

INFLUÊNCIA DO SUCO DE UVA (*Vitis labrusca*) NA ATEROSCLEROSE DE CAMUNDONGOS HIPERLIPIDÊMICOS

Janaina da SILVA¹; Jaqueline da SILVA²; Fernanda C. R. DIAS¹; Verônica A. SIMAN¹; Eduardo M. DAMASCENO¹; Ramon G. T. M. SILVA²; Raphael A. P. DIAS²; Francisco H. S. LIMA²; Denis B. SILVA²; Ricardo M. COSTA²; Generci D. LOPES²; Paulo S. SOUZA²; José A. D. GARCIA³

RESUMO

Aterosclerose é uma doença inflamatória crônica caracterizada pelo acúmulo de lipídeos no espaço subendotelial da íntima dos vasos sanguíneos, acúmulo de células inflamatórias e elementos fibrosos. A administração de suco de uva por 60 dias em camundongos hiperlipidêmicos resultou em menor área imunorreativa para CD40L na aorta e menor área da placa de ateroma. O suco de uva apresenta um tratamento/prevenção de baixo custo para esta doença.

INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma doença auto imune (ROSS, 1999), inflamatória crônica de origem multifatorial, que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre, sendo caracterizada pelo acúmulo de lipídeos no espaço subendotelial da íntima, acúmulo de células inflamatórias e elementos fibrosos (SPOSITO, 2007).

Laurinavicius e Santos (2008) concluem em seu trabalho que as estatinas, como a sinvastatina, reduzem o risco de doenças cardiovasculares; entretanto, devido aos efeitos colaterais, ao alto custo dos medicamentos e a perspectiva de

¹ Universidade Federal de Viçosa. Viçosa/MG. Email: janaina.silva2@ufv.br; fernandaribeiro.dias@hotmail.com; vsiman.bio@gmail.com; edumdamasceno@hotmail.com

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Câmpus Muzambinho. Muzambinho/MG. Email: Jaqueline.silva@ifsuldeminas.edu.br; ramon.silva@ifsuldeminas.edu.br; raphael.dias@ifsuldeminas.edu.br; Francisco.lima@ifsuldeminas.edu.br; denis.silva@ifsuldeminas.edu.br; ricardo.costa@ifsuldeminas.edu.br; generci.lopes@ifsuldeminas.edu.br; paulo.souza@ifsuldeminas.edu.br

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Câmpus Machado. Machado/MG. Email: jadiasgarcia@gmail.com

uso prolongado, os pacientes têm recorrido a tratamentos alternativos para o controle da aterosclerose (GARCIA et al., 2008).

Folts (2002) verificou em seu estudo com 15 pacientes que os flavonoides presentes no suco de uva roxa e no vinho tinto inibiram a iniciação da aterosclerose, sugerindo que quantidades moderadas diárias do suco ou do vinho reduzem o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

O objetivo do presente trabalho foi analisar o efeito do suco de uva (*Vitis labrusca*) na aterosclerose em camundongos LDLR^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se camundongos homocigotos para a ausência do gene do receptor de LDL (LDLR^{-/-}) gerados no *background* C57BL6, machos, com três meses de idade, pesando 22 ± 2 g. Foi feito controle de temperatura e controle de 12h no ciclo claro/escuro. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais (n=10), assim constituídos:

- Grupo 1 (HL) - camundongos LDLR^{-/-} que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura total e 1,25% de colesterol, 0,5% de ácido fólico por 75 dias;

- Grupo 2 (HLU) - camundongos LDLR^{-/-} que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura total e 1,25% de colesterol, 0,5% de ácido fólico e tratamento com suco de uva durante 75 dias, na dose de 2g/kg de peso corporal, administrada por gavagem, uma vez ao dia;

- Grupo 3 (HLS) - camundongos LDLR^{-/-} que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura total e 1,25% de colesterol, 0,5% ácido fólico e tratamento com sinvastatina, na dose de 20mg/kg de peso corporal, administrada por gavagem, uma vez ao dia.

Todos os animais foram alimentados com as respectivas dietas e receberam água *ad libitum*.

