

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE
MESQUITA FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS
AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

**MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DO ARCO AÓRTICO
DE COELHOS COM ATEROMA INDUZIDO E TRATADOS
COM RESVERATROL, COMO MODELO
EXPERIMENTAL NA PREVENÇÃO DA
ATEROSCLEROSE. I. PERFIL LIPÍDICO SÉRICO**

Marines De Castro

Orientadora: Profa. Dra. Maria Rita Pacheco

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2008

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARINES DE CASTRO – Nascida em Faxinal dos Guedes, SC, aos 24 de maio de 1979. Filha de Zonir Cezário de Castro e Geni dos Santos de Castro. Concluiu os cursos de primário e ginásio no colégio Estadual Professor Salustiano Antônio Cabreira em Faxinal dos Guedes e o ensino médio no colégio Estadual Presidente Artur da Costa e Silva em Xanxerê/SC. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Paranaense, Campus de Umuarama/PR em dezembro de 2001. Especializou-se em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais pela Faculdade SPEI em Florianópolis/SC em março de 2003. Iniciou o curso de mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal em março de 2006.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado iluminação, proteção e por ter permitido a realização deste trabalho.

Aos meus pais Zonir e Geni de Castro pelo amor, apoio, entendimento, ajuda, e pela dedicação sempre, em cada momento e em todas as dificuldades que passei para a obtenção deste título.

À Professora Dra. Maria Rita Pacheco, pela orientação, pelo apoio, pelos ensinamentos passados e pela paciência nestes dois anos que trabalhamos juntas.

Ao meu irmão Victor, pelos conselhos nas horas de dificuldade.

A Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal do Nível superior CAPES, pela bolsa concedida.

A todos os Professores que me auxiliaram na realização deste trabalho em especial para aqueles do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal.

À Professora Dra. Márcia Machado pela ajuda e disponibilidade.

Às minhas amigas Sandra Pinheiro, Daniela Pereira, Karla Jimenez, Cristina de Souza, Patrícia Neves e Fabíola Sangiorgio pela ajuda, compreensão, paciência e sobretudo pela amizade.

A todos os funcionários da Pós-graduação pela dedicação e pela ajuda dispensada.

A todos os funcionários da FCAV/UNESP que, de forma direta ou indiretamente, contribuíram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Resveratrol.....	2
2.2 Formação de radicais livres.....	3
2.3 Metabolismo das Lipoproteínas.....	4
2.4 Aterosclerose.....	6
2.4.1 Aspectos histológicos normais das artérias.....	7
2.4.2 Elementos do processo aterogênico.....	9
2.4.2.1 Endotélio.....	9
2.4.2.2 Células musculares lisas.....	10
2.4.2.3 Túnica adventícia.....	11
2.4.2.4 Papel dos monócitos/macrófagos.....	11
2.4.3 Etiopatogenia da aterosclerose.....	11
2.4.4 Hipótese oxidativa da aterosclerose.....	13
2.4.5 Fatores de risco associados à aterosclerose.....	15
2.5 Antioxidantes e aterosclerose.....	16
3 OBJETIVOS.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Animais, alimentação e instalações.....	18
4.2 Colheita de sangue.....	18
4.3 Colheita de amostras para análise histológica.....	19
4.4 Análise estatística.....	20
5 RESULTADOS.....	21
5.1 Morfológicos.....	21
5.2 Morfométricos.....	26
5.3 Perfil lipídico sérico.....	28
6 DISCUSSÃO.....	31
7 CONCLUSÕES.....	37
8 REFERÊNCIAS.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

- Apo: Apolipoproteínas ou Apoproteínas
- BFGF: Fator de Crescimento dos Fibroblastos Básico
- CETP: “Cholesterol Ester Transfer Protein”
- CML: Células Musculares Lisas
- ET: Endotelina
- GM-CSF: Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
- GSH: Glutathiona
- H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
- HDL: Lipoproteínas de alta densidade
- ICAM: Moléculas de Adesão Intercelular
- IDL: Lipoproteínas de densidade intermediária
- IL: Interleucina
- INF- γ : Interferon- γ
- LCAT: Enzima Lecitina-Colesterol-Acil-Transferase
- LDL: Lipoproteínas de baixa densidade
- LDLox: LDL Oxidada
- LLP: Enzima Lípase Lipoprotéica
- MCP-1: Proteína Quimiotática de Monócitos
- M-CSF: Proteínas Promotoras da Diferenciação/Proliferação de Monócitos em Macrófagos no Espaço Subendotelial
- MHC: Moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade
- NF- $\kappa\beta$: Fator Nuclear kappa β
- NO/EDRF: Óxido Nítrico/fator de Relaxamento Derivado do Endotélio
- NO₂: Dióxido nítrico
- O₂⁻: Superóxido
- OH: Radical hidroxila
- ON: Óxido nítrico
- ONOO⁻: Peroxinitrito
- PDGF: “Platelet-Derived Growth Factor”
- QM: Quilomícrons

ROI: Intermediários reativos de oxigênio

R-Qm: Remanescentes de Quilomícrons

R-VLDL: Remanescentes de VLDL

SOD: Superóxido Dismutase

TG: Triglicerídeos

TGF- β : Fator de Crescimento de Transformação β

TNF- α : fator alfa de necrose tumoral

VCAM-1: Molécula de Adesão Vascular 1

VLDL: Lipoproteínas de densidade muito baixa

LISTA DE FIGURAS

Página

1 Mecanismos celulares e moleculares que dão origem ao início e progressão da aterosclerose.....	15
2 Segmento do arco aórtico representado esquematicamente (*) e em detalhes (seta) na fotografia, colhido para realização das análises histológicas.....	20
3 Fotomicrografia do segmento do arco aórtico de coelho da raça Nova Zelândia Branco, do grupo CT, R, CL e CR representados pelas letras A, B, C e D respectivamente. Observa-se a túnica íntima (→), a média (→) e a adventícia (→) Coloração: Tricrômico de Masson.....	23
4 Fotomicrografia do segmento do arco aórtico de coelho da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos CT, R, CL e CR, representados pelas letras A, B, C e D respectivamente, evidenciando na túnica íntima dos grupos CT e R o endotélio (E), o subendotélio (SE) e a membrana limitante elástica interna (EI), nos grupos CL e CR além destas estruturas observa-se macrófagos espumosos (ME) e gotículas lipídicas (GL). Na média dos grupos CT e R as fibras musculares lisas (ML) entremeadas às fibras elásticas (FE), no início da média dos grupos CL e CR a invasão por macrófagos espumosos seguida por fibras musculares lisas (ME) entremeadas às fibras elásticas. Coloração: Tricrômico de Masson.....	24
5 Fotomicrografia do segmento do arco aórtico de coelho da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos CT, R, CL e CR, representados pelas letras A, B, C e D respectivamente, evidenciando na túnica média as fibras musculares lisas (ML), entremeadas às fibras elásticas (FE) e a túnica adventícia com fibras colágenas (FC), fascículo de nervo (N), vasos linfáticos (VL), vasa	

<i>vasorum</i> (VV) e mesotélio (M) revestindo esta túnica. Coloração: Tricrômico de Masson.....	25
6 Valores médios \pm desvios padrão da espessura em μm da túnica Íntima do segmento do arco aórtico de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR). Letras diferentes denotam significância ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.....	26
7 Valores médios \pm desvios padrão da espessura em μm da túnica Média do segmento do arco aórtico de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR). Letras diferentes denotam significância ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.....	27
8 Valores médios \pm desvios padrão da espessura em μm da túnica Adventícia do segmento do arco aórtico de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR). Letras diferentes denotam significância ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.....	27
9 Valores médios \pm desvios padrão da espessura em μm da parede (íntima + média + adventícia) do segmento do arco aórtico de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR). Letras diferentes denotam significância ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.....	28
10 Valores médios \pm desvios padrão dos níveis séricos de HDL mg/dl de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR).....	29
11 Valores médios \pm desvios padrão dos níveis séricos de Triglicérides em mg/dl de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT),	

resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR).....29

12 Valores médios \pm desvios padrão dos níveis séricos de Colesterol Total em mg/dl de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR).....30

13 Valores médios \pm desvios padrão dos níveis séricos de LDL em mg/dl de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR).....30

**MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DO ARCO AÓRTICO DE COELHOS COM
ATEROMA INDUZIDO E TRATADOS COM RESVERATROL, COMO
MODELO EXPERIMENTAL NA PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE. I.
PERFIL LIPÍDICO SÉRICO**

RESUMO - Aterosclerose é um condição inflamatória fibro-proliferativa crônica associada à produção de espécies oxidantes. O composto fenólico resveratrol encontrado principalmente na uva e no vinho tinto, parece ter atividades cardioprotetoras prevenindo a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade. Neste estudo investigou-se o efeito do resveratrol na prevenção da ateromatose induzida por meio de estudos morfológicos e morfométricos do arco aórtico, bem como observação do perfil bioquímico sérico de HDL, LDL, triglicérides e colesterol total. Para tanto, foram utilizados 20 coelhos divididos em quatro grupos os quais receberam as seguintes dietas durante 60 dias: grupo controle (CT) ração normal; grupo resveratrol (R) ração normal e resveratrol na dose de 3 mg/Kg/dia; grupo colesterol (CL) ração acrescida de 1,5% de colesterol; grupo (CR) tratado com ração acrescida de 1,5% de colesterol e administração simultânea de resveratrol na dose de 3mg/Kg/dia. Na análise morfológica os animais do grupo CT e R não apresentaram alterações nas túnicas íntima, média e adventícia. Os animais do grupo CL apresentaram lesões ateroscleróticas com espessamento da íntima e invasão da média. Os animais do grupo CR também apresentaram lesões invadindo a íntima e média porém estas encontravam-se mais organizadas. O estudo morfométrico revelou maior espessamento da íntima no grupo CL, na camada média não foi observado diferença entre os grupos CL e CR. A avaliação do perfil lipídico dos animais dos grupos CL e CR revelou valores aumentados porém sem diferença entre estes grupos. Houve diferença quando comparados com os grupos que receberam uma dieta normal. Em conclusão este estudo segere que o resveratrol atua como agente preventivo no desenvolvimento da lesão aterosclerótica porém não altera o perfil lipoproteico.

Palavras-chave: arco aórtico, aterosclerose, coelho, morfologia, morfometria, resveratrol

**MORPHOLOGY AND MORPHOMETRY OF THE RABBITS AORTIC ARCH
WITH ATHEROMA LESIONS INDUCED TREATED WITH RESVERATROL.
AN EXPERIMENTAL MODEL TO ATHEROSCLEROSIS PREVENTION. I.
SERUM LIPID LEVELS**

SUMMARY: Atherosclerosis is a chronic fibro proliferative inflammatory disease associate to the production of reactive oxygen species. Resveratrol, a phenolic compound present in red wine and grape seems to prevent cardiovascular diseases by protecting low density lipoprotein from oxidation. The present study tested wheter resveratrol would provide any benefit in the prevention of induced atheroma lesions through morphologic, morphometric studies in the aortic arch and HDL, LDL, total cholesterol and triglyceride lipid levels. A total of 20 rabbits were divided into 4 groups during 60 days: group CT was given normal diet, group R normal diet with resveratrol at a dose of 3 mg/Kg/day, group CL normal diet supplemented with 1,5% cholesterol, group CR normal diet supplemented with 1,5% cholesterol with resveratrol at a dose of 3 mg/Kg/day. Morphologic analysis of the rabbit group CT and R didn't show lesion in intima, media and adventitia tunicas in the aortic arch. Rabbits fed with a hypercholesterolemic diet show atherosclerotic lesions with thickness of intima and invasion of the media. Severity of atherosclerosis lesions was significantly reduced in group CR and lesions were more organized, and media was also affected. Morphometry study revealed that the intima of aortic arch in CL animals was thickner than CR animals. The media didn't show difference between CL and CR groups. Lipid measurements of hypercholesterolemic rabbits showed a significant increase in serum levels but there weren't differences between CL and CR group, there were differences when compared to those fed a regular diet. To conclude, this study suggests that resveratrol could exet cardioprotective effect on the atherosclerotic lesions development without affecting serum lipid levels.

Key words: aortic arch, atherosclerosis, morphology, morphometry, rabbit, resveratrol

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares atualmente, são as principais causas de morbidade e mortalidade, sendo o problema de saúde mais importante entre a população adulta em países desenvolvidos. Existe uma grande variação em sua incidência e taxas de mortalidade, sendo a área do Mediterrâneo, a que apresenta taxas mais baixa do mundo. A Organização Mundial de Saúde prevê que a prosperidade econômica global possa levar ao alastramento do problema aos países em desenvolvimento, nos caso destes adquirirem os hábitos ocidentais (PEREZ et al., 1998).

A aterosclerose é a condição patológica que antecede a maior parte dos episódios cardiovasculares, nomeados infartos do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais (COTRAN & SCHOEN, 2000). O tratamento profilático da aterosclerose ainda é ineficaz devido à incompleta compreensão do fenômeno aterogênico, o que ressalta a importância do estudo fisiopatológico da lesão ateromatosa.

Resveratrol é um antioxidante utilizado amplamente na dieta do Mediterrâneo que tem atraído considerável atenção como agente terapêutico. Observa-se mediante algumas evidências *in-vitro* e *in-vivo*, intervenções controladas e estudos em modelos animais demonstraram que o consumo de antioxidantes previne a progressão da aterosclerose.

