.

Na última semana de tratamento foram recolhidas as fezes dos animais diariamente, sendo essas acondicionadas em potes plásticos e armazenadas em freezer (-25°C), até a análise bioquímica. Foram realizados dosagens de colesterol total, triacilgliceróis, polifenóis totais e perfil de ácidos graxos.

3.2 Amostras de Soro, Fígado, Coração e Aorta:

Os animais foram colocados em jejum por 12 horas antes de sofrerem eutanásia. O sangue foi coletado da artéria aorta abdominal e centrifugado (a 3400rpm por 15 minutos). O soro foi coletado, acondicionado em recipiente próprio e armazenado em freezer (-25°C) até o momento das análises bioquímicas. Foram realizadas dosagens de colesterol total, triacilgliceróis, vitamina E, polifenóis totais e hidroperóxidos lipídicos.

O fígado dos animais foi coletado após a eutanásia dos mesmos. O órgão foi lavado em solução tampão fosfato de sódio PBS (2,226g de NaH_2PO_4 , 11,915g

de Na_2HPO_4 , 87,6g de NaCl e 1,12g de EDTA, solução em pH 7,3), pesado, identificado e armazenado em freezer (-25°C) até o momento das análises bioquímicas. Foram realizadas dosagens de colesterol total, triacilgliceróis, vitamina E (α -tocoferol), malondialdeído, hidroperóxidos lipídicos e polifenóis solúveis. No tecido hepático realizou-se, ainda, a análise do perfil de ácidos graxos.

O coração e a aorta foram retirados dos animais, sendo a artéria seccionada até sua porção torácica descendente. Os tecidos foram perfundidos e lavados com solução tampão PBS e fixados em solução de paraformaldeído a 10% em PBS, à temperatura ambiente. Os tecidos foram incluídos em parafina, para obtenção de cortes histológicos consecutivos de $5\mu\text{m}$ de espessura. O material foi corado com hematoxilina e eosina para análise morfológica e morfométrica. Os cortes foram avaliados ao microscópio óptico para a verificação do início da lesão. Observado o início da lesão foram selecionados 16 cortes intercalados por outros 5 cortes, representando a área total da lesão.

Devido à escassez de tecidos para a realização das análises bioquímicas, as amostras foram selecionadas aleatoriamente para realização das mesmas.

3.3 Dosagem de Colesterol e Triacilgliceróis:

A dosagem de colesterol total e de triacilgliceróis foi realizada por meio de kits enzimáticos (doados pelos laboratórios KATAL e Bioclin) segundo a metodologia de ALLAIN *et al*, 1974, e BUCOLO & DAVID, 1973. As análises levaram em consideração a reação entre os peróxidos de hidrogênio (H_2O_2)

produzidos pela ação das enzimas lípase lipoprotéica, glicerol quinase e glicerolfosfato oxidase sobre os lipídios, e a enzima peroxidase, na presença de 4-aminoantipirina e p-clorofenol. A reação forma um composto de cor cereja. Nas fezes e fígado a dosagem foi realizada após a extração dos lipídios dos tecidos. Extração esta realizada segundo método proposto por FOLCH *et al*, 1957, com modificações segundo o proposto por PELUZIO *et al*, 2002. Em resumo, 100,0mg de amostra foram homogeneizadas com 1,9 mL de solução de clorofórmio/metanol (2:1). À mistura foram acrescentados 400 μ L metanol e posteriormente realizada centrifugação da mistura a 5000 rpm por 10 minutos. A fase superior foi transferida para tubo de ensaio seco, pesado e identificado. À solução acrescentados 800 μ L de clorofórmio e 640 μ L de solução aquosa NaCl 0,73% com posterior centrifugação a 5000 rpm, por 10 minutos. A fase superior foi descartada e as paredes do tubo foram lavadas três vezes com 500 μ L de solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água e 2% de NaCl 0,29%). Após cada lavagem a fase superior foi descartada. Os extratos lipídicos foram secos em estufa aberta a 50°C e os lipídios quantificados pela diferença de peso entre o tubo contendo os lipídios e o mesmo tubo vazio, previamente pesado. Os tubos foram borrifados com N₂ e armazenados em freezer (-25°C) até as análises.

3.4 Dosagem de Vitamina E:

A extração de vitamina E foi realizada segundo método proposto por UEDA & IGARASHI, 1990. Em uma alíquota de 400 μ L de homogenato de tecido ou soro foram acrescentados 1,0mL da solução de pirogalol (6% em etanol). A mistura foi aquecida em banho-maria, a 70°C, por 5 minutos. Foram adicionados 200 μ L de

solução de KOH (60% em metanol) e a mistura foi novamente levada ao banho-maria, a 70°C por, 30 minutos. Os tubos foram, então, resfriados em banho-de-gelo. Foi acrescentado 4,5mL de NaCl 1,0%, a mistura foi homogeneizada. Foi adicionado 3,0 mL de Acetato de Etila (10,0% em Hexano) e posterior centrifugação a 3400rpm, por 10 minutos. A fase superior foi retirada e reservada em frasco âmbar identificado. A solução reservada foi seca em N₂ e para a corrida cromatográfica, a amostra foi dissolvida em 100µL de n-hexano e injetada no aparelho.

Para a análise da vitamina E foi utilizada Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), o aparelho estava equipado com detector espectrofotométrico UV-visível de arranjos de diodos (Shimadzu), coluna Lichrospher, RP-18 (4,0 x 250 mm, 5 µm). Foi utilizada como fase móvel uma mistura de acetonitrila, metanol e hexano na proporção de 3:95:2. O fluxo da corrida foi 1 mL/minuto e o tempo de 10 minutos. O comprimento de onda utilizado no detector correspondeu à absorbância máxima do α -tocoferol, 295 nm.

Para o preparo do padrão vitamínico, foram utilizados 10 mg de α -tocoferol (Sigma-Aldrich®, EUA), que foi dissolvido em etanol a 96%, resultando numa solução estoque de 100 µg/mL. Foi realizada uma varredura do espectro de absorção da solução padrão na faixa ultravioleta, utilizando os comprimentos de onda de 190 a 350 nm. Para o cálculo da concentração real da solução padrão, utilizou-se o Coeficiente de Absorção Molar ($\epsilon_{0,1}$) = 70,8. A partir das equações de regressão linear se calculou os valores das concentrações de α -tocoferol das amostras.

3.5 Dosagem de Polifenóis Solúveis:

A determinação dos polifenóis foi realizada segundo o método de SINGLETON & ROSSI (1965). A 100 μ L de amostras diluídas 10 vezes foram acrescentadas de 3,0 mL de solução de Na₂CO₃ 2% e 100 μ L de reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 5x). A mistura foi homogeneizada e colocada em repouso por 60 minutos em temperatura ambiente. Após o tempo de reação a absorbância das amostras foi verificada em Espectrofotômetro GBC UV/VIS 911-A a 750nm. Para a determinação da concentração dos polifenóis solúveis foi construída uma curva padrão utilizando o ácido gálico como padrão, em soluções diluídas para se obter linearidade: 0,005g/l até 0,08g/L.

3.6 Determinação de Antocianinas do Extrato de Uva:

O teor de antocianinas foi obtido com base na técnica proposta por LEES & FRANCIS, 1972. O extrato de uva foi diluído em solução de etanol 70% na proporção 1:5. O pH da mistura foi ajustado para 2,0 por meio da adição de solução de HCl 1Mol/L. A mistura foi colocada sob refrigeração por 24 horas, protegidas da luz e oxigênio. Após o tempo de extração a mistura foi filtrada. O filtrado foi transferido para um balão volumétrico e acrescido de solução de etanol 70% até o volume de 25 mL. O conteúdo do balão foi transferido para um funil de separação. Acrescentou-se solução de éter etílico: éter de petróleo (1:1), recolheu-se à fase inferior. Desta retirou-se 2 mL e completou-se o volume com solução de etanol 70% para 5 mL. A absorbância da mistura foi verificada em

Espectrofotômetro GBC UV/VIS 911-A a 535nm, utilizando como branco a solução de etanol. Para a determinação da concentração de antocianinas levou-se em consideração um ϵ_0 de $98,2\text{m}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Sendo a concentração em g/100mL calculada dividindo a absorbância encontrada pelo ϵ_0 , equivalente.

3.7 Dosagem de Malondialdeído (MDA)

As quantidades de malondialdeído (MDA), produtos da peroxidação lipídica susceptíveis a oxidação com o ácido tiobarbitúrico, foram dosadas segundo o método desenvolvido por GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1990. Em uma alíquota de 1,0 mL de suspensão do homogenato da amostra foi acrescentado 2,0 mL de reagente T-BARS. A mistura foi homogeneizada e aquecida em Banho-Maria a 80°C por 15 minutos. Depois de resfriada, a mistura foi centrifugada a 3400 rpm por 10 minutos (para a separação do precipitado) e o sobrenadante foi analisado em Espectrofotômetro GBC UV/VIS 911-A a 535nm contra um branco contendo tampão PBS. O cálculo da quantidade de MDA em nmoles foi calculado levando-se em consideração um Coeficiente de Extensão ou de Absorção Molar (ϵ_0) de 0,156.