Depois de 60 dias de experimento, os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal (ip) utilizando-se Xilazina/Ketamina (Bayer AS e Parke-Davis®, respectivamente) na concentração de 6-40 mg/Kg. As artérias foram fixadas em formalina 10% por 24 horas e incluídas em parafina para cortes histológicos de 4 µm

de espessura. Os cortes histológicos foram depositados em lâminas histológicas, coradas com hematoxilina/eosina e picrossírius red. As medidas das áreas luminal, média e íntima foram realizadas pelo software LGMC-image, versão 1.0. Na avaliação imunohistoquímica, cortes histológicos da aorta foram tratados com 3% de peróxido de hidrogênio para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Sítios não específicos foram bloqueados com 2% de leite desnatado em PBS diluída 10 mM (solução salina tamponada com fosfato), pH 7,4. As lâminas foram incubadas durante 12 horas com anticorpo policlonal de coelho anti-CD40L (Santa Cruz® 01:50) numa câmara úmida. Após a incubação com o anticorpo primário, a incubação foi realizada com o anticorpo secundário biotinilado (kit DAKO® LSAB +), durante uma hora a 37°C. Para destacar as áreas imunorreativas, as secções foram incubadas com o conjugado peroxidase de complexo (Dako ® LSAB +) durante 45 minutos a 37°C, e colocadas numa solução de cromogênio (50mg de DAB em 50mL de PBS com 3mL de 10% peróxido de hidrogênio) durante três minutos. Após contracoloração com hematoxilina de Harris (Sigma ®) durante 25 segundos, as lâminas foram montadas e analisadas por microscopia de luz. Fotomicrografias foram analisadas pelo software LGMC-image, versão 1.0, e os percentuais das frações da área imunorreativa da aorta ao CD40L foram adquiridos (ARMSTRONG et al., 1998). Para as análises estatísticas utilizou-se ANOVA seguida do teste Tukey (GARCIA, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta a área imunorreativa para CD40L na parede da aorta de animais dos três grupos experimentais. É possível observar na análise morfológica que os animais tratados com suco de uva apresentaram uma redução no desenvolvimento de um processo de inflamação cardiovascular, caracterizado por uma menor extensão da marcação para CD40L, impedindo/reduzindo a formação de placa de ateroma. Estatisticamente, o grupo 2 apresentou uma menor área imunorreativa do CD40L na aorta quando se comparado com o grupo 1, respectivamente $8,8 \pm 0,8\%$ e $4,4 \pm 1\%$ (Tabela 1). Porém, melhores resultados são observados no grupo 3 quando se comparado com o grupo 2.

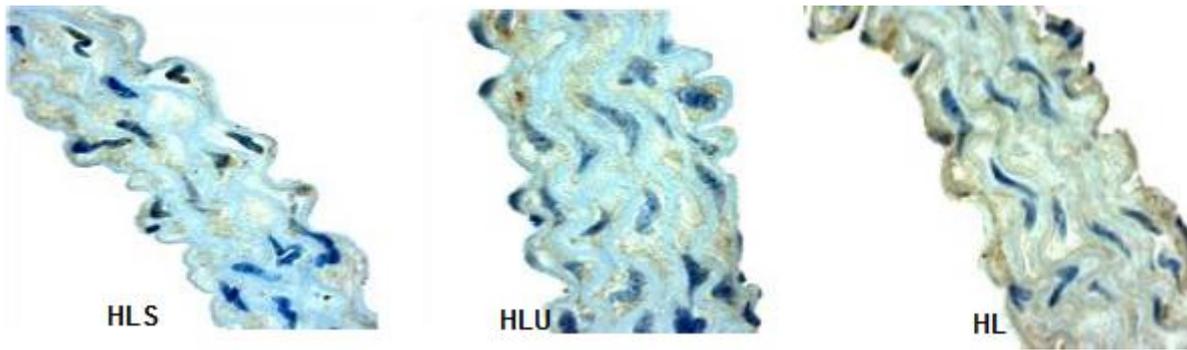


FIGURA 1: Área imunorreativa para CD40L na parede da aorta de camundongos hiperlipidêmicos com diferentes tratamentos quando a dieta.

A Figura 2 apresenta a área da placa de ateroma na aorta e área imunorreativa para CD40L na valva aórtica. Na análise morfológica da aorta, verificou-se que o suco de uva administrado no grupo 2 impediu o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, evitando o aumento da área da lesão em relação ao grupo 1. Estatisticamente, a área da placa de ateroma no grupo 2 apresentou significativamente menor quando comparada com a do grupo 1, $5837 \pm 1302 \mu\text{m}^2$ e $1839 \pm 357 \mu\text{m}^2$, respectivamente (Tabela 1).