Este estudo visou avaliar a efeito do resveratrol como agente terapêutico na prevenção das lesões ateroscleróticas induzidas em coelhos, modelo experimental para o desenvolvimento da aterosclerose em razão da sua capacidade em desenvolver rapidamente colesterolemia quando alimentados com dieta hipercolesterolêmica (THRALL, 2007), por meio de estudos morfológicos e morfométricos, das túnicas íntima, média e adventícia na região do arco aórtico (*post-mortem*), bem como observar o perfil bioquímico sérico de lipoproteínas, (*in-vivo*), durante o período experimental. Desta forma os resultados qualitativos e quantitativos desta pesquisa poderão ser úteis não somente para a Medicina Humana como também para a Medicina Veterinária, já que algumas raças de cães e gatos são susceptíveis à hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia primária podendo conseqüentemente desenvolver a aterosclerose

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Resveratrol

A grande procura da humanidade por meios que favoreçam uma vida saudável tem impulsionado as pesquisas por novas substâncias capazes de satisfazer tais necessidades. Um importante composto polifenólico é o resveratrol, primeiramente isolado de raízes da planta *Polygonum cuspidatum* (Kojo-kon) utilizada amplamente na medicina popular no oriente, sua ocorrência também é vista em algumas árvores incluindo o eucalipto, em algumas flores como o *Veratrum grandiflorum* e *Veratrum formosanum*, em amendoins, amoras e também está presente em uvas (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*) (PERVAIZ, 2003). O resveratrol (3, 4, 5 trihidroxiestilbeno) é uma fitoalexina de ocorrência natural na uva, sintetizado na casca como resposta ao estresse causado por ataque fúngico (*Botrytis cinerea*, *Plasmopora viticola*), dano mecânico ou por irradiação de luz ultravioleta sob duas formas isômeras: trans-resveratrol (trans-3, 4', 5 trihidroxiestilbeno) e cis-resveratrol (3, 4', 5 trihidroxiestilbeno). O isômero trans-resveratrol é convertido para cis-resveratrol em presença da luz visível (SAUTTER et al., 2005). A síntese do resveratrol é alta antes da planta atingir a maturidade, altas quantidades também podem ser observadas em áreas saudáveis ao redor de áreas infectadas pelo fungo, limitando assim seu desenvolvimento. O processo de síntese de resveratrol tanto pela exposição à luz solar como pelo ataque fúngico é dado graças à ação de uma enzima terminal na biossíntese do resveratrol a estilbeno sintetase (PERVAIZ, 2003).

A estrutura química do resveratrol tem similaridade com o estrógeno sintético dietilestilbestrol, dois anéis fenólicos estão ligados por uma dupla ponte estireno para gerar o 3, 4', 5 trihidroxiestilbeno. O trans- resveratrol é comercialmente disponível e é relativamente estável se for protegido de pH alto e luz (SOLEAS et al.,1997).

O glucosídeo de resveratrol pode ser absorvido pelo intestino delgado, assim como os glucosídeos de flavonóides os são (FREMONT, 2000). Em humanos após a sua absorção o resveratrol é metabolizado por enzimas no fígado, possui meia-vida plasmática de 8-14 minutos. A excreção é feita pela urina (WALLE et al.,2004).

Em numerosos estudos existentes vêm sendo utilizando uma ampla variação de doses do resveratrol, onde é sugerido que o seu efeito biológico pode variar dependendo do tipo de célula e do tipo de tecido (ATHAR et al., 2007).

Estudos epidemiológicos sobre a dieta do Mediterrâneo sugerem que o moderado consumo de vinho é benéfico para doenças cardíacas e alguns tipos de câncer. O uso medicinal do vinho pelo homem tem sido uma prática que data mais de 2.000 anos. Importantes civilizações do mundo ocidental como os egípcios, os gregos e os romanos, e do mundo oriental como os hindus, fizeram uso do vinho tinto como um remédio para o corpo e para a alma. Médicos eminentes da antiguidade como Hipócrates, Galeno e Celsius exaltavam as propriedades medicinais do vinho e adiantaram uma interpretação razoavelmente correta dos seus mecanismos de ação (JOHNSON, 1989).

Dos componentes derivados do vinho, um grupo de maior interesse são os polifenóis, compostos presentes na natureza, cuja estrutura química os torna potentes antioxidantes, pois doam hidrogênio ou elétrons e captam radicais livres, impedindo o processo oxidativo (SAN JUAN, 2002). Como composto fenólico, o resveratrol contribui com potencial antioxidante e desenvolve um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares em humanos.

2.2 Formação de radicais livres

Mesmo em situações normais, a produção de componentes para o fornecimento de energia para os processos bioquímicos, biofísicos e funções mecânicas do corpo está gerando intermediários reativos de oxigênio (ROI) como o superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) radical hidroxila (OH), também os óxidos de nitrogênio, óxido nítrico (ON) e dióxido nítrico (NO_2). O óxido nítrico tem especial importância por ser sintetizado nas células endoteliais possuindo funções de dilatação vascular. Quando o óxido nítrico reage com o superóxido produz o peroxinitrito ($ONOO^-$) com um grande poder antioxidante. Os metais de transição quando possuem um ou mais elétrons não pareados são definidos como radicais livres. O excessivo acúmulo de (ROI) é controlado pelas defesas antioxidantes endógenos (enzimas antioxidantes, glutathiona (GSH), superóxido dismutase (SOD),

catalase, albumina, transferrina, ceruloplasmina, haptaglobulina, hemopexina, ácido úrico, bilirrubina, albumina) e exógeno através da dieta vitamina E e C, carotenóides, selênio e os compostos fenólicos (HALIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Uma incapacidade celular em conter a produção ou mesmo remoção destes ROI resulta em um acúmulo anormal, o chamado estresse oxidativo. A exposição de macromoléculas como lipídeos; principalmente lipoproteínas de baixa densidade (LDL), proteínas e ácidos nucleicos aos ROI resultam em modificações oxidativas com potenciais deletéricos (HALIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A produção de radicais livres aumenta frente às agressões como infecções, exercício físico extremo, dietas desequilibradas, contaminantes ambientais entre outros (CROSS et al., 1987).

Os radicais livres são capazes de causar: perturbações em funções de membrana (permeabilidade, enzimas e receptores), modificação de lipoproteínas de baixa densidade, modificações na função de macrófagos, modulação da resposta imune e a expressão gênica (KINSELLA et al., 1993).

Os compostos fenólicos estabilizam os radicais livres ao ceder um hidrogênio de seu grupo hidroxila, formando-se uma ponte de hidrogênio. O grau de atividade dos compostos fenólicos e de outros antioxidantes está relacionado com o número de grupos hidroxila que possuem em sua molécula (RICE-EVANS et al., 1996).

2.3 Metabolismo das lipoproteínas

Os lipídeos por serem parcialmente insolúveis no meio aquoso, são transportados no organismo sob a forma de partículas denominadas lipoproteínas, que são formadas por uma capa hidrofílica constituída por fosfolipídeos, colesterol livre e proteínas, envolvendo um núcleo hidrofóbico que contém triglicerídeos e colesterol esterificado. As proteínas são denominadas apolipoproteínas ou apoproteínas (apo). Estas, além de sua função estrutural, interagem como receptores de membrana celular e/ou atuam como co-fatores enzimáticos (SOUZA et al., 1996)

As fontes de lipídeos no organismo são a síntese interna (endógena) ou exógena (alimentação).

O Ciclo exógeno tem início com a absorção do material lipídico proveniente da alimentação e sua incorporação nos quilomícrons (Qm) sintetizados pelas células intestinais. Caracterizam-se por transportar o colesterol da dieta e ser ricos em triglicerídeos (TG), tendo como apolipoproteína fundamental a B-48. Os Qm entram na circulação linfática e ganham a corrente sanguínea pelo ducto torácico, podendo receber diferentes apos (A, C e E) de outras lipoproteínas. Nos capilares, os Qm entram em contato com a enzima lipase lipoprotéica (LLP) que, ativada pela apo C-II, hidrolisa os TG, retira os ácidos graxos e torna-os partículas de menor tamanho (remanescentes de quilomícrons: R-Qm). Os R-Qm são removidos da circulação pelos receptores localizados nas células hepáticas, sendo então metabolizados. A enzima LLP é, particularmente, ativa no endotélio capilar. (SOUZA et al., 1996; GUYTON & HALL, 2002).

O Ciclo endógeno tem início com a síntese hepática das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), as quais contêm principalmente TG e as apos B-100, E e C. Na circulação capilar, as VLDL entram em contato com a LLP, dando origem ao remanescentes de VLDL (R-VLDL) ou lipoproteínas de densidade intermediária (IDL). Estas partículas seguem dois caminhos: cerca de dois terços das IDL podem ser captados no fígado, pelos receptores de apo B/E e degradados em seus componentes. O terço restante sofre ação da lipase hepática, principalmente no fígado, formando as LDL. Tanto as LDL como as IDL são retiradas da circulação pelos receptores celulares B/E, existentes principalmente no fígado. Vale salientar que as LDL são as principais carreadoras de colesterol para os tecidos periféricos em humanos, em cães e gatos a maior parte do colesterol é transportado pelas lipoproteínas de alta densidade (HDL), motivo este que faz com que a hiperlipidemia seja uma situação pouco freqüente nestas espécies. Uma vez no interior das células, as LDL são fragmentadas, liberando colesterol e aminoácidos (SOUZA et al. 1996; ZICKER et al., 2000; GUYTON & HALL, 2002).

Parte do material liberado pela ação da LLP sobre os Qm e as VLDL é utilizado na formação de outra lipoproteína: HDL. As partículas de HDL (sintetizadas no intestino e no fígado) têm como componentes principais a apo A-I (adquirida principalmente no fígado) e os fosfolípidos. As HDL têm grande importância no transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado (transporte reverso de

colesterol). As HDL captam colesterol não esterificado dos tecidos periféricos pela ação da enzima lecitina-colesterol-acil-transferase (LCAT), as HDL então levam o colesterol para o fígado por duas vias: diretamente e transferindo os ésteres de colesterol para outras lipoproteínas (principalmente as VLDL), pela ação de uma proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP). O cão não apresenta esta proteína explicando assim o motivo pelo qual o colesterol permanece ligado a lipoproteína HDL. Provavelmente nesta espécie, o transporte reverso de colesterol é efetuado por um receptor hepático para HDL. Uma vez no fígado, o colesterol proveniente dos tecidos pode ser reaproveitado, participando de outras vias metabólicas, ou excretado na bile, principal via de eliminação, com reabsorção de cerca de dois terços do mesmo, ciclo êntero-hepático (SOUZA et al., 1996; ZICKER et al., 2000; GUYTON & HALL, 2002).

2.4 Aterosclerose

A aterosclerose caracteriza-se por lesões na túnica íntima, denominadas ateromas ou placas fibrogordurosas, que fazem protrusão na luz, enfraquecem a túnica média subjacente levando a uma série de complicações (DUQUE, 1998).

Em humanos, as artérias sofrem mudanças progressivas e graduais do nascimento até a morte, e é difícil estabelecer onde os processos normais do envelhecimento terminam e onde os processos patológicos iniciam, pois cada artéria exibe seu próprio padrão de envelhecimento. Acredita-se que o espessamento uniforme da íntima é um fenômeno normal do envelhecimento (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

As placas ateroscleróticas possuem três componentes principais: (1) células, incluindo células musculares lisas, macrófagos e outros leucócitos; (2) matriz extracelular do tecido conjuntivo, incluindo colágeno, fibras elásticas e proteoglicanas e (3) depósitos lipídicos intracelulares e extracelulares. Os ateromas típicos contêm uma quantidade relativamente abundante de lipídios. Entretanto, muitas das denominadas placas fibrosas são compostas principalmente de células musculares lisas e tecido fibroso (COTRAN & SCHOEN, 2000).

STARY et al. (1994) classificam histologicamente as lesões ateroscleróticas indicando a seqüência da progressão de I a VI. A lesão tipo I (inicial), contém quantidades suficientes de LDL para provocar um aumento na quantidade de macrófagos. A lesão do tipo II contém camadas de macrófagos espumosos e células musculares lisas com lipídeos no seu interior, classificadas também como “estria gordurosa” . A lesão do tipo III é um estágio intermediário entre o tipo II e o IV e caracteriza-se pela quantidade de gotas lipídicas que causam ruptura das células musculares lisas da íntima. Estes lipídeos extracelulares são os precursores para a formação do “núcleo lipídico” maior que caracteriza a lesão tipo IV.

Os vasos mais intensamente afetados, em ordem decrescente são: aorta abdominal, artérias coronárias, artérias poplíteas, aorta torácica, carótidas interna e os vasos do polígono de Willis (COTRAN & SCHOEN, 2000).

O coelho foi a primeira espécie animal onde se realizou pesquisas sobre aterosclerose. Esta espécie assemelha-se em diversos aspectos ao metabolismo lipídico dos humanos e também desenvolve lesões ateroscleróticas avançadas, quando submetidos a dietas com altos níveis de colesterol, geralmente associadas a formação de lesões no arco aórtico e aorta torácica mais do que na aorta abdominal (MOGHADASIAN, 2002).

2.4.1 Aspectos histológicos normais das artérias

Todos os vasos sanguíneos acima de certo diâmetro têm várias características estruturais em comum e apresentam um plano geral de construção. Entretanto, o mesmo tipo de vaso apresenta variações estruturais notáveis ao longo de seu percurso. Desta maneira, a distinção entre os tipos diferentes de vasos nem sempre é muito clara, uma vez que a transição de um tipo de vaso para outro se faz de maneira gradual (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; JUNQUEIRA, 2005).

As artérias, como os demais vasos sanguíneos, são normalmente compostas de três camadas ou túnicas, a saber: túnica íntima, média e adventícia.