3.8 Dosagem de Hidroperóxidos Lipídicos

Os subprodutos da peroxidação lipídica capazes de oxidar o íons ferroso (Fe^{3+}) em férrico (Fe^{2+}), foram dosados segundo método proposto por NOUROOZ-ZADEH *et al*, 1994. Foram realizados dois ensaios. No primeiro a uma alíquota de 45 μL de suspensão do homogenado da amostra foram acrescidos de 5 μL de solução de TPP (Trifenilfosfina 1nM em metanol). A mistura reagiu à temperatura

ambiente por 30 minutos. Após esse período foram acrescentados 450 μ L de solução de FOX-2 (solução contendo um volume de solução de indicador colorimétrico alaranjado de xilenol e sulfato ferroso amoniacal dissolvidos em 250nM de H₂SO₄, e nove volumes de solução de BHT-hidroxitolueno butilado, 4mM em metanol). A mistura reagiu à temperatura ambiente por 30 minutos. A mistura foi centrifugada a 12000rpm por 5 minutos. No segundo ensaio uma alíquota de 50 μ L de amostra foi acrescida de 450 μ L de solução de FOX-2, a mistura reagiu à temperatura ambiente por 30 minutos. Após a reação foi centrifugada a 12000rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes de ambos os ensaios foram lidos em Espectrofotômetro GBC UV/VIS 911-A a 560nm contra um branco contendo tampão PBS. O cálculo da quantidade de hidroperóxidos foi realizado considerando um ϵ_0 de a 3,4x10⁵m⁻¹cm⁻¹. Sendo a concentração expressa em mol calculada dividindo a absorbância encontrada pelo ϵ_0 , equivalente. Para a quantificação dos hidroperóxidos não peróxidos de hidrogênio (H₂O₂) os resultados obtidos no primeiro ensaio foram subtraídos dos resultados obtidos no segundo.

3.9 Análise do Perfil de Ácidos Graxos:

Após extração dos lipídios dos tecidos hepático e fecal realizou-se a saponificação e esterificação dos extratos lipídicos para a análise em Cromatografia Gasosa (CG). A metodologia empregada para saponificação e esterificação do extrato lipídico foi proposta por HARTMAN & LAGO (1986). Em resumo a uma alíquota de 50mg de lipídio, oriundos do extrato lipídico, foi

acrescentado 4,0 mL de reagente de saponificação (NaOH em metanol), a mistura foi aquecida em banho-maria, a 80°C, por 15 a 20 minutos. Foram adicionados 10,0 mL de reagente de esterificação, a mistura foi novamente levada a banho-maria, a 80°C, por 10 a 15 minutos. Depois do aquecimento a mistura foi esfriada até 40°C e nela adicionou-se 0,5 mL de hexano e 5,0 mL de solução de NaCl 20%. A mistura foi homogeneizada em vórtex. A fase superior foi recolhida em frasco âmbar identificado. À mistura restante no tubo foi adicionado 0,5mL de hexano, realizou-se nova homogeneização e coleta da fase superior para o frasco âmbar. O solvente foi seco em nitrogênio. O extrato lipídico saponificado e esterificado foi ressuspenso em hexano, na concentração de 50mg/mL. Para a corrida cromatográfica foi injetado uma alíquota de 1µL da solução em cromatógrafo da marca CG-17^A Shimadzu/Class, equipado com coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 (biscianopro2pil polysiloxane) de 100m e 0,25mm de diâmetro. O gás de arraste (fase móvel) foi o nitrogênio. A corrida teve início com a temperatura da coluna em 100°C, aumentando 10°C/min até atingir 180°C. Após esse período a temperatura da coluna aumentou 1°C/min até atingir 240°C, permanecendo nessa temperatura por 10 min. As temperaturas do injetor e detector foram 250°C e 270°C, respectivamente. A identificação dos ácidos graxos levou em consideração os tempos de retenção de um padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos padrão (SupelcoTM 37 Component FAME Mix).

3.10 Análise Morfológica e Morfométrica:

A análise morfológica foi realizada segundo a classificação proposta por STARY *et al*, 1995. Considerou-se a presença de características histopatológicas específicas de seis diferentes graus da lesão aterosclerótica (Quadro1).

Quadro 1: Seis diferentes graus de lesão aterosclerótica (I a VI) e suas características morfológicas.

Tipo	Características
I	Espessamento do endotélio com acúmulo inicial de macrófagos repletos de colesterol
II	Acúmulo acentuado de macrófagos repletos de colesterol
III	Acúmulo de pequenos pools de lipídios na íntima vascular
IV	Formação de um núcleo lipídico
V	Formação de núcleo lipídico e capa fibrosa, ou vários centros lipídicos e uma camada fibrótica, ou a presença de calcificação.
VI	Defeitos na camada superficial da placa, presença de hematoma-hemorrágico e trombo.

Fonte: STARY et al, 1995

A análise morfométrica foi realizada utilizando-se a média da área das três maiores lesões de cada animal. Utilizando-se para captura de imagens o

microscópio óptico Olympus Provis U-MCB acoplado, em câmera digital Spot Insight Color e computador. As imagens foram medidas por meio do software Image-Pro Plus 4.5, do Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa.

3.11 Análise Estatística:

Foi realizado teste de normalidade em todas as variáveis estudadas, para a escolha do melhor teste estatístico. Quando a distribuição dos dados apresentou-se 'normal' (sobre uma Curva de Gauss), foi realizado o teste análise de variância ANOVA complementado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Quando os dados não apresentaram distribuição normal foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal – Wallis complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's. Foi admitido um nível de significância (p) inferior a 5%, conferindo ao estudo uma confiabilidade de 95%. Para a análise dos dados foi utilizado o software Sigma Stat 2.03. Os dados foram apresentados em médias, desvios padrão e medianas.

Para a análise histológica foi realizado o teste estatístico Qui-quadrado, admitindo-se um nível de significância (p) inferior a 5%, conferindo ao estudo uma confiabilidade de 95%, utilizando-se o software EpiInfo 6.

4. Resultados:

4.1 Consumo Alimentar e Crescimento dos Animais

Os tratamentos não influenciaram no consumo alimentar e crescimento dos animais (ganho ponderal, peso do fígado e peso relativo do fígado) (Tabela 1). Como esperado devido à suplementação o consumo de α -tocoferol foi de dez vezes maior nos grupos suplementados.

4.2 Consumo do Extrato de Uva e Teores de Polifenóis e Antocianinas do Extrato

O consumo estimado de extrato de uva dos animais foi de 9,7 mL/dia/animal, obtendo um consumo de 32,11mg de polifenóis por dia (Tabela 2).

Tabela 1: Parâmetros de crescimento dos animais, peso inicial e final, peso do fígado, peso relativo e consumo de dieta e α -tocoferol nos diferentes grupos experimentais de camundongos Apo E-/-:

Parâmetro	Controle (n=12)			Tocoferol (n=9)			Uva (n=15)			Uva e Tocoferol (n=13)		
	μ	σ	md	μ	σ	md	μ	σ	md	μ	σ	md
Peso Inicial(g)	14,25	2,22	15,00	16,07	1,44	16,00	16,00	3,53	15,00	16,00	3,92	15,00
Peso final(g)	23,50	4,34	23,00	23,83	1,57	24,00	22,33	2,83	24,00	25,30	3,83	25,5
Peso do fígado(g)	1,39	0,20	1,39	1,34	0,17	1,34	1,28	0,12	1,29	1,40	0,32	1,45
Peso Relativo do												
Fígado (%)	5,48	0,54	5,70	5,56	0,77	5,78	5,33	0,69	5,33	5,79	1,21	6,17
Consumo semanal												
de dieta(g/animal)	18,24	5,86	17,3	18,30	5,27	17,7	19,07	6,59	18,3	18,65	6,53	17,6
Ingestão estimada												
de α-tocoferol	0,018 ^a			0,175 ^b			0,019 ^a			0,179 ^b		
(mg/semana/animal)												

Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística $p < 0,05$. Segundo o teste estatístico ANOVA/Tukey.

μ : Média

σ : Desvio Padrão

md: Mediana

Tabela 2: Teor de polifenóis e antocianinas do extrato de uva oferecido aos diferentes grupos experimentais de camundongos Apo E-/-:

	Teor no extrato sem diluição	Teor estimado ingerido pelos animais
Polifenóis totais	331,00 ± 51,00 mg/100g	33,11 mg/dia
Antocianinas	248,75 ± 132,45 mg/100g	24,13 mg/dia

4.3 Determinação do Colesterol Total e dos Triacilgliceróis Séricos, Hepáticos e Fecais.

Os antioxidantes apresentaram um efeito hipocolesterolêmico, com uma redução de 15,71% nos níveis séricos de colesterol total dos animais que receberam extrato de uva, 35,85% de redução nos níveis séricos dos animais que receberam α -tocoferol e 43,54% no grupo que recebeu ambos antioxidantes (Tabela 3).

Os níveis hepáticos de colesterol também se apresentaram menores naqueles animais que receberam antioxidantes. Observou-se uma redução de 44,80% no grupo que recebeu extrato de uva, 48,80% no grupo que recebeu α -tocoferol e de 67,46% nos níveis hepáticos do grupo que recebeu ambos antioxidantes (Tabela 3).

