

1 **Morfometria do Arco Aórtico de Coelhos com Ateroma Induzido Tratados com**
2 **Resveratrol como Modelo Experimental na Prevenção da Aterosclerose.**

3

4 **Morphometry of Aortic Arch of Rabbits with Induced Atheroma Treated with**
5 **Resveratrol as Experimental Model for the Prevention of Atherosclerosis**

6 **M. CASTRO*, M. R. PACHECO, M. R. F. MACHADO**

7 Departamento de Morfologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP,
8 Campus de Jaboticabal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900,
9 Jaboticabal, São Paulo, Brasil: Tel: 16 32092654; fax: 16 32035150; e-mail:
10 castrocati@yahoo.com.br, rpacheco@fcav.unesp.br.

11

12 **RESUMO:** Aterosclerose é um condição inflamatória fibro-proliferativa crônica associada à
13 produção de espécies oxidantes. O composto fenólico resveratrol encontrado principalmente
14 na uva e no vinho tinto, parece ter atividades cardioprotetoras prevenindo a oxidação de
15 lipoproteínas de baixa densidade. Neste estudo investigou-se o efeito do resveratrol na
16 prevenção da ateromatose induzida, por meio de estudos morfométricos das túnicas íntima,
17 média e adventícia do arco aórtico. Para tanto, foram utilizados 20 coelhos divididos em
18 quatro grupos os quais receberam as seguintes dietas durante 60 dias: grupo controle (CT)
19 ração normal; grupo resveratrol (R) ração normal e resveratrol na dose de 3 mg/Kg/dia;
20 grupo colesterol (CL) ração acrescida de 1,5% de colesterol; grupo colesterol mais resveratrol
21 (CR) ração acrescida de 1,5% de colesterol e administração simultânea de resveratrol na dose
22 de 3mg/Kg/dia. O estudo morfométrico revelou maior espessamento da túnica íntima no
23 grupo CL, espessamento da túnica média para os grupos CL e CR, porém, sem diferença entre
24 eles, e, quando analisado espessura da túnica adventícia, o grupo CL diferiu dos grupos CT e
25 R porém, não diferiu do grupo CR. Pelos resultados obtidos neste estudo através de análise

26 morfométrica, segere-se que o resveratrol atua como agente preventivo no desenvolvimento
27 de lesões ateroscleróticas.

28 **Palavras-chave:** Antioxidante. Aterosclerose. Coelho. Morfometria. Resveratrol

29

30 **SUMMARY:** Atherosclerosis is a chronic fiber-proliferative inflammatory condition
31 associated with the production of oxidant species. The phenolic compound resveratrol, found
32 mainly in grapes and red wine, seems to have cardioprotective activity by preventing the
33 oxidation of low-density lipoproteins. In this study we investigated the effect of resveratrol in
34 the prevention of induced atheromatosis, by morphometric studies of tunica intima, media and
35 adventitia of the aortic arch. Thus we used 20 rabbits divided into four groups which received
36 the following diets for 60 days: control group (CT) normal ration; resveratrol group (R)
37 normal ration and resveratrol at a dose of 3 mg/kg/day; cholesterol group (CL) 1.5% of
38 cholesterol added to the ration; group cholesterol plus resveratrol (CR) 1.5% of cholesterol
39 added to the ration and simultaneous administration of resveratrol at a dose of 3 mg/kg/day.

40 The morphometric study showed greater thickening of tunica intima in CL group, thickening
41 of tunica media in CL and CR groups but without differences between them, and when
42 analyzing the thickness of tunica adventitia, CL group differed from CT and R groups but did
43 not differ from CR group. The results obtained in this study using morphometric analysis,
44 suggest that resveratrol acts as a preventive agent in the development of atherosclerotic
45 lesions.

46 **Key words:** Antioxidants. Atherosclerosis. Rabbit. Morphometry. Resveratrol

47

48 **INTRODUÇÃO:**

49

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

57 A aterosclerose é a condição patológica que antecede a maior parte dos episódios
58 cardiovasculares, nomeados infartos do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais (COTRAN
59 & SCHOEN, 2000).

60 As placas ateroscleróticas são constituídas principalmente por células, incluindo
61 células musculares lisas, macrófagos e outros leucócitos; matriz extracelular do tecido
62 conjuntivo, incluindo colágeno, fibras elásticas e proteoglicanas e depósitos lipídicos
63 intracelulares e extracelulares. Os ateromas típicos contêm uma quantidade relativamente
64 abundante de lipídios invadindo as túnicas íntima, média e em lesões avançadas a adventícia
65 de artérias de médio e grande calibre, particularmente aquelas localizadas em áreas de alta
66 pressão sanguínea. O desenvolvimento das lesões é afetado por vários fatores sistêmicos,
67 dentre eles podemos citar alguns como a hiperlipidemia, hipertensão arterial, obesidade e
68 sedentarismo, diabetes, fatores hemodinâmicos, o tabagismo entre outros (COTRAN &
69 SCHOEN, 2000).