A túnica íntima apresenta uma camada de células endoteliais apoiada em uma camada de tecido conjuntivo frouxo, camada subendotelial, a qual pode conter, ocasionalmente, células musculares lisas. Em artérias, a túnica íntima está separada

da média por uma lâmina elástica interna, a qual é o componente mais externo da íntima. Esta lâmina composta principalmente de elastina, possui aberturas (fenestras) que permitem a difusão de substâncias para nutrir células situadas mais profundamente na parede do vaso. Como resultado da ausência de pressão sanguínea e da contração do vaso por ocasião da morte, a lâmina elástica interna das artérias geralmente apresenta um aspecto ondulado nos cortes histológicos. A túnica média é constituída principalmente por camadas concêntricas de células musculares lisas organizadas helicoidalmente. Interpostas entre as células musculares lisas existem quantidades variáveis de fibras e lamelas elásticas, fibras reticulares (colágeno do tipo III), proteoglicanas e glicoproteínas. As células musculares lisas são as responsáveis pela produção destas moléculas da matriz extracelular. Em artérias, a túnica média possui uma lâmina elástica externa mais delgada que separa esta da túnica adventícia. A túnica adventícia consiste principalmente em colágeno do tipo I e fibras elásticas. A túnica adventícia torna-se gradualmente contínua com o tecido conjuntivo do órgão pelo qual o vaso sanguíneo está passando. Nesta túnica também são encontrados capilares linfáticos, *vasa vasorum* (vasos dos vasos), e nervos, podendo estas estruturas penetrar até a porção mais externa da média (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; JUNQUEIRA, 2005).

A aorta origina-se no ventrículo esquerdo e ascende ao lado direito do tronco pulmonar craniodorsalmente, aorta ascendente, formando assim, o arco aórtico no qual o pericárdio se reflete. A aorta ascendente cranial para os mamíferos domésticos alcança em seu curso a coluna vertebral ao nível de 6^a vértebra torácica, prosseguindo como aorta descendente caudal. Na cavidade torácica, torna-se aorta torácica, e, na cavidade abdominal, é denominada aorta abdominal. Sua divisão final ocorre ao nível da última vértebra lombar (KÖNIG & LIEBICH, 2004). O coração, a porção inicial da aorta, tronco pulmonar e o segmento terminal da veia cava e veia pulmonar, são envoltos pelo pericárdio. O pericárdio é formado por três camadas: a pleura pericárdica, o pericárdio fibroso e a lâmina parietal do pericárdio seroso. A lâmina parietal é a lâmina mais interna do pericárdio, envolvendo assim os grandes vasos, sendo constituída por uma camada de tecido conectivo, fibras elásticas e mesotélio (NICKEL et al., 1981).

2.4.2 Elementos do processo aterogênico

2.4.2.1 Endotélio

O endotélio vascular desempenha um importante papel na patogênese da aterosclerose. A manutenção da integridade estrutural e funcional do endotélio envolve síntese e secreção de fatores vasodilatadores como o óxido nítrico, bradicinina, prostaciclina e fatores vasoconstritores como a endotelina (ET), tromboxano e angiotensina II (VANE et al., 1990; VOGEL, 1997).

O endotélio também expressa proteínas de membrana que atuam como moléculas de adesão para receptores específicos de monócitos e linfócitos T. Estas moléculas são chamadas de selectinas como a E e P e proteínas pertencentes à família das imunoglobulinas como molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) e as moléculas 1, 2 e 3 de adesão intercelular (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3). O endotélio ativado por agentes inflamatórios expressa maior quantidade de moléculas de adesão e substâncias quimiotraentes o que facilita a adesão e migração de monócitos (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2001; COLOMER, 2003).

A ativação endotelial é considerada como processo crítico na patogenia das doenças vasculares, visto que é induzida por estímulos que, reconhecidamente, contribuem para a lesão vascular, resultando em respostas que influenciam o início e evolução das lesões vasculares. Os indutores da ativação endotelial incluem citocinas e produtos bacterianos, que causam lesão inflamatória e choque séptico; estresses hemodinâmicos e produtos lipídicos como LDL oxidada e colesterol, críticos para a patogenia da aterosclerose; produtos terminais da glicosilação avançada (importantes no diabetes), bem como vírus, componentes do complemento e hipóxia. Por sua vez, as células endoteliais ativadas elaboram moléculas de adesão, outras citocinas e quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas vasoativas que resultam em vasoconstrição ou em vasodilatação, moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), pró-coagulantes e anticoagulantes, bem como uma variedade de outros produtos gênicos com atividade biológica. Uma via que parece mediar a expressão de muitos genes durante a ativação endotelial é o fator de transcrição, o fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$)

sistema $\kappa\beta$ de fatores transcricionais. Vários dos ativadores das células endoteliais possuem em comum a capacidade de provocar estresse oxidativo, que ativa a via NF- $\kappa\beta$ (COTRAN & SCHOEN, 2000).

2.4.2.2 Células musculares lisas

Como elemento celular predominante da média vascular, as células musculares lisas constituem um importante elemento não apenas no processo de reparo vascular normal, como também nos processos patológicos como a aterosclerose. A atividade migratória e proliferativa das células musculares lisas é fisiologicamente regulada por promotores e inibidores do crescimento. O endotélio intacto produz substâncias que inibem a proliferação das células musculares lisas (CML) sulfatos de heparan, óxido nítrico/fator de relaxamento derivado do endotélio (NO/EDRF), interferon- γ (IFN- γ), prostaglandina E2 e fator de crescimento de transformação β (TGF- β); e fatores que também inibem a agregação plaquetária (ON, prostaciclina) (DUQUE, 1998; SCHNEIDER et al., 1997; COTRAN & SCHOEN, 2000).

Os promotores do crescimento de CML incluem o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), bem como das células endoteliais e macrófagos, e o fator de crescimento dos fibroblastos básico (BFGF) e interleucina (IL) (COTRAN & SCHOEN, 2000).

De modo geral alguns estímulos básicos podem ser observados de modo a alterar o fenótipo das CMLs e contribuir para a hiperplasia da túnica íntima como: perda da túnica endotelial, estiramento mecânico da parede, agregação plaquetária no endotélio lesado e liberação de fatores de crescimento pelas plaquetas, atividade mitogênica da trombina formada em trombos locais e reação inflamatória. Com a injúria endotelial há suspensão das substâncias inibidoras de CML o que facilitaria a proliferação ativa destas células levando a formação da neoíntima (DUQUE, 1998).

As CML também sintetizam proteínas de matriz extracelular (colágeno, elastina e proteoglicanos) que são os principais componentes da capa fibrosa da lesão aterosclerótica (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2001; SCHNEIDER et al., 1997)

2.4.2.3 Túnica adventícia

Em lesões avançadas onde ocorre grande acúmulo de lipídeos na íntima levando a ruptura e deformação desta túnica, estes mesmos depósitos podem modificar a média e a adventícia subjacente (STARY et al., 1994)

2.4.2.4 Papel dos monócitos/ macrófagos

Devido ao tipo de resposta inflamatória fibro-proliferativa crônica do processo aterosclerótico, os monócitos e linfócitos T têm um papel chave tanto na gênese quanto na progressão da lesão . Os monócitos circulantes aderem ao endotélio e migram para a íntima. O aumento da união de monócitos ao endotélio parece ser devido a um aumento na expressão, por parte do endotélio ativado, de algumas das moléculas de adesão (citadas acima) que são induzidas por agentes proaterogênicos como as LDL oxidadas (LDLox) (KAWAMURA et al., 1994).

A ativação na íntima para transformação dos monócitos a macrófagos é estimulada pelas LDL modificadas, diferentes moléculas produzidas pelos linfócitos T, células endoteliais e CML. Os linfócitos T produzem INF- γ e fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) que ativam os monócitos e também o fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) que estabilizam os macrófagos e estimulam sua proliferação (ROSS, 1993).

Em lesões ateroscleróticas avançadas e crônicas o macrófago também apresenta papel ativo produzindo enzimas como as metaloproteases que degradam colágeno e proteoglicanos enfraquecendo a capa fibrosa da placa e contribuindo para sua desestabilização e ruptura (SHAH et al., 1995).

2.4.2 Etiopatogenia da aterosclerose

Atualmente a hipótese mais aceita refere-se à consideração da aterosclerose como o resultado de uma resposta inflamatória da parede desencadeada por diferentes formas de lesão.

A hiperlipidemia é reconhecida como importante fator de risco para a aterosclerose. A maioria das evidências implica especificamente na hipercolesterolemia. A hipertrigliceridemia desempenha um papel menos importante, porém seu efeito pode ser maior nas mulheres que nos homens. O principal componente do colesterol sérico total, associado a um risco aumentado de doenças cardiovasculares são as lipoproteínas de baixa densidade, LDL (COTRAN & SCHOEN, 2000).

A hipercolesterolemia causa um aumento na aderência de monócitos no endotélio em suínos, coelhos, macacos e pombos (STARY et al., 1994)

O acúmulo de LDL no espaço subendotelial parece ser um dos primeiros episódios associados ao desenvolvimento das lesões. As LDL retidas na parede sofrem processos de oxidação, LDLox, gerando produtos com atividade quimiotática para monócitos e CML. Os monócitos atravessam o endotélio e se diferenciam em macrófagos, estes últimos possuem a capacidade de capturar essas LDL modificadas em grandes quantidades e transformando-se em células espumosas. Essas LDL modificadas ou oxidadas são capturadas através dos receptores *scavenger* (depurador) na membrana do macrófago. O acúmulo de células espumosas na íntima leva a formação da estria gordurosa (BROWN & GOLDSTEIN, 1983).

As LDLs oxidadas também estimulam a secreção pelos mastócitos de IL-1, que é fator de crescimento para as células musculares lisas. Citocinas e outras substâncias produzidas pelas células endoteliais, CML e linfócitos T também são produzidos, o resultado da interação destes fatores é uma resposta fibroproliferativa que promove o desenvolvimento da estria gordurosa para a placa aterosclerótica completa (recoberta por tecido conjuntivo contendo macrófagos, CML, células espumosas e linfócitos). O progressivo aumento da lesão fibrocelular faz a placa abaular para a luz da artéria, porém, na ausência de complicações (ruptura, trombose) a superfície luminal permanece lisa, o perfil da luz muda pouco e são preservadas condições que garantem um fluxo sanguíneo estável. Com a continuidade da progressão da fibrose e calcificação distrófica, a placa aumenta de volume e provoca abaulamento para fora da artéria, abaixo da placa, com o que a

artéria se dilata mantendo a luz vascular eficiente mesmo na presença de placas intimais relativamente grandes (DUQUE, 1998; COTRAN & SCHOEN, 2000).

A complexa seqüência de eventos que levam à formação de uma placa interage de diferentes maneiras e duração conforme o grau de exposição aos fatores de risco e as características do ambiente microanatômico estrutural e hemodinâmico da artéria lesada. As ações de “remodelagem” que ocorrem na placa são específicas do paciente e do segmento arterial comprometido. Algumas placas ficam estáveis, outras progridem (e estenosam o vaso), outras sofrem complicações e outras até mesmo regridem. Em muitas situações são formadas novas placas sobre as placas já existentes. Como a maioria das trombo-oclusões arteriais que geram isquemias teciduais é derivada das complicações da placa ateromatosa, o estudo da estabilidade e instabilidade da placa é fundamental no diagnóstico, prognóstico e terapêutica da aterosclerose clínica (DUQUE, 1998).

2.4.4 Hipótese oxidativa da aterosclerose

A teoria oxidativa descreve que a LDL quando excessivamente oxidada promoveria a aterosclerose, pois a LDL nativa não é patogênica. Desde que foram descobertos lipídeos oxidados na estria gordurosa e experimentos com antioxidantes demonstraram reduzir a formação de lesões, foi visto que estes lipídeos desempenham um importante papel na aterogênese (CHEMELLO & GUERRA, 2003).

No plasma, a LDL encontra-se relativamente protegido da oxidação pelos antioxidantes plasmáticos como as vitaminas C e E, beta-caroteno e também dos antioxidantes contidos nas próprias partículas de lipoproteínas, como o alfa-tocoferol (vitamina E) (CHEMELLO & GUERRA, 2003).

O fluxo de moléculas de LDL nativas, normais, através do endotélio é estabelecido mediante um processo de transcitose que está mediado por receptor específico apo B100. As partículas de LDL são altamente susceptíveis a lesão oxidativa. A hipercolesterolemia favorece a penetração e a retenção das LDL na íntima por proteoglicanos e glucosaminoglicanos, o que favorece os processos de modificações proteolíticas e oxidativas. A ligação de monócitos às células endoteliais

é um evento que ocorre precocemente no desenvolvimento das placas ateroscleróticas e é potencializado por altas concentrações de LDL nativa como também pequenas quantidades de LDL-mm (PRITCHARD et al., 1991).

Primeiramente geram-se LDL chamadas de minimamente modificadas (LDLmm) que apresentam um grau de oxidação relativamente baixo, mas possuem capacidade de ativar o endotélio por estimular a produção de proteínas quimiotáticas de monócitos (MCP-1) e proteínas que promovem a diferenciação e proliferação de monócitos em macrófagos no espaço subendotelial (M-CSF) e também pela maior capacidade de induzir adesão de monócitos do que as LDL nativas. O monócito ativado libera uma enzima, a mieloperoxidase que também pode estar implicada na oxidação da LDL e proteínas. Presume-se que a peroxidação inicie pelos ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidos de superfície da LDL e se propague aos lípidios do núcleo (resultando em modificações oxidativas dos ácidos graxos poliinsaturados, do colesterol e dos fosfolípidos). Em etapa mais avançada, a peroxidação de lípidos atinge e degrada a fração protéica, apo B, da LDL. Estas modificações resultam em alterações conformacionais e alterações de carga elétrica, resultando numa proteína de carga negativa aumentada. O aumento na carga negativa da apo B faz com que as LDL não sejam mais reconhecidas pelos seus receptores normais passando a ser reconhecida pelo receptor *scavenger* dos macrófagos, levando à acumulação descontrolada de LDL por estas células e à conseqüente formação de células espumosas. Os “macrófagos ativados” também produzem maiores quantidades de espécies reativas de oxigênio levando a um maior estresse oxidativo (PARHAMI et al., 1993; COLOMÉ et al., 2000; DAUGHERTY et al., 1994; CHEMELLO & GUERRA, 2003; DUQUE, 1998).