Observou-se um aumento da excreção fecal de colesterol nos animais que receberam apenas extrato de uva ou α -tocoferol isoladamente. Os animais que receberam extrato de uva apresentaram um aumento de 50,37% e os animais que receberam α -tocoferol um aumento de 69,06%, na excreção fecal de colesterol.

Os dois antioxidantes quando ministrados em conjunto não induziram aumento da excreção fecal (Tabela3).

Os tratamentos não influenciaram os níveis séricos e hepáticos de triacilgliceróis. Contudo o consumo de extrato de uva levou a um aumento significativo na excreção fecal do lipídio (Tabela 3).

Tabela 3: Níveis de colesterol total e triacilgliceróis séricos, hepáticos e fecais nos diferentes grupos experimentais de camundongos Apo E-/-:

Parâmetro	Controle			Tocoferol			Uva			Uva e Tocoferol		
	μ	σ	md	μ	σ	md	μ	σ	md	μ	σ	md
Colesterol total	N= 12			n= 9			n= 12			n= 12		
Sérico(mg/dL)	1024,71 ^a	83,21	1010,82	657,36 ^{bc}	69,65	630,38	863,74 ^b	132,47	885,61	578,56 ^c	196,27	601,38
Hepático(mg/g)	25,78 ^a	2,61	24,80	13,20 ^b	3,13	13,00	14,23 ^b	3,32	14,07	8,39 ^c	2,01	8,30
Fecal(mg/g)*	14,77 ^a	2,52	14,35	24,97 ^{bc}	0,54	24,58	22,21 ^{bd}	3,63	23,85	18,27 ^{acd}	1,91	17,69
Triacilgliceróis	n= 6			n= 6			n= 6			n= 6		
Sérico(mg/dL)	204,07	90,00	178,89	132,21	30,01	139,96	146,07	62,77	124,16	127,43	45,17	110,50
Hepático(mg/g)	85,78	24,58	89,50	87,41	12,94	91,42	63,34	14,67	66,44	83,68	24,12	86,14
Fecal(mg/g)*	2,04 ^a	1,07	2,01	-	-	-	17,21 ^b	3,54	17,51	17,91 ^b	1,20	17,84

Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística ($p < 0,05$). Segundo o teste estatístico ANOVA/Tukey.

μ : Média

σ : Desvio Padrão

md: Mediana

* Pool de amostras.

4.4 Determinação de Vitamina E e Polifenóis Séricos, Hepáticos e Fecais.

O nível sérico de vitamina E apresentou-se maior no grupo que recebeu ambos antioxidantes. Observou-se que os animais que receberam apenas extrato de uva apresentaram níveis semelhantes àqueles que receberam α -tocoferol. Os níveis hepáticos de vitamina E apresentaram uma redução de 57,30% nos animais que receberam apenas extrato e uma redução de 45,16% nos animais que receberam extrato de uva e α -tocoferol (Tabela 4).

O tratamento com extrato de uva não alterou os níveis séricos e hepáticos de polifenóis, contudo observou-se redução na excreção fecal de 64,96% no grupo que recebeu apenas extrato de uva e de 58,09% no grupo que recebeu ambos antioxidantes(Tabela 4).

Tabela 4: Níveis de vitamina E e polifenóis, séricos, hepáticos e fecais nos diferentes grupos experimentais de camundongos Apo E-/-:

Parâmetro	Controle			Tocoferol			Uva			Uva e Tocoferol		
	μ	σ	md	μ	σ	md	μ	σ	md	μ	σ	md
Vitamina E	n= 6			n= 5			n= 5			n= 7		
Sérico(mg/dL)*			2,24			4,95			6,45			8,25
Hepático(μ g/g)	16,23 ^a	1,96	16,41	19,79 ^a	6,89	19,89	6,93 ^b	1,70	6,84	8,90 ^b	2,27	8,85
Polifenóis solúveis	n= 10			n= 9			n= 10			n= 10		
Sérico(mg/dL)	4,33	0,81	4,36	4,81	0,27	4,79	4,15	0,60	4,04	4,28	1,47	4,41
Hepático(mg/g)	6,82	2,66	6,72	7,44	3,44	7,91	4,29	2,01	2,99	4,69	1,84	4,95
Fecal(mg/g)*	1,68 ^a	0,27	1,80	1,94 ^a	0,07	1,94	0,58 ^b	0,13	0,54	0,70 ^b	0,17	0,75

Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística ($p < 0,05$). Segundo o teste estatístico ANOVA/Tukey.

μ : Média

σ : Desvio Padrão

md: Mediana

* Pool de amostras.

4.5 Determinação de MDA e Hidroperóxido Lipídicos Séricos e Hepáticos

Os tratamentos não influenciaram os níveis hepáticos de MDA como pode ser observado na Tabela 5.

Nos hidroperóxidos lipídicos tanto séricos quanto hepáticos não se observou diferença significativa com os tratamentos com os antioxidantes. Contudo nota-se uma tendência à redução desses níveis quando foram ministrados tanto o extrato de uva e o α -tocoferol. Os animais que receberam extrato de uva e α -tocoferol apresentaram uma redução de 38,01% no níveis séricos e de 38,44 % nos níveis hepáticos de hidroperóxidos em relação ao animais do grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5: Parâmetros da peroxidação lipídica (malondialdeídos e hidroperóxidos lipídicos) nos diferentes grupos experimentais de camundongos Apo E-/-:

Parâmetro	Controle			Tocoferol			Uva			Uva e Tocoferol		
	μ	σ	md	μ	σ	md	μ	σ	md	μ	σ	md
Malondialdeído	n= 5			n= 6			n= 4			n= 4		
Hepático (nmol/g de fígado)	9,30	4,90	9,42	10,86	6,12	9,05	7,23	1,42	7,02	6,06	2,28	5,51
Hidroperóxidos Lipídicos	n= 7			n= 7			n= 6			n= 6		
Sérico(nmol)	275,84	152,25	197,06	346,88	79,22	248,53	270,22	187,57	105,62	171,00	60,45	161,03
Hepático(nmol)	189,12 ^{abc}	75,07	191,18	211,76 ^{abc}	95,47	161,76	319,61 ^{ab}	187,10	285,29	116,42 ^{ac}	40,47	111,77

Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística ($p < 0,05$). Segundo o teste estatístico ANOVA/Tukey.

μ : Média

σ : Desvio Padrão

md: Mediana

4.6 Determinação do Perfil de Ácidos Graxos Hepático e Fecal

No tecido hepático não houve alteração no perfil de ácidos graxos saturados e poliinsaturados totais. O tratamento com alfa-tocoferol apresentou maior percentual de ácidos graxos monoinsaturados total em relação ao tratamento com extrato de uva. A suplementação alimentar com alfa-tocoferol preservou o ácido graxo oléico (C18.1), quando comparada à utilização do extrato de uva. O consumo alimentar de extrato de uva apresentou um maior percentual do ácido graxo 4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico ou DHA (C22.6) (Tabela 6).

Observou-se, no perfil de ácido graxos fecal, redução na excreção fecal de DHA quando os animais receberam suplementação alimentar com alfa-tocoferol. Nota-se que os tratamentos com antioxidantes proporcionaram um ligeiro aumento na excreção fecal de ácidos graxos saturados e menor excreção de ácidos graxos mono e poliinsaturados (Tabela 7).

Tabela 6: Perfil de ácidos graxos hepático nos diferentes grupos experimentais de camundongos Apo E-/-:

Ácidos Graxos (%)	Controle (n=12)			Tocoferol (n=9)			Uva (n=14)			Uva e Tocoferol (n=13)		
	μ	σ	md	μ	σ	md	μ	σ	md	μ	σ	md
Saturados	15,25	13,78	10,36	10,93	10,70	3,59	17,92	18,60	16,04	16,58	10,14	16,56
C16.0	16,41	1,35	16,88	-	-	14,56	13,27	4,89	15,86	15,71	4,17	17,79
C18.0	4,94	2,30	4,63	4,37	1,63	3,59	6,98	3,62	6,42	7,45	4,72	5,92
Monoinsaturados	64,35	17,94	67,29 ^{ab}	71,98	26,46	81,83 ^a	48,09	20,06	44,76 ^b	51,48	16,68	57,97 ^{ab}
C15.1	23,17	4,18	23,04 ^{abc}	27,42	3,79	26,00 ^a	21,32	3,18	20,91 ^b	21,57	2,13	21,17 ^{bc}
C16.1	2,51	0,83	2,44	2,93	1,08	2,88	2,46	1,63	2,47	2,44	0,99	2,26
C18.1	43,58	7,77	45,15 ^{ab}	47,50	14,13	49,99 ^a	32,57	14,30	25,44 ^b	36,97	8,25	37,29 ^{ab}
Poliinsaturados	26,49	7,02	26,80	24,53	11,91	19,94	34,35	14,64	28,06	31,08	8,51	30,05
C18.2	14,57	2,72	13,90	20,02	10,06	15,23	12,53	2,12	12,60	13,19	2,36	13,07
C18.3	1,35	0,08	1,35	-	-	1,88	0,84	0,37	0,86	-	-	1,00
C20.4	8,20	2,50	5,54	5,78	1,38	5,54	11,88	6,16	13,23	10,04	4,38	8,76
C22.6	5,67	2,32	5,14	4,70	1,94	3,94	10,64	6,17	9,77	7,48	1,97	7,22

Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística ($p < 0,05$). Segundo o teste estatístico Kuskal-Wallis/Dunn's.