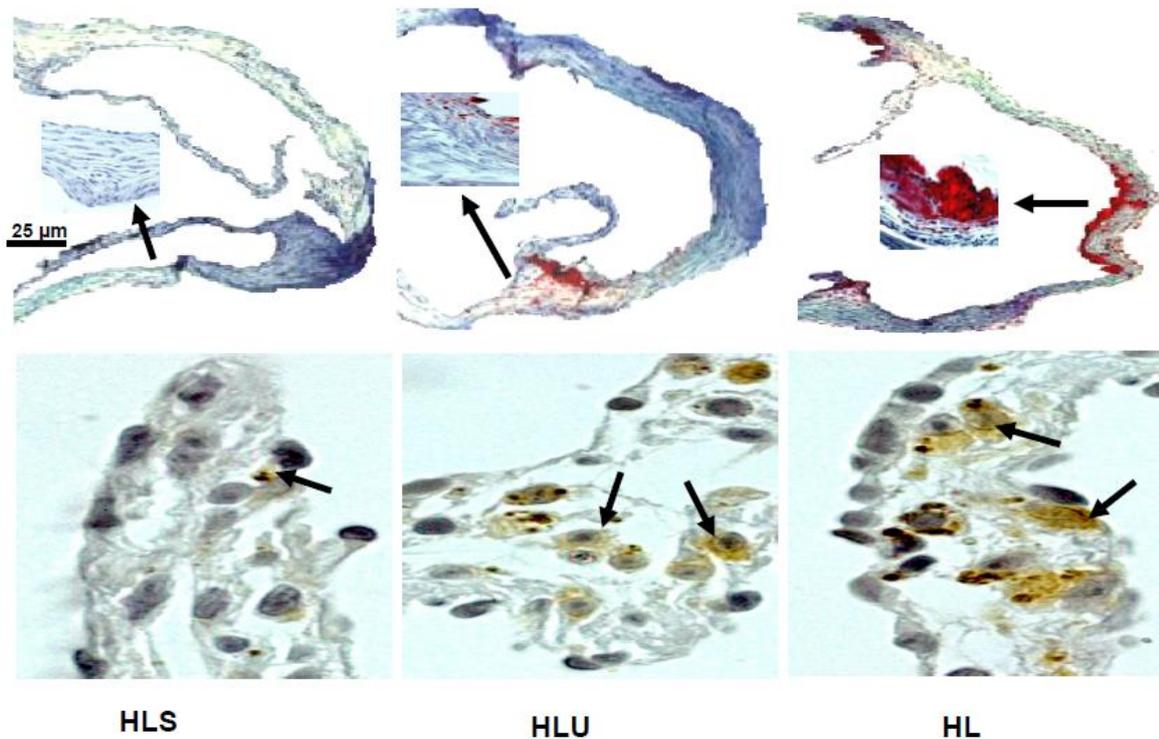


FIGURA 2: Área da placa de ateroma na aorta e área imunorreativa para CD40L na valva aórtica de camundongos hiperlipidêmicos com diferentes tratamentos quando a dieta.

Foi visto prevenção no processo inflamatório na valva aórtica (Figura 2), em que as aortas do grupo 2 exibiram uma área imunorreativa menor para CD40L quando comparado com grupo 1. Nota-se que o suco de uva apresentou efeito positivo na prevenção de aterosclerose, porém, a sinvastatina apresentou melhores resultados.

TABELA 1 - Comparação da área imunorreativa para CD40L na aorta e área da placa de ateroma na aorta entre camundongos dos grupos HL, HLU e HLS.

GRUPOS	HL	HLU	HLS
Camundongos (N)	10	10	10
Área imunorreativa do CD40L na aorta (%)	8,8±0,8 ^a	4,4±1 ^b	1,1±1 ^c
Área da placa de ateroma (µm ²)	5837±1302 ^a	1839±357 ^b	255,1±65 ^c

CONCLUSÕES

A utilização do suco de uva (*Vitis labrusca*) nesse modelo animal representa um tratamento e/ou uma prevenção alternativa de baixo custo para a aterosclerose que pode ser administrado juntamente com a sinvastatina.

REFERÊNCIAS

ARMSTRONG AT, BINKLEY PF, BAKER PB, et al. Quantitative investigation of cardiomyocyte hypertrophy and myocardial fibrosis over 6 years after cardiac transplantation. **J Am Coll Cardiol.** v. 32 p.704-710. 1998.

FOLTS, J.D. Potential health benefits from the flavonoids in grape products on vascular disease. **Advances in Experimental Medicine and biology.** v. 505 p. 95-111. 2002.

GARCIA, et al. S-Nitroso-N-Acetylcysteine (SNAC) Prevents Myocardial Alterations in Hypercholesterolemic LDL Receptor Knockout Mice by Antiinflammatory Action. **J Cardiovasc Pharmacoltm,** v. 51, n. 01, p. 78-85. 2008.

LAURINAVICIUS, A. G.; SANTOS, R. D. Dyslipidemia, statins and chronic renal failure. **Rev Bras Hipertens.** v. 15, n. 03 p. 156-161. 2008.

ROSS, S. Atherosclerosis – an inflammatory disease. **N Engl J Med.** v. 340 p. 115-26. 1999.

SPOSITO, A. C. et al. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 88 p. 2-19. 2007.