Essas LDLs modificadas por oxidação, desencadeiam uma resposta imunológica local de caráter inflamatório. As células musculares lisas da túnica média, ativadas por citocinas e fatores de crescimento liberados nas lesões, migram da íntima atraídas por fatores quimiotáticos e proliferam contribuindo assim para a evolução das lesões (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2001).

Dentre as propriedades fisiopatológicas das LDL oxidadas pode-se citar as seguintes: promovem agregação plaquetária e formação de trombos; estimulam a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais; promovem a

diferenciação de monócitos a macrófagos; promovem apoptose nas células endoteliais e alteram a produção de óxido nítrico pelas mesmas; estimulam a proliferação de células musculares lisas e ainda modulam a ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear NF- κ B, que regula os genes envolvidos no processo aterosclerótico: TNF- α , interleucinas (1,6,8) e fatores estimuladores de formação de colônias monócito/macrófago (G-CSF, M-CSF, GM-CSF) (DUQUE, 1998; COTRAN & SCHOEN, 2000).

Os eventos explicados acima estão ilustrados na figura 1.

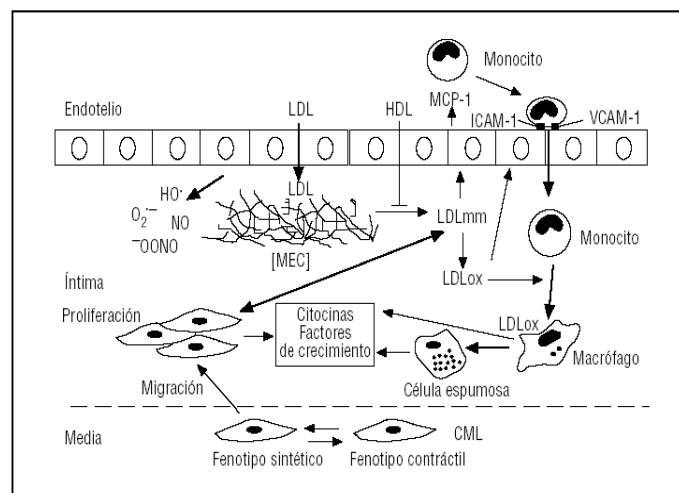


Figura 1. Mecanismos celulares e moleculares que dão origem ao início e progressão da aterosclerose MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., (2001).

2.4.5 Fatores de risco associados à aterosclerose

Nos humanos citam-se como os mais importantes a hiperlipidemia, tabagismo, hipertensão arterial, obesidade e sedentarismo, diabetes, fatores hemodinâmicos, homocisteína, idade avançada, sexo masculino, mulher na pós-menopausa, história pessoal de enfermidade cardiovascular e hiperlipidemias de ordem genéticas (COTRAN & SCHOEN, 2000). Já nos cães observa-se o aparecimento da aterosclerose de origem genética, principalmente nas raças Schnauzer miniatura, Brittany spaniel e até mesmo em alguns cães sem raça definida, ou como consequência de outras doenças como o hipotireoidismo, diabetes,

pancreatite, síndrome nefrótica, hepatopatias, obesidade e mesmo em cães com idade avançada (CASE et al., 1998; KAGAWA et al.; 1998; LOEB, 1997).

2.5 Antioxidantes e Aterosclerose

Analisando a “teoria oxidativa da aterosclerose” observa-se que os antioxidantes dietéticos vêm atraindo considerável atenção como agentes preventivos e terapêuticos. Inúmeros estudos in-vitro e in-vivo com modelos animais mostram que o consumo de antioxidantes pode prevenir e retardar a progressão da aterosclerose. Os compostos fenólicos constituem um dos grandes grupos de antioxidantes e são uma parte integrante da dieta em humanos.

Como composto fenólico, o resveratrol contribui com potencial antioxidante e desenvolve um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares em humanos. Tem sido mostrado que o resveratrol inibe a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e a agregação plaquetária (FREMONT, 2000). Ainda, induz um relaxamento vascular por mecanismos dependentes e independentes de óxido nítrico e inibe a expressão endotelial de moléculas de adesão e liberação de citocinas dos linfócitos T (DA LUZ & COIMBRA, 2001). Também possui um efeito inibidor na proliferação vascular de células musculares lisas (ARAIM et al., 2002). KINSELLA et al., (1993) acreditam que os efeitos benéficos do vinho podem ser, parcialmente, atribuídos aos compostos do grupo dos fenóis, encontrados na uva e no vinho, a saber: os flavonóides (antocianinas, catequina, quercetina, etc) e os não flavonóides (ácidos fenólicos e taninos). O principal papel desses compostos é devido à ação antioxidante prevenindo a formação de radicais livres (peróxido e hidroperóxido) e diminuindo a liberação de ácido araquidônico por macrófagos estimulados. Os fenóis podem agir como antioxidantes ativos, doando hidrogênio aos radicais livres, e como preventivos, impedindo a peroxidação de lipídios e inibindo enzimas oxidativas (fosfolipase A2, ciclooxigenase e lipoxigenase). Além disso, os fenóis podem atuar como protetores e regeneradores dos antioxidantes primários do organismo como o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E) e o β - caroteno (vitamina A) (FUHRMAN & AVIRAM, 2001).

3 OBJETIVOS

Este estudo visou avaliar a capacidade do resveratrol na prevenção da aterosmatose induzida em coelhos hipercolesterolêmicos, por meio de estudos morfológicos e morfométricos das túnicas íntima, média e adventícia na região do arco aórtico (*post-mortem*), bem como observar o perfil bioquímico sérico de lipoproteínas, (*in-vivo*), durante o período experimental.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais, alimentação e instalações

Para este estudo foram utilizados vinte coelhos machos adultos, com peso médio de 2,5 Kg, hípidos, da raça Nova Zelândia Branco, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu – UNESP, durante o período de 15 de março a 15 de maio de 2007. Estes animais foram divididos em quatro grupos experimentais formados por cinco animais cada, a saber: um grupo controle branco, (CT) sem tratamento, recebeu ração normal, para manutenção; um grupo tratado com ração para manutenção e administração simultânea de resveratrol (3 mg/Kg/dia) (R) um grupo controle branco, (CL) tratado com ração para manutenção, porém acrescida de 1,5% de colesterol na ração, um grupo tratado com ração para manutenção acrescida de 1,5% de colesterol e administração simultânea de resveratrol (3mg/Kg/dia) cápsulas por via oral (CR). Para o preparo da dieta hipercolesterolêmica adicionou-se colesterol em pó à ração de manutenção, previamente moída, que após este procedimento foi misturada, peletizada novamente e mantida em ambiente refrigerado.

Estes animais foram mantidos em gaiolas metálicas individuais, dotadas de comedouros fixos e bebedouros automáticos no Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV, Campus de Jaboticabal – UNESP, durante um período de 60 dias, com fornecimento de água *ad libitum* e de ração para manutenção na quantidade de 100 g/dia, com a seguinte composição: farelo de trigo 55%, premix vitamínico mineral, carbonato de cálcio, cloreto de colina, farelo de arroz, farelo de glúten de milho, melão, arroz quebrado, cloreto de sódio, aditivo antifúngico e fungioestático.

4.2 Colheita de Sangue

Durante o experimento foram colhidas amostras de 3 mL de sangue, com seringas heparinizadas, da artéria central da orelha, com os animais mantidos em caixas de contenção. Estas amostras de sangue foram utilizadas para as

determinações dos níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total, HDL e LDL, pelos métodos enzimáticos Labtest (LABTEST DIAGNÓSTICA) no Laboratório do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV, Campus de Jaboticabal, UNESP. O HDL foi analisado pela metodologia da inibição seletiva e o colesterol total, triglicerídeos e LDL pelo método enzimático – trinder. Todas as análises foram feitas em triplicata. Durante o período experimental as pesagens foram semanais para ajuste da dose do resveratrol e as colheitas de sangue quinzenais.

4.3 Colheita das amostras para análise histológica

Finalizado o período experimental de 60 dias, os animais foram desprovidos de alimento durante 18 horas; a seguir amostras de sangue foram colhidas para a realização dos exames bioquímicos e em seqüência, os animais foram eutanasiados e o arco aórtico foi removido (figura 2). A eutanásia foi feita com pentobarbital sódico, droga de rápida ação e eficácia para esta finalidade em animais. Produz inicialmente depressão profunda dos centros respiratórios, apnéia que pode persistir por alguns minutos e a sobredose provoca parada respiratória seguida da cardíaca. A dose letal para a efetiva eutanásia é cerca de três vezes a utilizada para anestésiar (PLUMB,2002). Este segmento arterial foi cuidadosamente lavado com solução salina e fixado em solução de Bouin durante 24 horas à temperatura ambiente. Após a visualização macroscópica das placas, o segmento do arco aórtico foi processado rotineiramente para a inclusão em histosec. Posteriormente foi realizado a microtomia semi-seriada, com cortes histológicos à espessura de 5µm, e intervalos de 10 µm, onde então foram corados pelas técnicas do tricrômico de Masson e da hematoxilina – eosina (TOLOSA et al., 2003) observados e fotomicrografados em um fotomicroscópio da Leica DM 5000 B para o estudo morfológico e posterior análise morfométrica. Este estudo foi realizado avaliando-se, em micrômetros, as espessuras das túnicas íntima, média e adventícia das áreas ateroscleróticas do arco aórtico. Para cada animal foram confeccionadas cinco lâminas com cinco cortes histológicos, ou seja, 25 cortes por animal, 125 por grupo experimental, totalizando-se 600 cortes histológicos analisados nesta pesquisa.

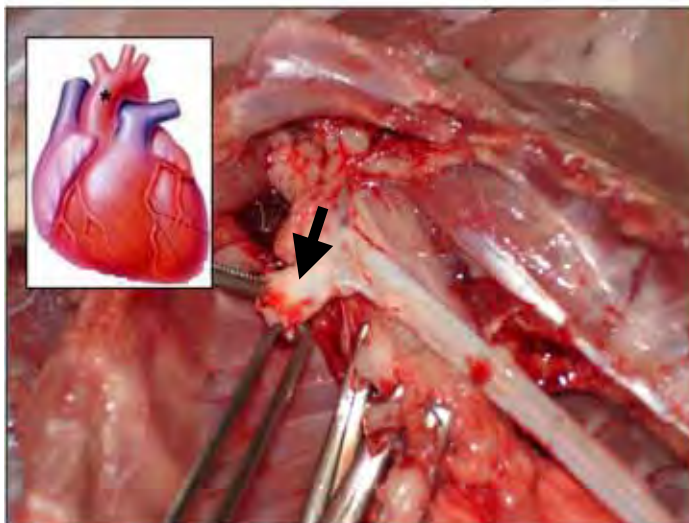


Figura 2 - Segmento do arco aórtico representado esquematicamente (*) e em detalhes (seta) na fotografia, colhido para realização das análises histológicas.

4.4 Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando análise de variância (ANOVA). Para avaliar as médias foi utilizado teste de Tukey e Duncan. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Morfológicos

A análise da morfologia macroscópica foi feita por inspeção visual da parede do vaso, do segmento estudado, durante a necropsia. Os animais que receberam dieta normal não apresentaram nenhuma anormalidade, porém, nos animais que receberam dieta hipercolesterolêmica, observou-se lesões com padrões difusos não comprometendo totalmente a parede do vaso, o segmento não foi aberto para não prejudicar a análise histológica e isto dificultou a inspeção macroscópica.

Os resultados obtidos, neste estudo, sobre a morfologia do arco aórtico de coelhos da raça Nova Zelândia Branco dos grupos Controle (CT), Resveratrol (R), Colesterol (CL) e Colesterol +Resveratrol (CR) estão ilustrados nas figuras de 3 a 5.

A análise do segmento do arco aórtico dos animais do grupo CT evidenciou aspecto histológico normal para as túnicas íntima, média e adventícia nesta porção arterial (Figura 3). Verificou-se na túnica íntima a presença do endotélio constituído por tecido epitelial simples pavimentoso, sustentado por tecido conjuntivo frouxo, o subendotélio, seguido pela membrana limitante elástica interna. Observou-se na túnica média fibras musculares lisas entre fibras elásticas em abundância (Figura 4). Notou-se ainda a presença da membrana limitante elástica externa, que delimita esta túnica da túnica adventícia. A última túnica, a adventícia, consistiu principalmente em fibras colágenas, vasos linfáticos, *vasa vasorum*, fascículo nervoso e epitélio simples pavimentoso, que a revestiu externamente (Figura 5).

A análise do segmento do arco aórtico dos animais do grupo R revelou características histológicas semelhantes as do grupo CT, em todas as estruturas mencionadas, em relação ao aspecto e localização (Figuras 3, 4 e 5).

A análise do segmento do arco aórtico dos animais do grupo CL demonstrou anormalidade na túnica íntima, por apresentar grande quantidade de macrófagos espumosos, dispostos em várias camadas desorganizadas, além de gotículas lipídicas extracelulares no tecido conjuntivo subendotelial, revestido por endotélio descontínuo. Observou-se, outrossim, logo abaixo da membrana limitante elástica interna, ou seja, no início da túnica média, a invasão por macrófagos espumosos. O

restante da túnica média, membrana limitante elástica externa e túnica adventícia foram característicos (Figuras 3, 4 e 5).

A análise do segmento do arco aórtico do grupo CR também indicou alteração patológica no subendotélio da túnica íntima, porém em menor grau de desenvolvimento quanto ao número de camadas de macrófagos espumosos em direção à luz do vaso, além de gotículas lipídicas extracelulares no tecido conjuntivo subendotelial, revestido por endotélio descontínuo. Verificou-se ainda a presença da membrana limitante elástica interna e logo abaixo desta no início da túnica média, a invasão por macrófagos espumosos. O restante da túnica média, membrana limitante elástica externa e túnica adventícia foram característicos (Figuras 3, 4 e 5).