μ: Média

σ : Desvio Padrão

md: Mediana

Tabela 7: Perfil de ácidos graxos fecal nos diferentes grupos experimentais de camundongos Apo E-/-:

Ácidos Graxos*	Controle			Tocoferol			Uva			Uva e Tocoferol		
	(n=6)			(n=6)			(n=6)			(n=6)		
(%)	μ	σ	md	μ	σ	md	μ	σ	md	μ	σ	md
Saturados	15,19	13,18	21,91	51,68	17,49	50,80	24,75	21,48	35,75	29,79	33,40	29,64
C18.0	22,03 ^a	0,17	22,03	46,48 ^b	5,06	45,78	37,13 ^b	1,95	37,13	30,27 ^a	2,08	30,27
Monoinsaturados	73,55	18,69	71,30	35,10	19,75	43,75	55,60	23,67	43,68	45,52	13,47	50,32
C15.1	17,63	11,13	22,15	22,92	1,88	23,30	24,89	0,87	25,38	22,48	3,43	22,48
C18.1	23,30	19,68	23,67	17,84	19,68	17,68	15,53	5,84	12,99	21,91	7,17	22,89
Poliinsaturados	29,47	14,42	29,40	23,23	32,18	8,10	19,80	2,27	20,57	14,37	5,06	13,50
C18.2	8,04	2,51	8,04	4,08	0,71	4,19	5,22	1,64	4,31	5,22	2,92	4,75
C22.6	19,71 ^a	4,69	19,59	3,71 ^b	3,80	3,71	14,58 ^a	3,89	16,26	9,75 ^a	6,48	9,75

Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística ($p < 0,05$). Segundo o teste estatístico ANOVA/Tukey.

μ: Média

σ : Desvio Padrão

md: Mediana

*Pool de amostras

4.7 Análise Morfológica e Morfométrica das Lesões ateromatosas dos Grupos Experimentais de Camundongos ApoE-/-

Pela análise histológica das lâminas os animais do grupo controle e do grupo uva e grupo tocoferol não apresentaram diferença estatística no grau de evolução da lesão, contudo os animais que receberam ambos antioxidantes, extrato de uva e tocoferol, apresentaram menor grau de desenvolvimento da lesão aterosclerótica (Tabela 8). Pode se observar a formação de centro lipídico, como a presença de cristais de colesterol. Observou-se também calcificação de algumas áreas da lesão e a formação de capa fibrosa (Figuras 1 e 2).

Na figura 1C observa-se a migração de células inflamatórias para a área subjacente a lesão inicial, tal formação recebe o nome de ombro.

Nos animais que receberam suplementação com α -tocoferol, sem extrato e com extrato, as lesões se apresentaram em menor grau de desenvolvimento. A maioria das lesões caracterizava-se pelo acúmulo inicial de células espumosas e a presença de pequenos acúmulos de lipídios (Figuras 3 e 4). A suplementação com α -tocoferol não foi capaz de prevenir a formação de centros necróticos e de capa fibrosa, características da lesão avançada (Figura 3B).

A área da maior lesão aterosclerótica, avaliado pela morfometria, não variou nos diferentes grupos, demonstrando que os tratamentos não influenciaram no tamanho da lesão aterosclerótica (Figura 5).

Tabela 8: Classificação do grau de evolução das lesões ateroscleróticas nos diferentes grupos experimentais de camundongos Apo E-/-.

Grupo	Classificação das lesões	Proporção de acordo com estágio da lesão		
		Inicial	Intermediário	Avançado
Controle	VI, III, III, V, V, V,			
(n=12)	V, V, III, III, IV	0,0%	50,0%	50,0%
Tocoferol	II, V, II, IV, II, IV,			
(n=8)	IV, IV	37,5%	50,0%	12,5%
Uva	V, V, IV, IV, IV, II,			
(n=15)	II, V, V, IV, IV, IV,	13,3%	53,3%	33,4%
	III, III, V			
Uva e	IV, III, IV, II, III, IV,			
Tocoferol*	IV, II, III, I	30,0%	70,0%	0,0%
(n=10)				

* Representam diferença estatística ($p < 0,05$). Segundo o teste estatístico Qui-quadrado.

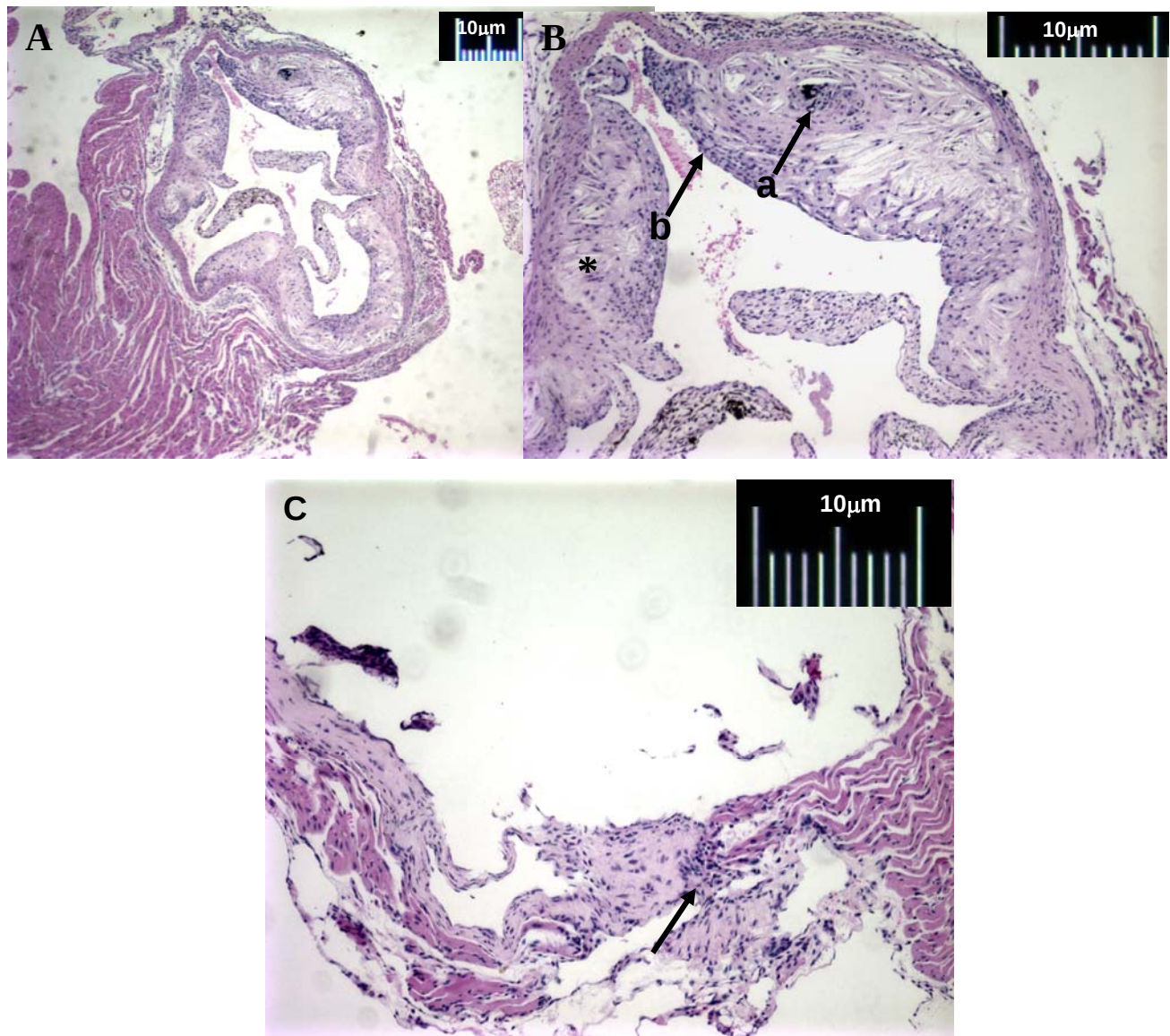


Figura 1: Placas ateromatosas apresentadas por camundongos ApoE $-/-$ do grupo Controle. A: Aspecto histológico da lesão aterosclerótica. B: Lesão mostrada em A, em detalhe, observa-se centro lipídico (*), área de calcificação (a) e a presença de capa fibrosa (b). C: Lesão aterosclerótica na fase inicial apresentando infiltração de células inflamatórias.

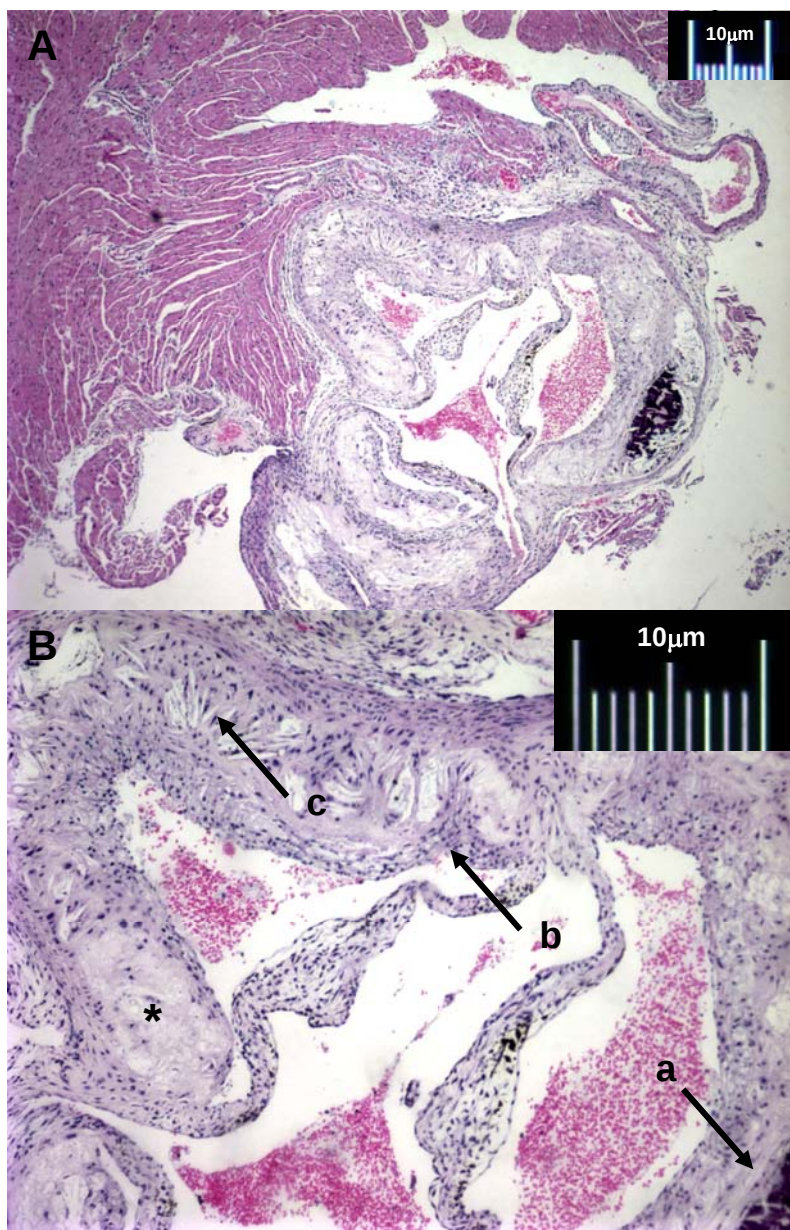


Figura 2: Placas ateromatosas apresentadas por camundongos ApoE $-/-$ do grupo Uva. A: Aspecto histológico observado no aumento de 40x. B: Lesão mostrada em A, em detalhe, observa-se centro lipídico (*), área de calcificação (a), presença de capa fibrosa (b) e a presença de cristais de colesterol (c).

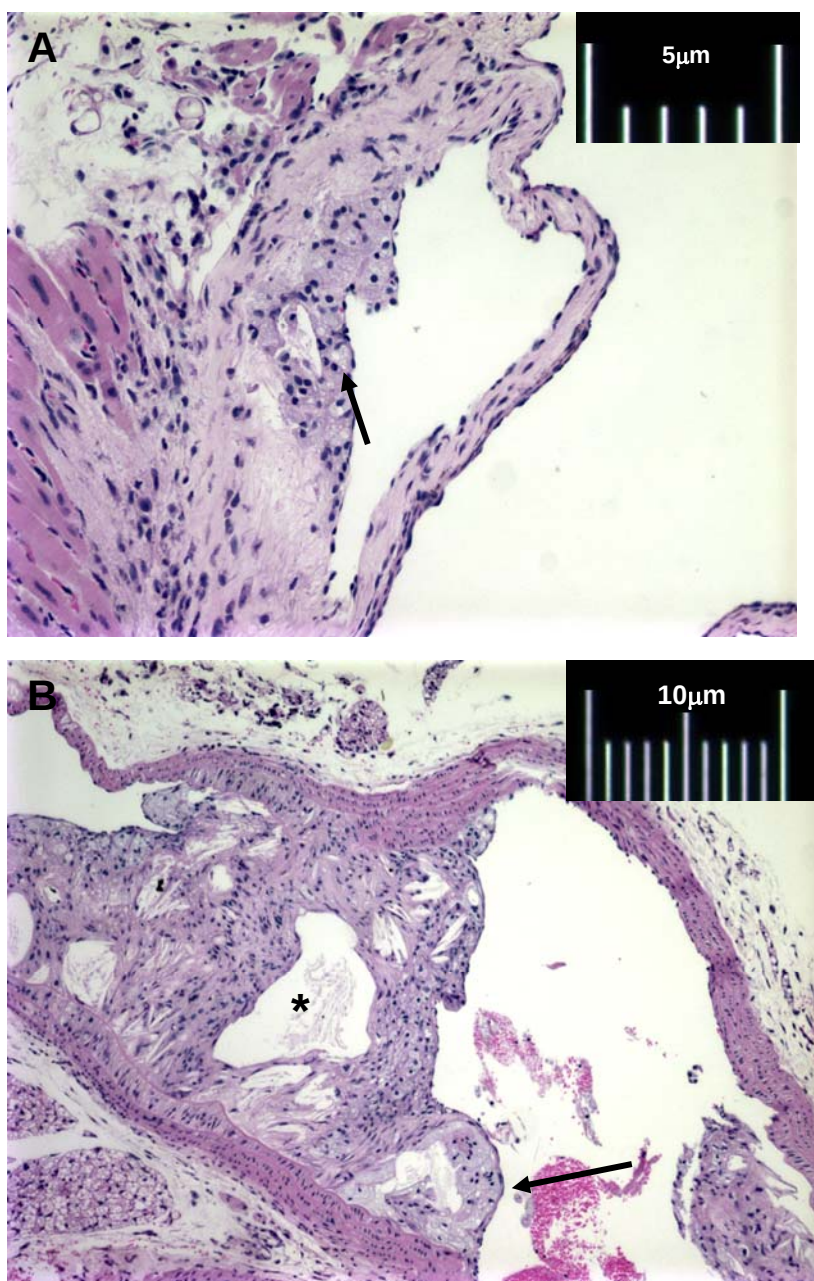


Figura 3: Placas ateromatosas apresentadas por camundongos ApoE $-/-$ do grupo Tocoferol. A: lesão inicial observa-se o acúmulo de células espumosas. B: lesão avançada, apresentando centros necróticos (*) e capas fibrosas (seta).

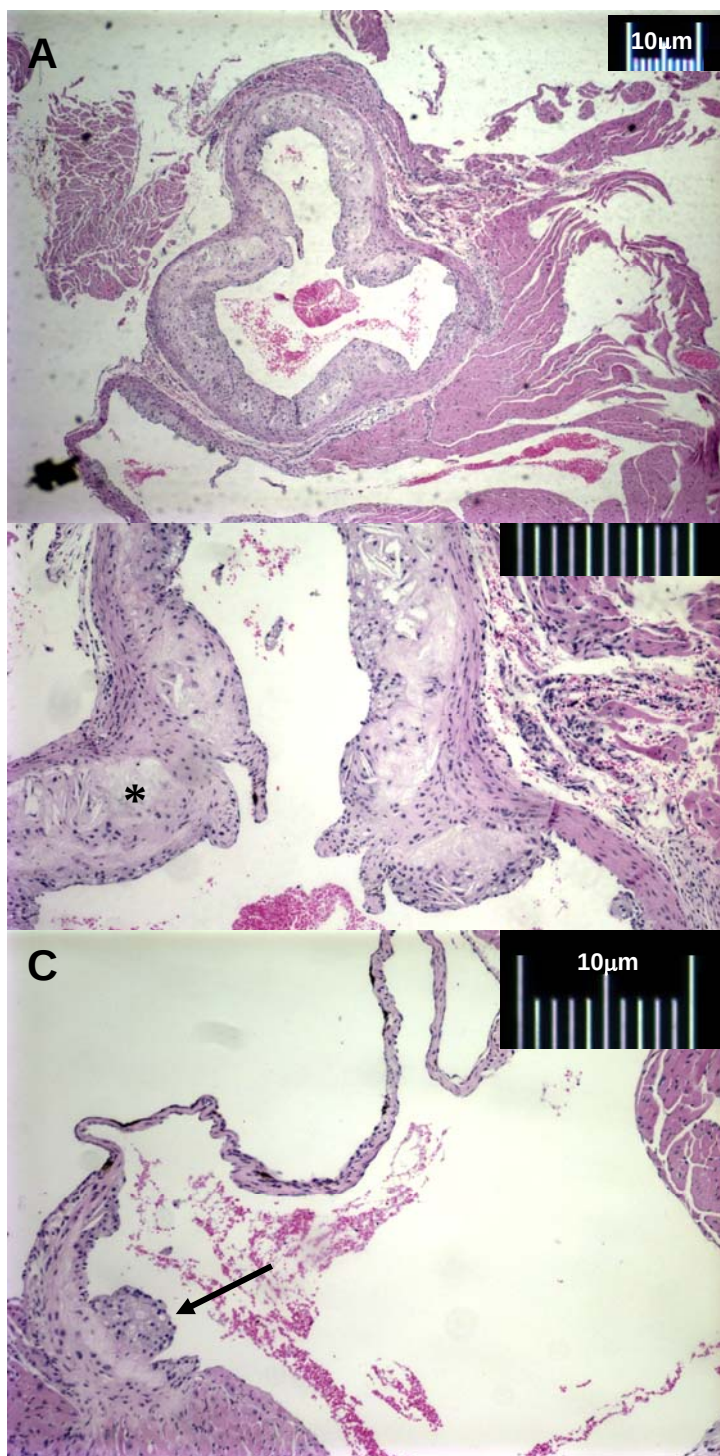


Figura 4: Placas ateromatosas apresentadas por camundongos ApoE $-/-$ do grupo Uva e Tocoferol . A: Aspecto histológico de uma lesão intermediária. B: lesão mostrada em A, em detalhe, observa-se centro lipídico (*). C: Lesão inicial com o acúmulo de células espumosas (seta).