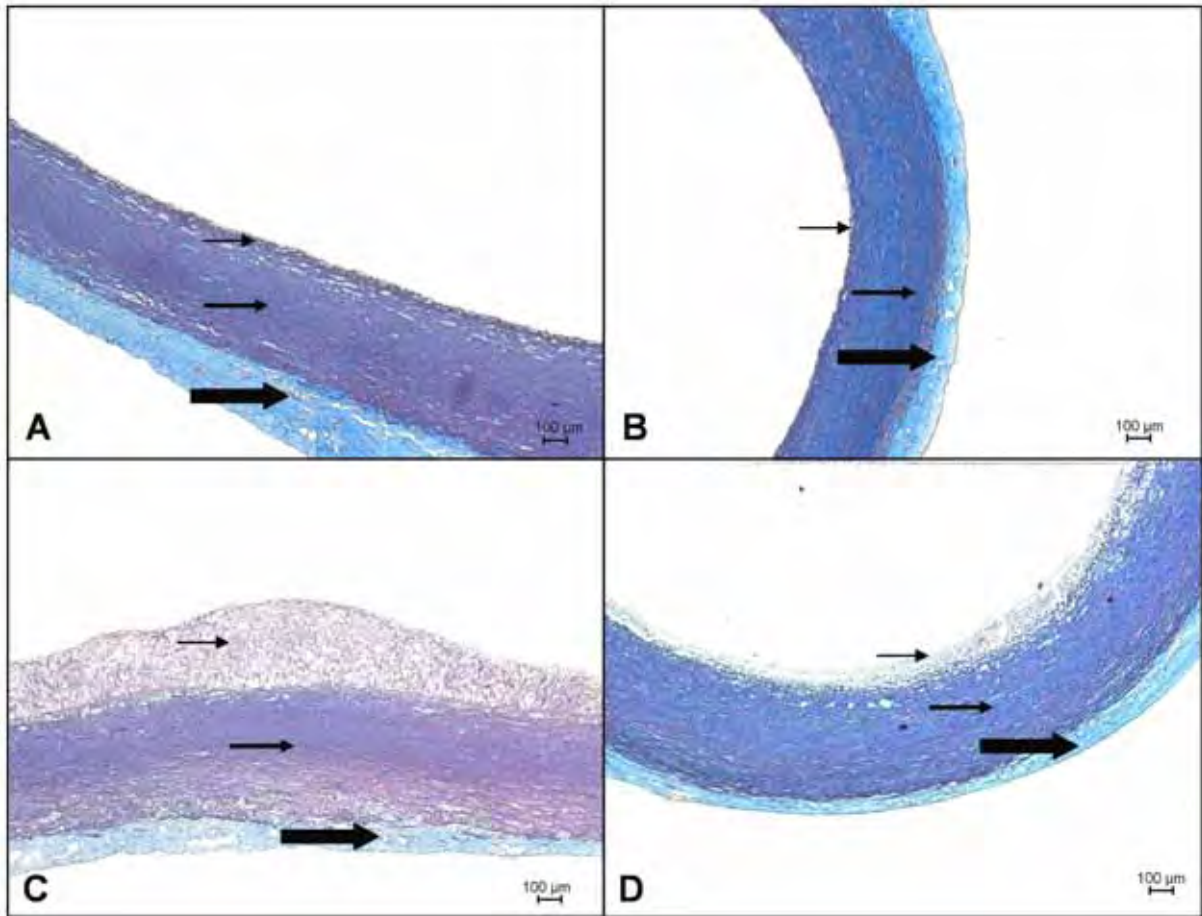


Figura 3- Fotomicrografia do segmento do arco aórtico de coelho da raça Nova Zelândia Branco, do grupo CT, R, CL e CR representados pelas letras A, B, C e D respectivamente. Observa-se a túnica íntima (→), a média (→) e a adventícia (→). Coloração: Tricrômico de Masson.

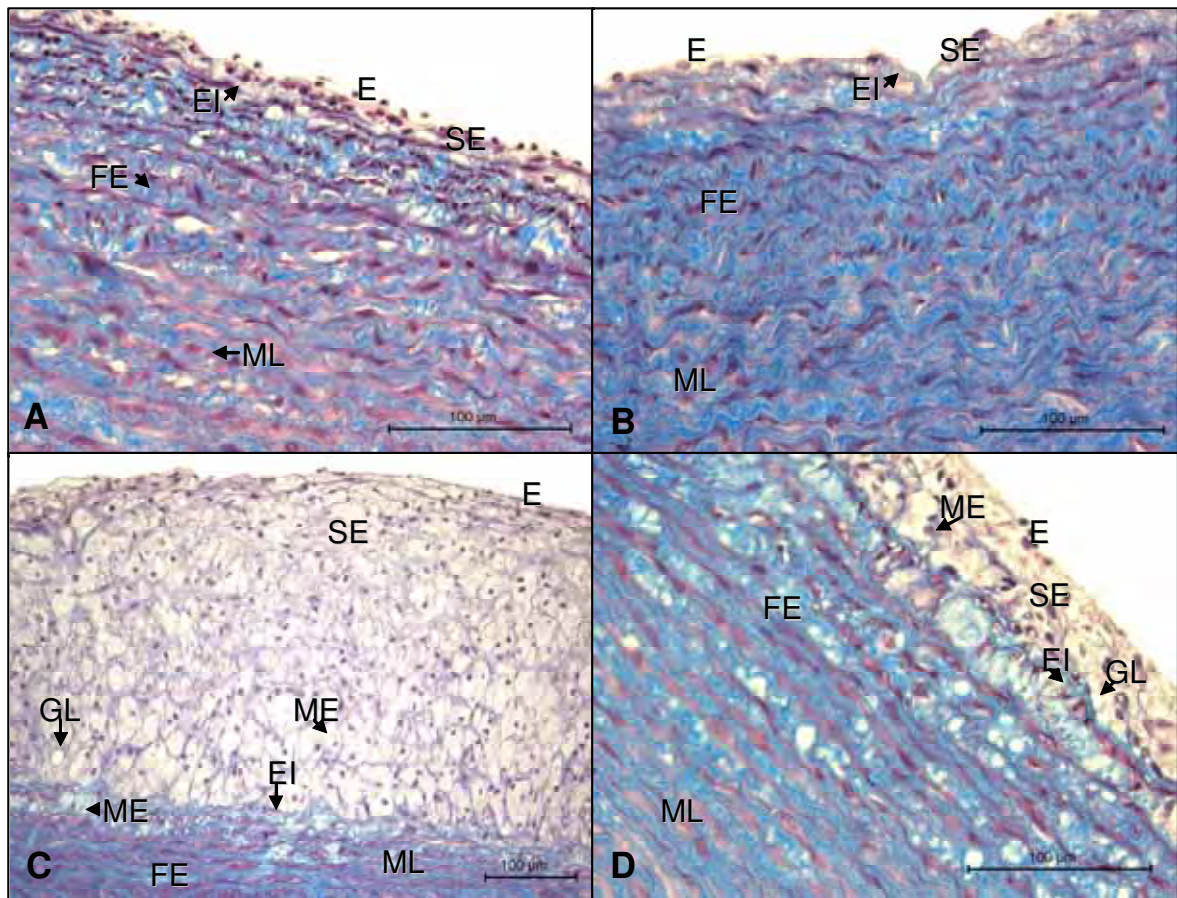


Figura 4- Fotomicrografia do segmento do arco aórtico de coelho da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos CT, R, CL e CR, representados pelas letras A, B, C e D respectivamente, evidenciando na túnica íntima dos grupos CT e R o endotélio (E), o subendotélio (SE) e a membrana limitante elástica interna (EI), nos grupos CL e CR além destas estruturas observa-se macrófagos espumosos (ME) e gotículas lipídicas (GL). Na média dos grupos CT e R as fibras musculares lisas (ML) entremeadas às fibras elásticas (FE), no início da média dos grupos CL e CR a invasão por macrófagos espumosos seguida por fibras musculares lisas (ME) entremeadas às fibras elásticas. Coloração: Tricrômico de Masson.

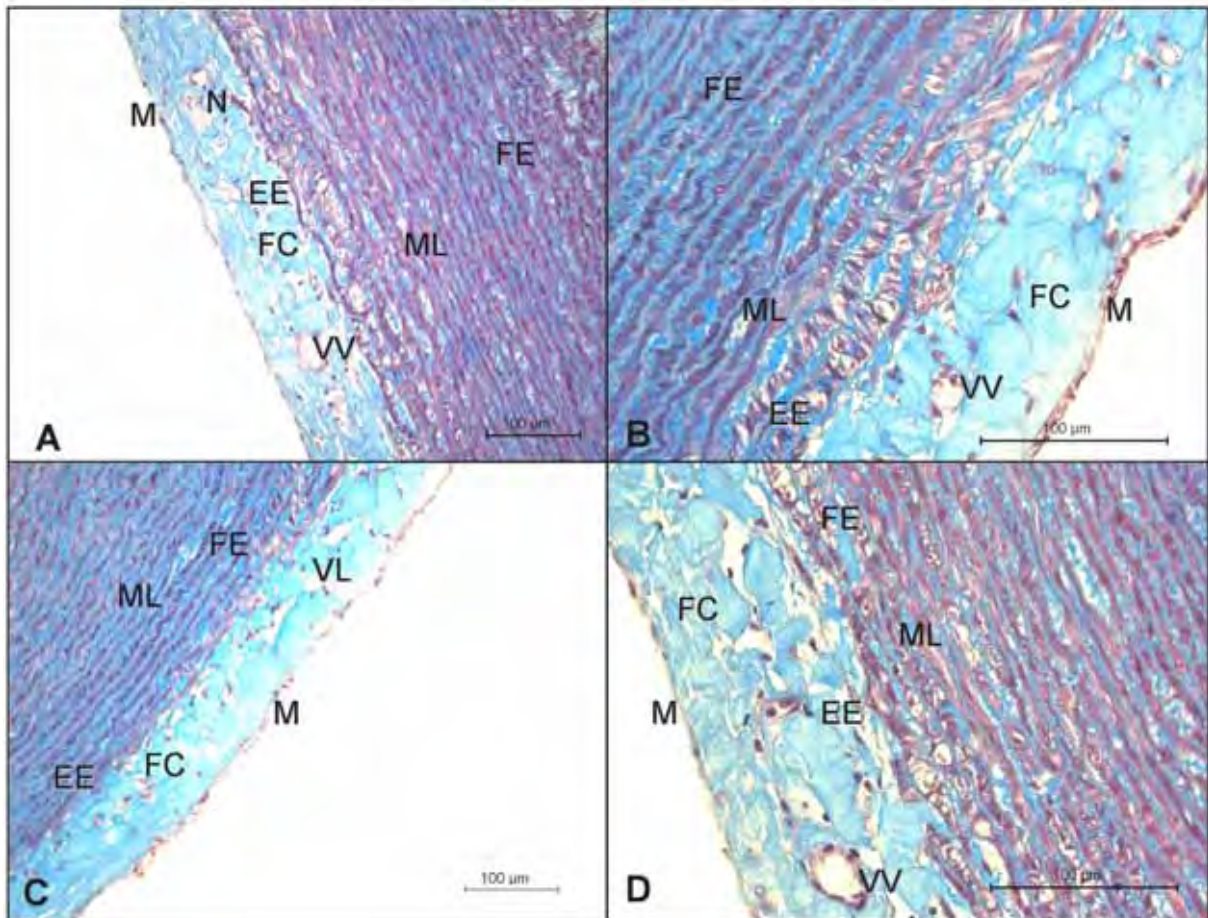


Figura 5- Fotomicrografia do segmento do arco aórtico de coelho da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos CT, R, CL e CR, representados pelas letras A, B, C e D respectivamente, evidenciando na túnica média as fibras musculares lisas (ML), entremeadas às fibras elásticas (FE) e a túnica adventícia com fibras colágenas (FC), fascículo de nervo (N), vasos linfáticos (VL), *vasa vasorum* (VV) e mesotélio (M) revestindo esta túnica. Coloração: Tricrômico de Masson.

5.2 Morfométricos

A análise estatística dos resultados referentes aos valores médios \pm desvio padrão da espessura das túnica do segmento do arco aórtico obtidos neste estudo, estão expostos nas figuras de 6 a 9.

Os valores da túnica íntima em μm indicaram que o grupo CL diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos grupos CT, R e CR, os quais não diferiram entre si ($p > 0,05$) (Figura 6).