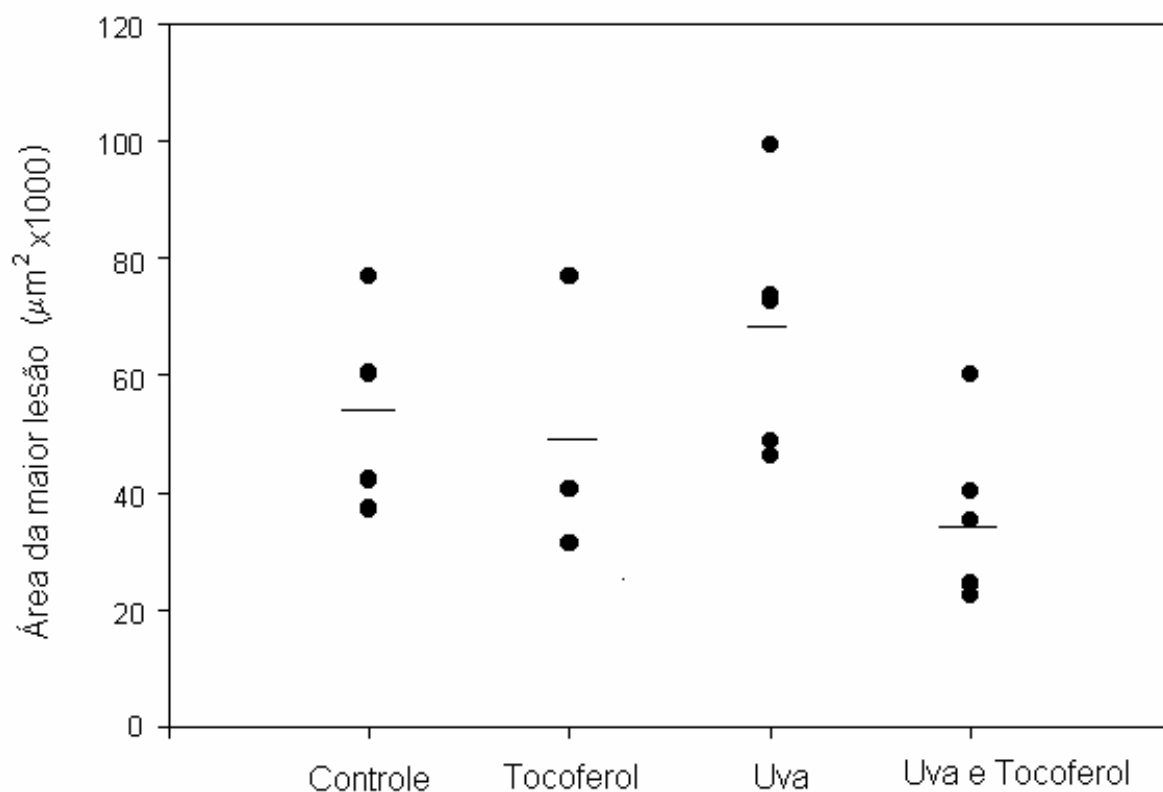


Figura 5: Avaliação morfométrica da área da maior lesão aterosclerótica de camundongos ApoE^{-/-} alimentados com dieta aterogênica (Controle, n=4), com α -tocoferol (Tocoferol, n=3), com extrato da uva (Uva n=4) e extrato de uva e α -tocoferol (Uva e Tocoferol, n=5). Onde ● significa cada medida e — significa a média das áreas de maior lesão.

5. Discussão:

Os resultados não demonstraram influências do tratamento com polifenóis e com α -tocoferol no ganho ponderal e consumo alimentar. Também não foram influenciados pelo gênero dos animais, ou seja, machos e fêmeas.

O consumo de polifenóis foi 32,11 mg por dia, valor muito próximo à ingestão associada aos efeitos benéficos descritos para seres humanos, de 23,00 mg/dia (HERTOG *et al*, 1993). O consumo de α -tocoferol nos grupos suplementados, como esperado, foi dez vezes maior em relação ao consumo dos grupos não suplementados, uma vez que o conteúdo da vitamina na dieta suplementada foi dez vezes maior. Apesar desse aumento, quando extrapolamos esses valores para os valores recomendados para seres humanos, observamos que um consumo dez vezes maior que o recomendado, de 15 mg/dia, acarretaria em um consumo de 150 mg/dia. Esse nível de ingestão é inferior ao limite de ingestão máxima tolerável que é de 1000mg/dia. Sendo assim a suplementação utilizada nesse estudo seria segura, uma vez que não atinge os níveis que poderiam levar a manifestações de efeitos adversos da vitamina (DRI, 2000).

Os resultados encontrados no peso relativo do fígado indicam crescimento satisfatório dos animais independente do tratamento. Esse índice pode ser utilizado como um parâmetro confiável para a avaliação do crescimento uma vez que, o fígado é o principal órgão do metabolismo sendo responsável pela distribuição e metabolização de proteínas e lipídios, além do armazenamento e metabolização de uma série de nutrientes e não nutrientes (CARVALHO, 1995).

No estudo de Yang & Koo (2000) ao contrário do presente estudo, observaram uma redução no peso do fígado de animais que consumiram chá verde, uma das principais fontes de polifenóis da alimentação humana. Atribuíram esse efeito à ação inibitória das catequinas do chá na absorção de lipídios no intestino, inibindo a reabsorção dos sais biliares por modificar a formação de micelas e aumentar a excreção fecal de bile.

A hipercolesterolemia é um dos principais fatores de risco para a aterosclerose. Níveis elevados de colesterol na corrente sanguínea podem levar a alteração da função vascular, aumentando a permeabilidade da parede vascular a moléculas de LDL, ponto chave na formação do ateroma. Além disso, pode levar a um aumento na expressão de moléculas de adesão endotelial e de substâncias quimiotáticas de macrófagos aumentando a formação de células espumosas (KOGA *et al*, 2004).

O efeito hipocolesterolêmico dos polifenóis e do α -tocoferol foi observado no presente estudo com uma redução significativa também nos níveis de colesterol hepáticos, associados a um aumento da excreção fecal de colesterol. Contudo, esse efeito dos antioxidantes estudados sobre os níveis de colesterol ainda é controverso e parece estar mais relacionado ao consumo de polifenóis do que ao consumo de α -tocoferol.

Avaliando-se o consumo de polifenóis do chá verde foi observado a redução nos níveis de colesterol sérico e hepático em ratos hipercolesterolêmicos (YANG & KOO, 2000). Contudo o consumo de chá verde por ratos que não sintetizam vitamina C, por outro lado, não reduziu os níveis de colesterol

(KASAOKA *et al*, 2002), resultado também observado após a ingestão oral de ácido caféico, um importante flavonóide encontrado na uva (TEISSEDRE & LANDRAULT, 2000), em um estudo com camundongos ApoE $-/-$ (HISHIKAWA *et al*, 2005). Já o consumo de vinho tinto, sem álcool, foi associado a uma redução nos níveis séricos de colesterol em hamsters (VISON, 2001).

Quanto ao consumo de vitamina E Peluzio *et al* (2002), Cyrus *et al* (2003) e Koga *et al* (2004) não observaram redução nos níveis de colesterol de camundongos ApoE $-/-$, camundongos LDL $-/-$ e coelhos respectivamente, tratados com diferentes doses de vitamina E.

O efeito hipocolesterolêmico desses antioxidantes pode ser atribuído à ação dessas substâncias sobre o metabolismo celular. Polifenóis encontrados no vinho sem álcool diminuem a síntese de apolipoproteína Apo B pelas células hepáticas, diminuindo assim, a produção de lipoproteínas de transporte de lipídios no plasma. Também parecem aumentar a expressão de receptores de LDL em células hepáticas e a expressão de enzima HMG-CoA redutase, chave no metabolismo de colesterol (PAL *et al*, 2003a). A vitamina E também parece atuar estimulando a expressão dos receptores de LDL nas células, aumentando a captação de colesterol pelas células hepáticas e reduzindo os níveis plasmáticos de colesterol (PAL *et al*, 2003b).