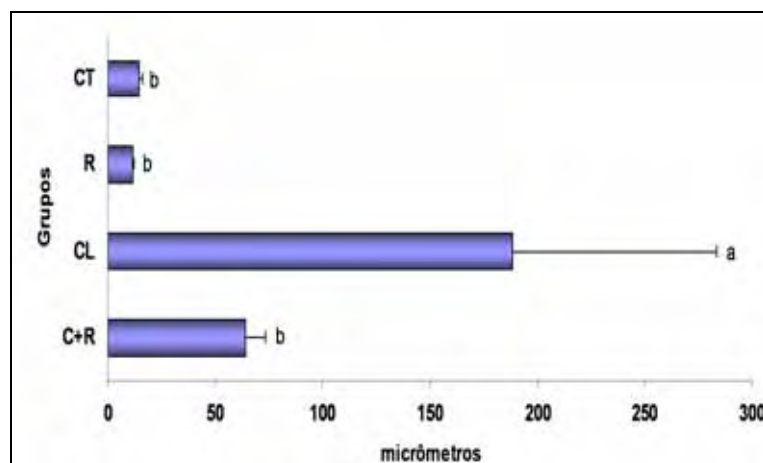


Figura 6- Valores médios \pm desvios padrão da espessura em μm da túnica íntima do segmento do arco aórtico de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR). Letras diferentes denotam significância ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os valores da túnica média em μm evidenciaram que o grupo CT diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos grupos CL e CR e não diferiu ($p > 0,05$) do grupo R. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) também entre os grupos R, CL e CR (Figura 7)

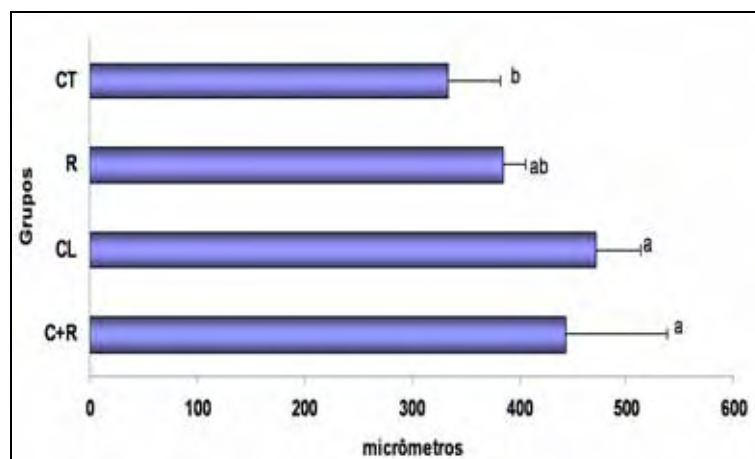


Figura 7- Valores médios \pm desvios padrão da espessura em μm da túnica Média do segmento do arco aórtico de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR). Letras diferentes denotam significância ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os valores da túnica adventícia revelaram que o grupo CL diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos grupos CT e R porém, não diferiu ($p > 0,05$) do grupo CR. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) também entre os grupos CT e R (Figura 8)

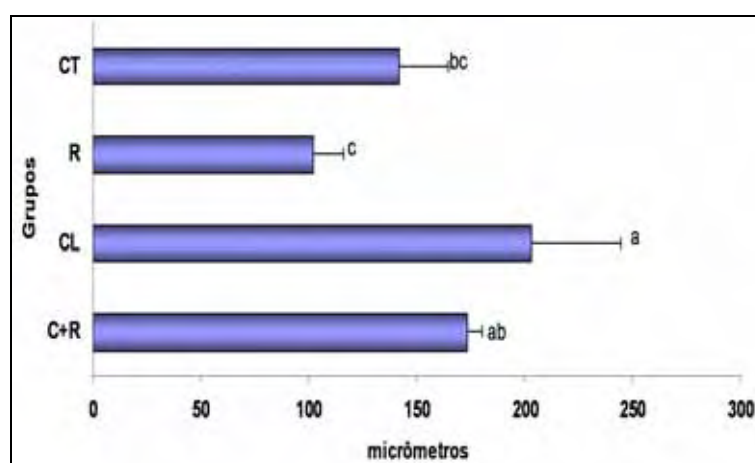


Figura 8- Valores médios \pm desvios padrão da espessura em μm da túnica Adventícia do segmento do arco aórtico de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR). Letras diferentes denotam significância ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os valores totais das túnica íntima, média e adventícia mostraram que o grupo CL diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre os grupos CT, R e CR (Figura 9).

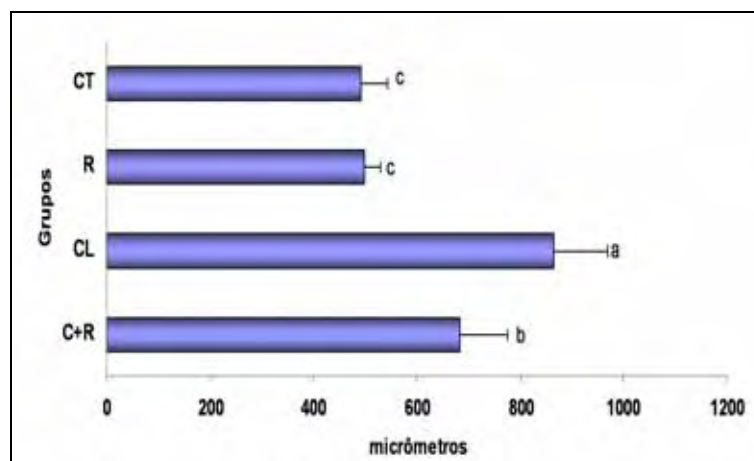


Figura 9- Valores médios \pm desvios padrão da espessura em μm da parede (íntima + média + adventícia) do segmento do arco aórtico de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR). Letras diferentes denotam significância ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

5.3 Perfil lipídico sérico

A análise estatística dos resultados referentes aos valores médios \pm desvio padrão do perfil lipídico sérico, obtidos neste estudo, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco estão expressos nas figuras de 10 a 13.

Os valores de HDL em mg/dl indicaram que o grupo controle diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos grupos CL e CR e não diferiu ($p > 0,05$) do grupo R (Figura 10).

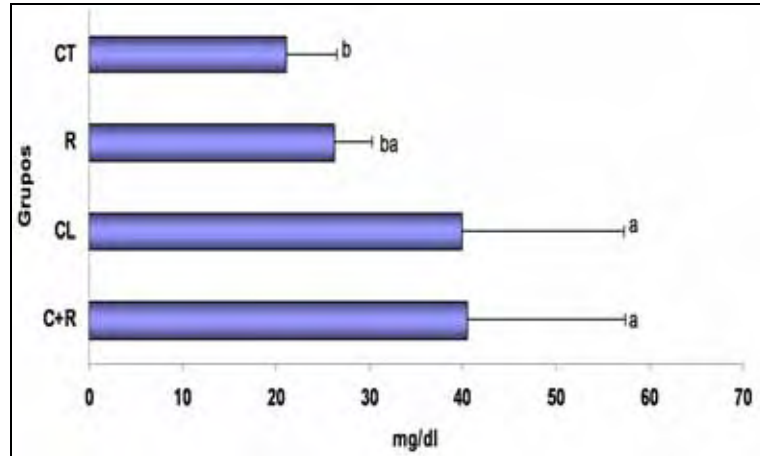


Figura 10- Valores médios \pm desvios padrão dos níveis séricos de HDL mg/dl de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR). Letras diferentes denotam significância ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan

Os valores de triglicerídeos em mg/dl evidenciaram que o grupo CR diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos grupos CT e R e não diferiu ($p > 0,05$) do grupo CL (Figura 11).

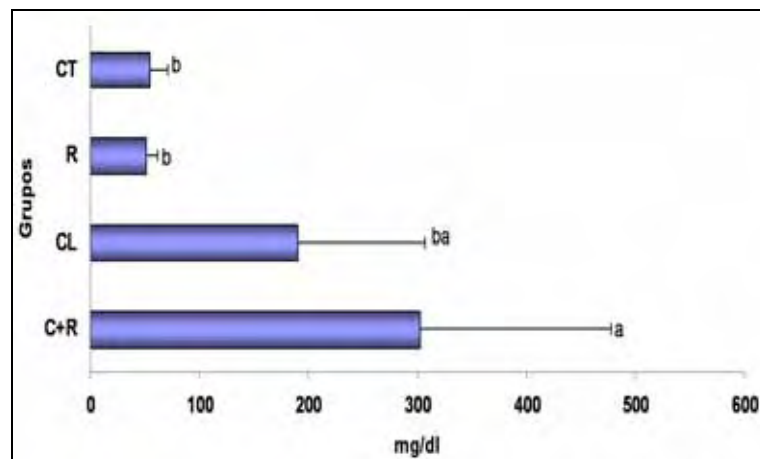


Figura 11- Valores médios \pm desvios padrão dos níveis séricos de Triglicerídeos em mg/dl de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR). Letras diferentes denotam significância ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Os valores de Colesterol Total e LDL em mg/dl revelaram que os grupos CL e CR não diferiram entre si ($p>0,05$) porém, diferiram significativamente ($p<0,05$) dos grupos CT e R, os quais também não diferiram entre si ($p>0,05$) (Figura 12) e (Figura 13) respectivamente.

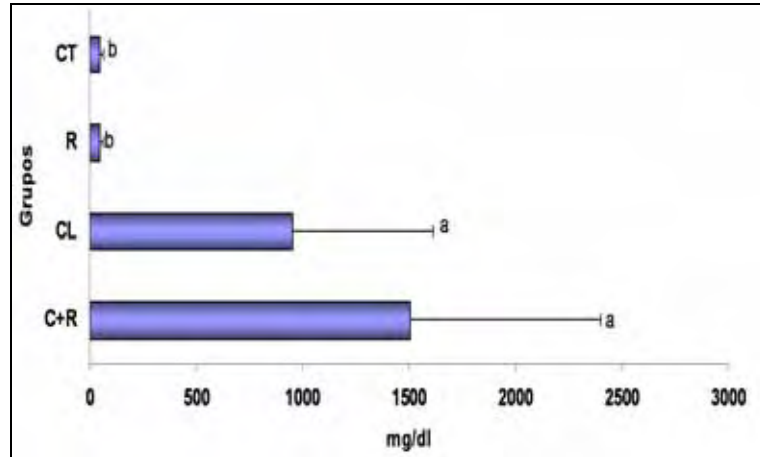


Figura12- Valores médios \pm desvios padrão dos níveis séricos de Colesterol Total em mg/dl de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR). Letras diferentes denotam significância ($p<0,05$) pelo teste de Duncan

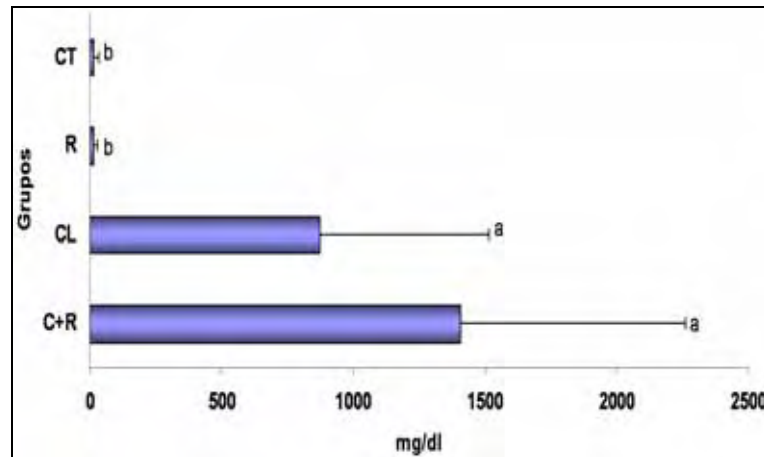


Figura13- Valores médios \pm desvios padrão dos níveis séricos de LDL em mg/dl de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR). Letras diferentes denotam significância ($p<0,05$) pelo teste de Duncan

6 DISCUSSÃO

Os resultados morfológicos macroscópicos dos dois grupos mantidos sob dieta hipercolesterolêmica, CL e CR apresentaram lesões ateroscleróticas no segmento do arco aórtico estudado, à semelhança dos relatos de alguns pesquisadores, a saber: Assim, STARY et al. (1994) encontraram uma possível explicação para a susceptibilidade de algumas regiões ao desenvolvimento das lesões ateroscleróticas, a qual seria em parte, devido à túnica íntima apresentar maior número de camadas de células musculares lisas nesta região. Ainda afirmaram que a utilização de níveis altos de colesterol em animais de laboratório levou ao desenvolvimento de lesões nas regiões suscetíveis e também grandes lesões amplamente dispersas em outros segmentos arteriais, como aquelas desenvolvidas em humanos com hipercolesterolemia de origem genética; SCHWENKE & CAREW, (1987) mencionaram que lesões iniciais ocorrem num padrão mais difuso no arco aórtico e aorta descendente e esta susceptibilidade poderia ser devido a uma elevação focal da degradação de LDL e de LDL intacta na parede endotelial e ainda COTRAN & SCHOEN, (2000) descreveram que o arco aórtico é uma região onde as lesões ateroscleróticas são frequentemente encontradas.

A utilização de uma dieta suplementada com 1,5% de colesterol, neste estudo, mostrou ser eficiente na formação de lesões ateroscleróticas no arco aórtico no período de 60 dias. MOREL et al. (1994) da mesma forma, induziu lesões ateroscleróticas na aorta de coelhos com adição de 1,0% de colesterol na dieta durante um período de 10 semanas, porém os resultados deste trabalho refletem os achados de ZOU et al. (2003) e WANG et al. (2005) que também usaram em seus estudos percentuais semelhantes de colesterol.

Desta forma, a escolha de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, neste estudo, como modelo experimental para a indução da aterosclerose, se baseou nas descrições de WANG et al. (2005) os quais relataram que os animais desta raça foram sensíveis a aterogênese. Ainda, CHOE et al. (2001); ZOU et al. (2003) descreveram que algumas linhagens de ratos e também a linhagem de coelhos Watanabe com hiperlipidemia hereditária foram sensíveis a aterogênese.

A administração de resveratrol aos animais foi bem tolerada durante todo o período experimental e não foi observado nenhum tipo de reação adversa. A forma de administração por meio de cápsulas foi extremamente eficiente pois os animais não desperdiçavam o princípio ativo, além de apresentar docilidade na manipulação. A dose utilizada 3 mg/kg de peso foi eficiente na diminuição da placa aterosclerótica concordando com estudos prévios realizados por WANG et al. (2005). Ainda, SHANMUGANAYAGAM et al.(2006) em trabalhos semelhantes utilizando suco de uva observaram também uma prevenção no desenvolvimento do ateroma. Já outro estudo em coelhos da linhagem Watanabe com hiperlipidemia hereditária utilizando vinho tinto na dosagem de 23 mg de polifenólicos totais/kg/dia não mostrou eficácia na prevenção e progressão de lesões ateroscleróticas WAKABAYASHI (1999).

A análise histológica do segmento do arco aórtico dos animais do grupo CT e R (alimentados sob dieta normal) evidenciou características histológicas normais para as túnicas íntima, média e adventícia de acordo com aquelas descritas por JUNQUEIRA & CARNEIRO, (2005).

Na análise do segmento do arco aórtico dos animais do grupo CL, observou-se anormalidade na túnica íntima por apresentar grande quantidade de macrófagos espumosos, dispostos em várias camadas desorganizadas, além de gotículas lipídicas extracelulares no tecido conjuntivo subendotelial. O endotélio que revestiu a túnica íntima foi composto por uma camada de células descontínuas, concordando com dados relatados por STARY et al. (1994) em humanos, dados estes, que também estão presentes em outras espécies como pombos e macacos. A túnica média foi invadida por macrófagos espumosos e observou-se um arranjo indefinido da membrana limitante elástica interna. No restante desta túnica não houve modificação de seus componentes.

Nos animais do grupo CR houve alteração patológica no subendotélio da túnica íntima, porém em menor grau de desenvolvimento quanto ao número de camadas de macrófagos espumosos em direção à luz do vaso, além de gotículas lipídicas extracelulares no tecido conjuntivo subendotelial. O endotélio apresentou-se como uma camada descontínua de células. Lesões estas semelhantes às aquelas encontradas em experimento realizado por JUZWIADK et al. (2005) utilizando o flavonóide quercetina. Observou-se também invasão no início da camada média.

Este tipo de lesão permite classificá-la segundo STARY et al. (1994) em lesões do tipo III, ou seja, um estágio intermediário entre as lesões do tipo II e IV (ateroma). Juntamente com as células lipídicas presentes nas lesões do tipo II, lesões do tipo III contêm gotas de lipídeos extracelulares dispersos que fazem ruptura das células musculares lisas da íntima. Estes lipídeos extracelulares são os precursores para a formação do “núcleo lipídico maior” que caracteriza a lesão tipo IV. As lesões do tipo III aparecem em algumas regiões de espessamento normal adaptativo da íntima (regiões susceptíveis ao desenvolvimento das lesões). Lesões ateroscleróticas na aorta classificadas como tipo II são encontradas em 99% das crianças com idade entre 2 e 15 anos, com maior frequência no arco aórtico, aorta descendente torácica e abdominal do que na aorta ascendente. Ainda nos grupos hipercolesterolêmicos, CL e CR, observou-se em alguns locais da parede do vaso lesões do tipo II a chamada “estria gordurosa” a qual consistia em poucas camadas de macrófagos espumosos.

Não se evidenciou lesões na túnica adventícia para todos os grupos experimentais; informações estas de acordo com STARY et al. (1994), os quais relataram que somente em estágios avançados de lesões ateroscleróticas, onde ocorre um grande acúmulo de lipídeos extracelulares, ocorre deformidade na adventícia.

O padrão de lesão encontrado neste estudo para esta espécie, lesão tipo III, foi semelhante às lesões encontradas na espécie humana e também aquelas encontradas em cães (STARY et al., 1994; KAGAWA et al., 1998).

Na análise morfométrica dos resultados deste estudo, verificou-se que a espessura da túnica íntima dos animais do grupo CR foi semelhante aquela dos grupos CT e R, mostrando que houve uma significativa diminuição da infiltração por macrófagos espumosos quando comparado aos animais do grupo CL o que concordou com as evidências de WANG et al. (2005) quando comprovaram o efeito anti-aterogênico do resveratrol. Já MOREL et al. (1994) em trabalhos semelhantes utilizando Vitamina E e C não observaram significativa diminuição no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas.

Entretanto, houve um maior espessamento da túnica média para os animais dos grupos CL e CR quando comparados aos grupos CT e R, que foram normais.

Este resultado para a túnica media diferiu daqueles encontrados por WANG et al. (2005) onde não foi constatada diferença para os grupos hipercolesterolêmicos e controle.

Na análise morfométrica da túnica adventícia verificou-se diferença entre os grupos estudados; diferença esta, não em consequência dos estágios das lesões, podendo-se aventar a hipótese que houve uma interferência casual, considerando-se que as lesões foram classificadas como tipo III ou seja, não avançadas.

Pode-se imaginar que o resveratrol diminuiu o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas com respaldo em alguns relatos da literatura sobre este composto polifenólico onde foi observado um amplo aspecto de efeitos biológicos, tais como propriedades antioxidantes, antiplaquetárias, protetoras endoteliais e sua atividade na proliferação de CML (FRÉMONT, 1999). Assim, com relação aos efeitos antioxidantes, estudos feitos por WAKABAYASHI (1999) comprovaram que os polifenólicos do vinho tinto foram capazes de reduzir a oxidação plasmática de LDL. ZHAO et al. (2001) demonstraram que uma refeição rica em gordura prejudica a função endotelial por um período maior que 4 horas, mais severamente em pacientes com doença coronária. Esta disfunção foi atribuída principalmente por um aumento no estresse oxidativo endotelial e os antioxidantes presentes no vinho tinto foram capazes de inibir este processo. Num ensaio in vitro realizado por FREMÓN et al. (1999) utilizando alguns compostos antioxidantes, observaram que os antioxidantes do vinho tinto mostraram notável inibição da peroxidação de LDL (80-90%) enquanto o extrato cítrico e o extrato de soja demonstraram 70% e 55% de inibição respectivamente. MARTIN & FREI (1997) pesquisaram a atuação da vitamina C na oxidação da LDL e evidenciaram que esta atuou prevenindo as modificações oxidativas por depurar radicais livres e outras espécies reativas que podem interagir com o LDL. Também MORENO et al. (2000) descreveram por meio de um estudo in-vitro, que o efeito antioxidante proporcionado pelos compostos fenólicos foi maior do que aquele causado pelas vitaminas C e E. HEATON et al. (2002) mostraram que a utilização de antioxidantes como vitaminas E, C, taurina, licopeno e β - caroteno adicionado na ração de cães, melhorou a capacidade antioxidante plasmática, reduziu a lesão no DNA e ainda promoveu uma melhor resposta imunológica nos animais.

No que diz respeito à agregação plaquetária, WANG et al. (2002) observaram significativa inibição da agregação plaquetária *in vitro*, a qual foi dependente da concentração de resveratrol utilizada. Em coelhos da raça Nova Zelândia Branco com hipercolesterolemia induzida e administração simultânea de 4mg/kg de resveratrol, houve também inibição da agregação plaquetária. ASCIAK et al. (1995) ao estudarem *in vitro* o efeito do trans-resveratrol, alguns compostos fenólicos derivados do vinho e alguns antioxidantes, sob a agregação plaquetária e a síntese de eicosanóides em células humanas, observaram um bloqueio na agregação plaquetária e uma redução na síntese de eicosanóides, o que segundo estes autores, contribuíram para um efeito cardioprotetor do resveratrol, principalmente na aterosclerose e em pacientes com doença coronária. Também, outra explicação para a atividade cardioprotetora do resveratrol seria pela melhora da função endotelial, conforme observado por ZOU et al. (2003) em seus trabalhos onde os níveis plasmáticos de endotelina tiveram uma diminuição e os níveis de óxido nítrico aumentaram promovendo assim uma maior vasodilatação. CHAN et al. (2000) num estudo *in vitro* estimulando macrófagos de uma linhagem murina para expressão gênica de iNOS e produção de ON observaram que os componentes fenólicos da uva suprimiram a produção de ON mais pelo efeito depurador do que pelo redução na expressão gênica de iNOS e que o etanol em níveis moderados, sob condições experimentais, não apresentou nenhum efeito, entretanto quando associado a 0,1 até 0,75% aumentou o efeito dos polifenólicos. Outra observação que poderia explicar o efeito do resveratrol na aterosclerose, deve-se aos seus efeitos na migração e proliferação de células musculares lisas. Assim, em estudos *in vitro* com células musculares retiradas da aorta de bovinos, verificou-se que com o uso do resveratrol, em uma dose dependente, houve uma diminuição na proliferação das mesmas; já em outro estudo utilizando células de ratos, também houve uma diminuição da hiperplasia intimal na parede vascular em lesões provocadas (ARAIM et al., 2002; GU et al., 2006).

Ressalta-se ainda o efeito benéfico do resveratrol na preservação da integridade do endotélio, pois observa-se em alguns trabalhos seu efeito inibidor na expressão de VCAM-1, ICAM-1 e no fator de transcrição NF- κ B, responsável este

último, por efeitos moduladores pró-inflamatórios (FERRERO et al., 1998; MANNA et al., 2000; Wung et al., 2005).

Os resultados encontrados neste trabalho, referente ao perfil lipídico sérico, para todas as variáveis estudadas, foram semelhantes entre os grupos CL e CR, entretanto diferindo estatisticamente dos grupos CT e R os quais foram semelhantes entre si. Os valores de HDL para os 4 grupos, mantiveram-se em níveis dentro da normalidade para a espécie, apenas houve um leve aumento para os grupos CL e CR. Os valores de LDL, triglicerídeos e colesterol total foram acima dos níveis normais para os grupos hipercolesterolêmicos. Já entre os grupos CT e R não constatou-se significância estatística e os valores de LDL, triglicerídeos e colesterol total permaneceram dentro da normalidade. Estes achados foram diferentes daqueles encontrados por WANG et al. (2005) em trabalho semelhante, os quais relataram que o perfil lipídico manteve-se dentro dos níveis normais do início ao final do experimento inclusive para os grupos hipercolesterolêmicos. Observou-se ao analisar os achados deste trabalho, que os níveis de LDL, HDL, triglicerídeos e colesterol total não foram significativamente afetados pelo uso do resveratrol durante o período experimental, estando de acordo com os resultados de WANG et al. (2005). Contrariando estas evidências, alguns pesquisadores verificaram alterações no perfil lipídico, a saber: SHANMUGANAYAGAM et al. (2006) observaram uma diminuição do nível sérico de colesterol total utilizando 225 ml/dia de suco de uva Concord em animais hipercolesterolêmicos durante 48 dias; OLIVEIRA et al. (2004) ao utilizarem diferentes doses do flavonóide rutina em coelhos saudáveis, verificaram uma diminuição dos valores séricos de colesterol total e triglicerídeos; JUZWIAK et al. (2005) em experimento semelhante ao utilizarem o flavonóide quercetina constataram redução nos níveis séricos de triglicerídeos e colesterol total; AUGER et al. (2005) quando utilizaram hamsters submetidos a uma dieta aterogênica por 12 semanas detectaram que o resveratrol foi eficiente ao diminuir a concentração plasmática de colesterol em doses semelhantes aquelas recomendadas ao consumo humano, ou seja, dois copos de vinho livre de álcool por refeição, e SCHAEFER (2002) observou uma diminuição na formação da lesão e também nas concentrações plasmáticas de colesterol em coelhos que receberam uma dieta aterogênica simultânea a uma dose de α -tocoferol.

7 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

- A administração de uma dieta hipercolesterolêmica, com a adição de 1,5% de colesterol, a coelhos da raça Nova Zelândia Branco durante um período de 60 dias desenvolveu lesões ateroscleróticas no segmento do arco aórtico estudado classificadas como estria gordurosa e lesões do tipo III.
- Nos animais dos grupos mantidos sob dieta normal CT e R não foi verificada formação de lesões, tanto na morfologia quanto na morfometria, também não foi verificada modificações no perfil lipídico sérico.;
- Na análise morfológica microscópica observou-se que, nos animais dos grupos que receberam somente colesterol sem resveratrol, houve a formação de lesão com uma grande quantidade de macrófagos espumosos, gotículas lipídicas extracelulares e maior desorganização da túnica íntima, com comprometimento do início da túnica média e ausência de lesões na adventícia. Já naqueles animais do grupo que recebeu colesterol juntamente com resveratrol observou-se um padrão de lesão mais organizado com menor número de camadas de macrófagos espumosos e gotículas lipídicas extracelulares, porém houve igual comprometimento da média e ausência de lesões na adventícia.
- Na avaliação do perfil lipídico sérico verificou-se que os valores de HDL mantiveram-se dentro dos níveis normais para a espécie nos quatro grupos estudados, apenas houve um leve aumento para os grupos CL e CR. Os valores de LDL, triglicérides e colesterol total foram acima dos níveis normais, para os grupos hipercolesterolêmicos. O Resveratrol não apresentou atividade hipolipêmica;
- Assim, conclui-se por meio deste estudo que o resveratrol atua como agente preventivo no desenvolvimento da lesão aterosclerótica, porém não altera o perfil lipídico sérico. Baseados nos resultados encontrados neste trabalho, uma suplementação dietética com resveratrol para humanos e espécies animais susceptíveis à aterosclerose mostra ser uma possível alternativa para ajudar na prevenção do desenvolvimento desta enfermidade.

8 REFERÊNCIAS

AUGER, C.; TEISSEDE, P. L.; GERAIN, P.; LEQUEUX, N.; BORNET, A.; SERISIER, S.; BESANCON, P.; CAPORICCIO, B.; CRISTOL, J. P. Dietary wine phenolics catequin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 23, n.53, p. 2015-2021, 2005.

ARAIM, O.; BALLANTYNE, J.; WATERHOUSE, A. L.; SUMPIO, B. E. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation with red wine and red wine polyphenols. **Journal of Vascular Surgery**, St Louis, v. 35, n.6, p.1226-1232, 2002.

ASCIAK, C. R.; HAHN, S.; DIAMANDIS, E. P.; SOLEAS, G.; GOLDBERG, D. M. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. **International Journal of Clinical Chemistry**, Amsterdam, v.235, n. 10, p. 207-219, 1995.

ATHAR, M.; BACK, J. H.; TANG, X.; KIM, K. H.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D.R.; KIM, A.L. Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Duluth, v. 3, n.14, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=17306316>. Acesso em: 4 maio, 2007.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.52, n. 5, p. 223-261, 1983.

CASE, L. P.; CAREY, D. P.; HIRAKAWA, D.A. **Nutrição canina e felina: manual para profissionais**. Madri: Harcourt Brace de Espana, 1998. p. 298-299.

CHAN, M. M. Y.; MATTIACCI, J. A.; HWANG, H. S.; SHAH, A.; FONG, D. Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. **Biochemical Pharmacology**, New York, v.60, n. 5, p.1539-1548, 2000.