Os níveis séricos e hepáticos de triacilgliceróis, por sua vez, não sofreram influências dos tratamentos, resultados semelhantes aos encontrados por Yang & Koo (2000), em ratos hipercolesterolêmicos alimentados com polifenóis do chá verde. Vison *et al* (2001), em seu estudo com hamsters hipercolesterolêmicos, tratados com suco de uva e vinho sem álcool, também não encontraram alteração

nos níveis de triacilgliceróis após o tratamento. CYRUS *et al* (2003) também não observaram diferença nos níveis de triacilgliceróis de camundongos LDL-/- alimentados com vitamina E.

Contudo, Fuhrman *et al* (2000) e Stocker & O'Hallam (2006) observaram a redução dos níveis séricos de triacilgliceróis após o consumo de polifenóis do gengibre e do vinho sem álcool, respectivamente. Ambos estudos tiveram como modelo experimental camundongos ApoE-/-.

O efeito hipotrigliceridêmico poderia ser resultado da influência de procianidinas nos enterócitos inibindo a síntese de lipoproteínas intestinais, contudo as procianidinas presentes na uva parecem não ter o mesmo efeito que as procianidinas encontradas na maçã (VIDAL *et al*, 2005).

Observou-se aumento significativo da excreção fecal de triacilgliceróis neste estudo, efeito esse que poderia ser atribuído à interação dos polifenóis e das proteínas digestivas alterando o metabolismo de lipídios e reduzindo a biodisponibilidade dessas substâncias (COOK & SAMMAN, 1996). Substâncias polifenólicas podem ter ação antinutricional comprometendo a permeabilidade intestinal e conseqüentemente a nutrição animal (JAROLIN-JENSEN, 1998). Tais propriedades são atribuídas aos taninos (SHAHIDI & NACZK, 1989). A uva é uma das maiores fontes de compostos fenólicos da alimentação humana. Dentre os polifenóis presentes na uva estão os flavonóides (antocianinas, flavanóis e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) e uma larga variedade de taninos (FRANCIS, 2000).

Um exemplo das propriedades antinutricionais dos polifenóis é sua interação com as lipases pancreáticas. A reação se dá pela formação de pontes

de hidrogênio ou ligações hidrofóbicas entre os anéis fenólicos e a cadeia aromática das enzimas (SOSOULSKI, 1979), diminuindo a ação da enzima e comprometendo a biodisponibilidade dos lipídios.

O aumento dos níveis séricos de vitamina E dos grupos tratados era esperado e comprovam a eficácia da suplementação alimentar com a vitamina. Enquanto o consumo de α -tocoferol pelos grupos suplementados foi dez vezes superior ao consumo dos grupos não suplementados o aumento nos níveis séricos foi apenas o dobro dos níveis observados nos grupos não suplementados com α -tocoferol. Tal fato pode ser explicado pela limitação quantitativa de proteínas de ligação de α -tocoferol, responsáveis pela incorporação do α -tocoferol as molecular da fração VLDL (KAYDEN & TRABER, 1993).

Nota-se que os grupos que receberam polifenóis da uva obtiveram resultado semelhante à suplementação com o acetato de α -tocoferol ou até mesmo superior quando eram ministrados os dois antioxidantes. Tal resultado pode ser devido à ação de recuperação do α -tocoferol exercida pelos polifenóis (ZHU *et al*, 2000). Contudo, os resultados encontrados nos níveis hepáticos de vitamina E sugerem que a presença de polifenóis na dieta poderia mobilizar as reservas hepáticas da vitamina.

A ingestão de extrato de uva não alterou os níveis séricos de polifenóis, contudo nota-se uma diminuição na excreção fecal desses polifenóis. Tais resultados podem ser devido à interação dos polifenóis com as enzimas entéricas impedindo a sua detecção pelo método analítico. Os níveis plasmáticos tendem a ser constantes, mesmo em suplementação quando os níveis de excreção urinária

de polifenóis parecem aumentar proporcionalmente ao aumento da ingestão (YOUNG *et al*, 1999).

Além da alteração no perfil e metabolismo lipídico, a maior propensão a aterogênese observada nos camundongos ApoE^{-/-} pode ser atribuída ao aumento do estresse oxidativo acarretando maior susceptibilidade a peroxidação lipídica nos vasos sanguíneos (HAYEK *et al*, 1994). Entre os lipídios, o colesterol e os ácidos graxos poliinsaturados são mais susceptíveis a ação deletéria dos radicais livres e à formação de hidroperóxidos. A reação se dá pela retirada de um átomo de hidrogênio do carbono alílico, inserção de oxigênio molecular e subsequente redução do radical peroxil em hidroperóxidos (ESTERBAUER *et al*, 1992).

Apesar de não apresentarem diferença estatística os indicadores de peroxidação do presente estudo mostraram tendência na redução desses índices no tratamento com ambos antioxidantes.

Os resultados foram semelhantes aos encontrados por Stoker & O'Halloran (2004) onde não observaram diferenças na peroxidação lipídica de camundongos ApoE^{-/-} tratados, por 24 semanas, com vinho tinto, sem álcool. Observaram ligeiro aumento na formação de peróxidos de hidrogênio, assim como no presente estudo, porém sem significância estatística. Kaplan *et al* (2001), observaram redução de 8% na peroxidação lipídica no plasma de camundongos Apo E^{-/-} alimentados com suco de romã, rico em polifenóis. Blackhurst & Marais (2006) em estudo com humanos eutróficos, não observaram alteração na peroxidação lipídica após a ingestão de vinho tinto, apesar de um aumento significativo nos níveis plasmáticos de polifenol.

O α -tocoferol é o antioxidante lipofílico mais abundante e ativo nas LDLs (ESTERBAUER *et al*, 1992) estando associado à inibição da peroxidação lipídica por neutralizarem o radical lipídico, formando um radical menos ativo denominado radical tocoferil (MUNTCANU *et al*, 2004). ZHAO *et al* (2005) observaram redução da peroxidação lipídica em camundongos Apo E^{-/-}, alimentados com dieta suplementada com 2000UI de vitamina E/kg de dieta.

Os ácidos graxos parecem ter papel fundamental na aterogênese, contudo o conhecimento sobre o papel da modificação dos ácidos graxos na patogênese da aterosclerose ainda é limitado. A mudança de ácidos graxos pode modificar as propriedades das membranas celulares e conseqüentemente alterar sua participação no metabolismo lipídico (KUMMEROW, 1993).

Os perfis de ácidos graxos hepáticos não foram influenciados pelos tratamentos, contudo nota-se que apesar de não significativa, houve uma maior preservação dos ácidos graxos poliinsaturados dos grupos que receberam polifenóis. Tal resultado pode ser uma expressão da solubilidade dos antioxidantes estudados. Compostos fenólicos hidrofílicos seqüestradores de radicais livres, como os polifenóis, seriam antioxidantes mais efetivos do que os hidrofóbicos como a vitamina E em sistemas onde há interface óleo-água, como a encontrada do tecido hepático (PORTER, 1993).

Camundongos ApoE^{-/-} apresentam estrias gordurosas com 10 semanas de idade. As lesões avançadas aparecem a partir da vigésima semana de idade. A dieta aterogênica acelerou esse processo contribuindo para a complexidade e o tamanho das lesões (MEIR & LEITERSDORF, 2004).

O tratamento com antioxidantes não foi capaz de alterar o tamanho da lesão, contudo houve alteração no grau de evolução da lesão aterosclerótica, resultado semelhante ao encontrado por Nakata & Maeda (2002), onde os pesquisadores estudaram a suplementação alimentar com vitamina C em camundongos Apo E^{-/-}. No mesmo modelo animal, Peluzio *et al* (2002) observaram redução significativa do tamanho de lesão e menor grau no desenvolvimento das mesmas, após uma suplementação alimentar com 400 UI/Kg de dieta. Zhao *et al* (2005) observaram a redução na progressão da aterosclerose com uma suplementação alimentar com 2000UI/Kg de dieta.

Em camundongos LDL^{-/-} recebendo 2000UI/Kg de dieta, após alimentação com dieta hiperlipídica por 12 semanas, apresentaram redução no tamanho da área de lesão aterosclerótica (CYRUS *et al*, 2003).

Os estudos com polifenóis revelam redução na progressão das placas ateroscleróticas. Fuhman *et al* (2000) observaram redução no grau de desenvolvimento da lesão aterosclerótica após o consumo de polifenóis do gengibre sem a pré-indução de placa ateromatosa. Aviran *et al* (2000) e Kaplan *et al* (2001) observaram redução no tamanho da lesão aterosclerótica após o consumo de suco de romã. A suplementação oral com vinho sem álcool (STOCKER & O'HALLORAN, 2004) e ácido caféico (HISIKAWA *et al*, 2005) também foram capazes de reduzir o desenvolvimento da lesão aterosclerótica.