CHEMELLO E.; GUERRA. K. A bioquímica da arteriosclerose: textos interativos. Caxias do Sul, 2003, Disponível em : <http://www.ucs.br/ccet/defq/naeq/material_didatico/textos_interativos_09.htm>. Acesso em: 29 maio 2006.

CHOE, S. C.; KIM, H. S.; JEONG, T. S.; BOK, S. H.; PARK, Y, B. Narigin has an antiatherogenic effect with the inhibition of intercellular adhesion molecule-1 in hypercholesterolemic rabbits. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, Hagerstown, v. 38, n. 12, p. 947-955, 2001.

COLOMÉ, C.; MARTINEZ-GONZÁLEZ, J.; VIDAL, F.; De CASTELLARNAU C. BADIMON, L. Small oxidative changes in atherogenic LDL concentrations irreversibly regulate adhesiveness of human endothelial cells. Effect of the lazaroid U74500A. **Atherosclerosis**, Limerick, v.149, n.2, p. 295-302, 2000.

COLOMER, M. F. Efectos antioxidantes del aceite de oliva y de sus compuestos fenólicos. **Tese de doutorado em Medicina**. Disponível em :<<http://hera.urg.es/tesisugr/15467569.pdf>>. Acesso em: 15 nov 2007.

COTRAN, R. S.; SCHOEN F. Vasos sanguíneos. In: COTRAN, R. S.; KUMAR,V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. 6 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2000. p. 441-460.

CROSS, C. E.; HALLIWELL, B.; BORISH, E. T.; PRIOR, W. A.; AMES, B. N.; SAUL, R. L. Oxygen radical and human diseases. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 107, n.4, p. 526-545, 1987.

DA LUZ P.L.; COIMBRA, S. R. Alcohol and Atherosclerosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.73, n. 5, p. 51-55, 2001.

DAUGHERTY A.; DUNN, J. L.; RATERI, D. L.; HEINECKE, J. W. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. **The Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v. 94, n.1, p. 437-444, 1994.

DUQUE, F. L. V. **Aterosclerose** : aterogênese e fatores de risco. Rio de Janeiro. Sociedade

Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vasculiar Regional. Disponível em: <<http://www.artériosclerose.med.br/revistas/sbacvrj/1998/3/Atualizacao/03.htm>>.

Acessado em: 10 out. 2006.

FERRERO, M. E.; BERTELLI, A. E.; FULGENZI, A.; PELLEGGATTA, F.; CORSI, M. M.; BONFRATE, M.; FERRARA, F.; De CATERINA, R.; GIOVANNINI, L.; BERTELLI, A. Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.68, n. 7, p. 1208-1214, 1998.

FREMÓN, L.; BELGUENDOZ, L.; DELPAL, S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. **Life Sciences**, Basel, v. 64, n. 6, p. 2511-2521, 1999.

FREMONT, L, Minireview: Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, Elmsford, v. 66, n. 8, p. 663-673, 2000.

FUHRMAN, B.; AVIRAM, M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. **Current Opinion in Lipidology**, London, v.12, n.1, p.41-48, 2001.

GU, J.; WANG, C. Q.; DING, H. Y.; XIE, X. L.; XU, Y. M.; WANG, B. Y.; HUANG, D. J. Effects of resveratrol on endothelial progenitor cells and their contributions to reendothelialization in intima-injured rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, Hagerstown, United States, v.47, n.5, p.711-721, 2006.

GUTTERIDGE, J. M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 41, n. 6, p.1819-1828, 1995.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Metabolismo dos Lipídios. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 729-738.

HALIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**, Oxford: **Clarendon Press**, 1999. p.112.

HAND, M. S.; THATCHER, C. D.; REMILLARD, R. L. **Nutrición clínica en pequeños animales**, 4. ed. Buenos Aires: Inter-Médica, 2000. p.1016-1023.

HEATON, P. R.; REED, C. F.; MANN, S. J.; RANSLEY, R.; STEVENSON, J.; CHARLTON, C. J.; SMITH, B. H. E.; HARPER, E. J.; RAWLINGS, J. M. Role of dietary antioxidants to protect against DNA damage in adult dogs. **The Journal of Nutrition**, Cambridge, v.132, n. 9, p.1720-1724, 2002.

JOHNSON H. **The story of wine**. London: Mitchell-Beazley, 1989. p. 480.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.370.

JUNQUEIRA, L. C. U. **Biologia estrutural dos tecidos:histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.122.

JUZWIAK, S.; WOJCICKI, J.; MORZYCKI, K.; MARCHLEWICZ, M.; BIATECKA, M. ROZEWICKA, L. W.; SZKLARZ, B. G.; DROZDZIK, M. Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits. **Pharmacological Reports**, Poland, v.57, n. 5, p.604-609, 2005.

KAGAWA, Y.; HIRAYAMA, K.; UCHIDA, E.; IZUMISAWA, Y.; KOTANI, T.; NIYAMA, M.; YOSHINO, T. Systemic atherosclerotic in dogs: histopathological and immunohistochemical studies of atherosclerotic lesions. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 3, n.118, p.195-206, 1998.

KAUR, G.; ROBERTI, M.; RAUL, F.; PENDURTHI., U. R. Suppression of human monocyte tissue factor induction by red wine phenolics and synthetic derivatives of resveratrol. **Thrombosis Research**, Elmsford, v. 119, n. 2, p. 247-56, 2006.

KAWAMURA, M.; HEINECKE, J. W.; CHAIT, A. Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v. 94, n. 2, p. 771-778, 1994.

KINSELLA J. E.; FRANKEL E.; GERMAN B.; KANNER, J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. **Food Technology**, Chicago, v. 47, n. 4, p.85-89, 1993.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos animais domésticos**. Porto Alegre: Artmed, 2004, v. 2, p.153- 169.

LOEB, W. F. Clinical Biochemistry of Laboratory Rodents and Rabbits. In: KANEKO, J. J. et al. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. p. 845-854.

MANNA, S. K.; MUKHOPADHYAY, A.; AGGARWAL, B. B. Resveratrol Suppresses TNF-Induced Activation of Nuclear Transcription Factors NF- κ B, Activator Protein-1, and Apoptosis: Potential Role of Reactive Oxygen Intermediates and Lipid Peroxidation. **The Journal of Immunology**, Weinheim, v.164, n. 12, p.6509-6519, 2000.

MARTIN, A.; FREI, B. Both intracellular and extracellular Vitamin C inhibit atherogenic modification of LDL by human vascular endothelial cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v.17, n. 11, p. 1583-1590, 1997.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J.; LLORENTE-CORTÉS, V.; BADIMON, L. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas. **Revista Española de Cardiología**, Barcelona, v. 54, n. 2, p. 218-231, 2001.

MOGHADASIAN, M. H. Experimental atherosclerosis. A historical overview. **Life Sciences**, Elmsford, v.70, n. 8, p.855-865, 2002.

MOREL, D. W.; LLERA-MOYA, M.; FRIDAY, K. E. Treatment of Cholesterol-Fed Rabbits with Dietary Vitamins E and C Inhibits Lipoprotein Oxidation but Not Development of Atherosclerosis. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.124, n.11, p.2123-2130, 1994.

MORENO, C. S.; ESCRIG, J. A.; CALIXTO, F. S. Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. **Nutrition Research**, Tarrytown, v.20, n.7, p.941-953, 2000.

NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E. **The anatomy of the domestic animals**. Berlin: Verlag Paul Parey, 1981. v.3, p. 16.

OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; LOPES, R. M.; MORAES, G. H. K.; FERREIRA JUNIOR, D.B.; SILVA, R.R.; MAIA, J.R.S. Efeito de diferentes doses de rutina sobre lipídeos no soro de coelhos machos e fêmeas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v.36, n.4, p.213-215, 2004.

PARHAMI, F. F.; FANG, Z. F.; FOGELMAN, A. M.; ANDALIBI, A.; TERRITO, M. C.; BERLINER, J. B. MM-LDL induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cAMP. **The Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v.92, n.1, p. 471-478, 1993.

PEREZ, G.; PENA, A.; SALA, J.; ROSET, P.; MASIA, R.; MARRUGAT de La IGLESIA, J. Acute myocardial infarction case fatality, incidence and mortality rates in a population registry in Gerona, Spain, 1990-1992. **International Journal of Epidemiology**, Oxford, v.27, n. 4, p. 599-604, 1998.

PERVAIZ, S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. **The FASEB Journal - Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 17, n. 14, p.1975-1985, 2003.

PIVETA, M. **A receita do doutor Baco**. *Net*, São Paulo, jun. 2005.. Disponível em: <<http://www.pesquisa.fapesp.br/junho2005>>. Acesso em: 05 maio 2006.

PLUMB, D. C. **Veterinary drug handbook**. 4. ed. Ames: Iowa State Press, 2002. p.335-336.

PRITCHARD Jr., K. A.; TOTA, R. R.; LIN, J. H.; DANISHEFSKY, K. J.; KURILLA. B. A.; HOLLAND, J. A.; STEMERMAN, M. B. Native low density lipoprotein: endothelial cell recruitment of mononuclear cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v. 11, n. 8, p. 1175-1181, 1991.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G.; Structure- antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology Medicine**, New York, v. 20, n.7, p. 933-956. 1996.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, London, v. 362, n. 5, p. 801-808. 1993.

SAN JUAN, P. M. F. Componentes cardioprotectores del vino. In: CONGRESSO INTERNACIONAL ALIMENTACIÓN, NUTRICIÓN Y DIETÉTICA, 5., 2002, Madrid. Disponível em: <http://www.nutrition.org/publicaciones/revista_marzo_02/Vcongresso_publicaciones/Conferencias/vino.pdf>. Acesso em: 5 maio 2006.

SAUTTER, C. K.; DENARDIM, S.; ALVES, A. O.; MALMANN, C. A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil.

Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 25, n.3, p. 437-442, 2005.

SCHAEFER, E. J. Lipoprotein, nutrition, and heart disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.75, n. 9, p. 191-212, 2002.

SCHNEIDER, D. J.; RICCI, M. A.; TAATJES, D. J.; BAUMANN, P. Q.; REESE, J. C.; LEAVITT, B. J.; ABSHER, P. M.; SOBEL, B. E. Changes in arterial expression of fibrinolytic system proteins in atherogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v.17, n. 5, p. 3294-3301, 1997.

SCHWENKE, D. C.; CAREW, T. E. Quantification in vivo of increased LDL content and rate of LDL degradation in normal rabbit aorta occurring at sites susceptible to early atherosclerotic lesions. **Circulation Research**, Baltimore, v. 62, n.4, p.699-709, 1987.

SHAH, P. K.; FALK, E.; BADIMON, J. J.; FERNÁNDEZ-ORTIZ, A.; MAILHAC, A.; VILLAREAL-LEVY, G.; FALLON, J. T.; REGNSTROM, J.; FUSTER, V. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques: potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. **Circulation**, Baltimore, v.92, n.6 p.1565-1569, 1995.

SHANMUGANAYAGAM D. WARNER, T. F.; KRUEGER, C. G.; REED, J. D.; FOLTS, J. D. Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits. **Atherosclerosis**, Limerick, v.190, n. 9, p. 135–142, 2006.

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? **Clinical Biochemistry**, Toronto, v.30, n.2, p. 91-113. 1997.

SOUZA et al. Consenso brasileiro sobre dislipidemias detecção - avaliação - tratamento. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, vol. 67, n.2, p. 113-128. 1996.

STARY H. C. CHAIR, A.; CHANDLER, B.; GLAGOV, S.; GUYTON, J. R.; INSULL, W.; ROSENFELD, M. E.; SCHAFFER, S. A.; SCHWARTZ, C. J.; WAGNER, W. D. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v.14, n.5, p.840-856, 1994.

THRALL, M. A. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. São Paulo: Roca, 2007. p. 433-447.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; NETO, A. G. F. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. 331 p.

WAKABAYASHI Y. Effect of Red Wine Consumption on Low-Density Lipoprotein Oxidation and Atherosclerosis in Aorta and Coronary Artery in Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, vol. 46, n. 11, p. 4724-4730, 1999.

VANE, J. R.; ANGGARD, E. E.; BOTTING, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 323, n. 1, p. 27-36, 1990.

VOGEL, R. A. Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review. **Clinical Cardiology**, Mahwah, v.20, n.5, p. 426-432, 1997.

WALEE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M. H.; OATIS, J. E.; WALLE, U. K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, Baltimore, v. 32, n.12, p. 1377-1382, 2004.

WANG, Z.; Effect of resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. **Chinese Medical Journal**, Peking, v. 115, n.3, p. 378-380, 2002.

WANG, Z.; ZOU, J.; CAO, K.; HSIEH, T. C.; HUANG, Y.; WU, J. M. Dealcoholized red wine containing know amounts of resveratrol supresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 16, n.4, p. 533-540, 2005.

WUNG, B. S.; HSU, M. C, WU, C. C.; HSIEH, C. W. Resveratrol suppresses IL-6-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells: effects on the inhibition of STAT3 phosphorylaton. **Life Sciences**, England, v. 12, n.4, p.389-397, 2005.

ZHAO, S. P., LIU, L.; GAO, M.; ZHOU, Q. C.; LI, Y. L.; XIA, B. Impairment of endothelial function after a hight-fat meal in patients with coronary artery disease. **Coronary Artery Disease**, London, v.12, n. 7, p.561-565, 2001.

ZICKER, S. C.; FORD, R. B.; NELSON, R. W.; KIRK, C. A. Transtornos endócrinos y de los lípidos In: HAND M.; THATCHER, C.; REMILLARD, R. **Nutrición clínica em pequenos animais**. 4. ed. Colômbia: Inter-Médica, 2000. p. 11016-1029.

ZOU, J. G.; WANG, Z. R.; HUANG, Y. Z. CAO, K. J.; WU, J. M. Effect of red wine and wine polyphenol on endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 11, n.3, p.317-320, 2003.