6. Conclusão:

A ingestão de antioxidantes como os polifenóis, encontrados na uva, e o α -tocoferol teve efeito benéfico no desenvolvimento da aterosclerose, uma vez que ingestão dessas substâncias contribuiu para redução do grau de evolução da lesão aterosclerótica. Os tratamentos foram capazes de diminuir os níveis séricos e hepáticos de colesterol, e aumentar a excreção fecal de colesterol e triacilgliceróis. Contudo, apesar de serem antioxidantes, essas substâncias não contribuíram para alterar os teores de malondialdeído e hidroperóxidos lipídicos no organismo dos animais. No perfil de ácidos graxos os polifenóis apresentaram maior efeito protetor das insaturações dos ácidos graxos essenciais. As lesões ateroscleróticas desenvolvidas pelos animais submetidos à suplementação alimentar com α -tocoferol apresentaram menor grau de evolução, contudo o uso dessas substâncias não foi capaz de reduzir a maior era de lesão. Observou-se efeito sinérgico entre as duas substâncias utilizadas quando se observa os resultados obtidos na suplementação alimentar. Observa-se que o efeito dos polifenóis e do α -tocoferol vai além de sua ação antioxidante, atuando na peroxidação lipídica e na proteção de ácidos graxos, mas atuam no controle do colesterol. O consumo de ambos antioxidantes apresentou resultou em maior efeito na redução do desenvolvimento da aterosclerose que o consumo dos antioxidantes isoladamente.

7. Referências Bibliográficas:

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemistry. Official Methods of Analysis of A.O.A.C. 14 ed. Whashington: A.O.A.C. 1989.

Allain, J C S; Poon, L S; Chan, C S G; et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin Chem, 1974; 20: 470-475.

Aviran M, Dornfelt L, Rosenblat, et al. Pormegranate juice consupmption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and plaquet aggregation: studies in human and in atherosclerotic apolipoprotein E- deficient mice. Am J Clin Nutr. 2000; 71: 1062-1076.

Batolouni M. Hipótese oxidative da aterosclerose e emprego dos antioxidants na doença arterial coronariana. Arq Bras Cardiol 1997; 68: 55-61.

Blackhurst DM, Marais AD. Concomitant consumption of red wine and polyunsaturated fatty acids in edible oil does not influence the peroxidation status of chylomicron lipids despite increasing plasma catechin concentration. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases. 2006 In Press.

Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. Clin Chem. 1973;19:476-82.

Carvalho DG. Função Hepática. In: Vieira EC, Figueiredo EA, Alvarez-Leite JI, Gómez MV. Química Fisiológica. 2ed. Belo Horizonte: Atheneu. 1995. 209-242p.

Cook NC, Sammans S. Flavonoids- Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. J Nutr Biochem 1996; 7: 66-76.

Cyrus T, Yao Y, Rokasch J, et al. Vitamin E reduces progression of atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor mice with established vascular lesions. Circulation 2003; 107:521-523.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, et al. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Radic Biol Med. 1992; 13:341-390.

Folch, J.; Lees, M.; Slaon-Stanley, G.N. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 1957; 226:497-509.

Francis F.J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. Cereal Foods World,. 2000; 45: 208-213.

Fuhrman B, Rosenblat M, Hayek T, et al. Ginger extract consumption reduces plasma cholesterol, LDL oxidation and attenuates development of atherosclerosis in atherogenic, apolipoprotein E-deficient mice. J Nutr. 2000; 130:1124-1131.

Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in physiological systems. Trends Biochem. Sci. 1990; 15: 129-135.

Hartman L, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Lab. Pract., London, 22:475-7, 494, 1973.

Hayek T, Oikarine J, Brook JG, Aviram M. Increased plasma and lipoprotein peroxidation in Apo-E deficient mice. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1994;3:1567-1574.

Hertog MGL, Feskens EJM, Hollan PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly Study. Lancet. 1993;342:1007-1011.

Hishikawa K, Nakaki T, Fujita T. Oral flavonoids supplementation attenuates atherosclerosis development in apolipoprotein E-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25:442-446.

Jachec W, Tomasik A, Cegalarek W, et al. lipid peroxidation and vitamin E in human coronary atherosclerosis lesions. Clinica Chimica Acta. 2003;330:121-129.

Jarolin-Jensen E, Gajdzik L, Haberl I, Kraft D, SCHEINER O, GRAF J. Hot spices influence permeability of human intestinal epithelial monolayers. *J Nutr.* 1998; 128:557-581.

Kaliora AC, Dedoussis GVZ, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2005; In Press.

Kaplan M, Hatek T, Raz A, et al. Pomegranate juice supplementation to atherogenic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *J Nutr.* 2001; 131:2082-2089.

Kayden HJ, Traber MG. Absorption, lipoprotein transport and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J Lipid Res.* 1993; 34:343-358.

Koga T, Kwan P, Zubick L, et al. Vitamin E supplementation suppress macrophage accumulation and endothelial cell expression of adhesion molecules in aorta of hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis.* 2004; 176:265-272.

Kummerow FA. Modification of cell membrane composition by dietary lipids and its implications for atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;414:29-43.

Lees DH, Francis FJ. Standardization of pigment analyses in cranberries. *HortScience.* 1972; 7:83-84.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000; 407:233-241.

Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the Apolipoprotein E –deficient mouse a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:1006-1014.

Michell RN. Hemodynamic disorders, thromboembolic disease and shock. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N (Editors). *Robins and Contran. Pathology basic of disease.* 7ed. China: Elsevier Saunders Company. 2005. p119-144.

Muntcanu, A; Zingg, J-M; Azzi, A. Anti-atherogenic effects of vitamin E- myth or reality? *J Cell Mol Med*, 2004; 8(1): 59-76.

Nakata Y, Maeda N. Vulnerable plaque morphology in apolipoprotein E-deficient mouse unable to make ascorbic Acid. *Circulation.* 2002; 105:1485-1490.

Nouzooz-Zadeh, J.; Tajaddini-Sarmadi, J.; Wolff, S.P. Measurement of Plasma Hydroperoxide Concentrations by the Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Assay in Conjunction with Thiophenylphosphine. *Analytical Biochemistry.* 1994; 220: 403-409.

Pal S, Ho N, Santos C, et al. Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of Apo B100 from human HepG2 cells. *J Nutr.* 2003a; 133:700-706.

Pal S, Thonson AM, Bottema CD, et al. α -tocopherol modulates the low density receptor for human HepG2 cells. J Nutr. 2003b; 2.

Peluzio MCG, Homem APP, César GC, et al. Influences of α -tocopherol on cholesterol metabolism and fatty streak development in apolipoprotein E-deficient mice fed an atherogenic diet. Brazil J Med Biolog Res, 2001; 34: 1539-1545.

Porter WL. Paradoxal behavior of antioxidants in food and biological systems. In: Willian GM. Antioxidants: chemical, physiological, nutricional and toxicological aspects. Princeton: Princeton Scientific, 1993. p.93-122.

Shahidi F, Naczk M. Effect of processing on the content of condensed tannins in rapesses meals: a research note. J Food Sci. 1989; 54:1082.

Sies H. What is oxidative stress? In: Keaney JF Jr. Oxidative stress and vascular disease. Boston:Kluwer Academic , 2000.

Singleton V, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1965; 146: 144-156.

Sosoulski FW. Organoleptic and nutricional effect os fenolic compounds on oliseed protein products: a review. J Am Oil Chem Soc. 1979; 56:711.

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Circulation*. 1995; 92: 1355–1374

Strocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004; 84:1384-1478.

Strocker R, O'halloran RA. Dealcoholized red wine decreases atherosclerosis in apolipoprotein E gene-deficient mice independent of inhibition of lipid peroxidation in artery wall. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:123-130.

Teissedre PL, Landrault N. Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability. *Food Research International*. 2000;33:461-467.

Ueda T, Igarashi O. Determination of vitamin E in biological specimens and foods by HPLC- Pretreatment of samples and extraction of tocopherols. *J of Micronutrient Analysis*. 1990; 7: 79-96.

US National Academy of Sciences (USA). Dietary Reference Intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Washington DC : National Academy Press, 2000, 506p. (A report on the antioxidants and related compounds. Subcommittees on Upper Reference Intake Levels of Nutrients and Interpretation

of Uses of Dietary Reference Intakes and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Food and Nutrition Board).

Vidal R, Hernadez-Vallejo S, Pauquai T, *et al.* Apple procyanidins decrease cholesterol esteryfication na lipoprotein secretion in Caco2/TC7 enterocyts. Journal of lipid Research. 2005; 46: 258-268.

Vison JA, Teufel K, Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in hamster model. Atherosclerosis 2001; 156:67-72.

Yang TT, Koo MV. Inhibitory effect of Chinese green tea on endothelial cell-induced LDL oxidation. Atherosclerosis 2000; 148: 411-423.

Young JF, Nielsen SE, Haraldsdóttir J, *et al.* Effect of juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidant status. The American Journal of Clinical Nutrition. 1999; 69:87-94.

Zhao, L; Praticò D; Rader, D J.; Funk, CD. 12/15-Lipoxygenase gene disruption and vitamin E administration diminish atherosclerosis and oxidative stress in apolipoprotein E deficient mice through a final common pathway. Prostaglandins & other Lipid Mediators 2005; 78:185-193.

Zhu QY, Huang Y, Chen ZY. Interaction between flavonoids and α -tocopherol in human density lipoprotein. J Nutr Biochem.