70 Resveratrol é um antioxidante utilizado amplamente na dieta do Mediterrâneo que tem
71 atraído considerável atenção como agente terapêutico.

72 O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do resveratrol como agente terapêutico na
73 prevenção das lesões ateroscleróticas induzidas em coelhos, por meio de estudo
74 morfométrico, das túnicas íntima, média e adventícia na região do arco aórtico. O propósito

75 deste estudo foi disponibilizar informações a profissionais da área da saúde Humana e
76 Veterinária, já que algumas raças de cães e gatos são susceptíveis à hipercolesterolemia e
77 hipertrigliceridemia primária podendo consequentemente desenvolver a aterosclerose.

78

79

MATERIAL E MÉTODOS:

80

81 Resveratrol e colesterol foram adquiridos respectivamente da Pharma Nostra (Rio de
82 Janeiro, RJ) e Vetec (Duque de Caxias, RJ). A ração utilizada para alimentação dos animais
83 foi a de manutenção para coelhos adultos, Purina (Paulínia, SP) e a adição de 1,5% de
84 colesterol no alimento foi realizada no Departamento de Nutrição Animal. Os coelhos foram
85 mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV, Campus
86 de Jaboticabal, durante um período de 60 dias. O experimento foi realizado de acordo com
87 aprovação da Comissão Ética da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal –
88 UNESP.

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

Manutenção dos animais: Para este estudo foram utilizados vinte coelhos machos adultos, com peso médio de 2,5 Kg, hípidos, da raça Nova Zelândia Branco, durante o período de 15 de março a 15 de maio de 2007. Os animais foram previamente alimentados com ração normal durante 1 semana. Estes animais foram então divididos em quatro grupos experimentais formados por cinco animais cada recebendo a seguinte alimentação: grupo controle branco (CT) recebeu ração para manutenção; grupo (R) ração para manutenção e administração simultânea de resveratrol (3 mg/Kg/dia) via oral; grupo (CL) 1,5% de colesterol acrescido na ração de manutenção; grupo (CR) 1,5% de colesterol acrescido na ração de manutenção e administração simultânea de resveratrol (3mg/Kg/dia) cápsulas por via oral. Para o preparo da dieta hipercolesterolêmica adicionou-se colesterol em pó à ração de manutenção, previamente moída, que após este procedimento foi misturada, peletizada

100 novamente e mantida em ambiente refrigerado. A dose de resveratrol utilizada foi baseada em
101 prévios estudos realizados por WANG et al. (2005). Durante o experimento o fornecimento
102 de água foi *ad libitum* e a quantidade de ração para todos os animais foi de 100 g/dia.
103 Finalizado o período experimental, os animais foram desprovidos de alimento durante 18
104 horas, eutanasiados com pentobarbital sódico e o arco aórtico foi removido. Este segmento
105 arterial foi cuidadosamente lavado com solução salina e fixado em solução de Bouin durante
106 24 horas à temperatura ambiente. Após a visualização macroscópica das placas, o segmento
107 do arco aórtico foi processado rotineiramente para a inclusão em histosec. Posteriormente foi
108 realizado a microtomia semi-seriada, com cortes histológicos à espessura de 5µm, e intervalos
109 de 10 µm, onde então foram corados pelas técnicas do tricrômico de Masson e da
110 hematoxilina – eosina (TOLOSA et al., 2003) observados e fotomicrografados em um
111 fotomicroscópio da Leica DM 5000 B para análise morfológica. Este estudo foi realizado
112 avaliando-se, em micrômetros, as espessuras das túnica íntima, média e adventícia das áreas
113 ateroscleróticas do segmento do arco aórtico. Para cada animal foram confeccionadas cinco
114 lâminas com cinco cortes histológicos.

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

118

119

RESULTADOS:

120

121 A análise estatística dos resultados referentes aos valores médios \pm desvio padrão da
122 espessura das túnica do segmento do arco aórtico obtidos neste estudo, estão expostos na
123 figura 1.

124

125 Animais alimentados com dieta de manutenção não apresentaram lesões
126 ateroscleróticas, enquanto que estas lesões foram evidentes nos grupos CR e CL. A
127 severidade das lesões foi significativamente reduzida naqueles animais do grupo que recebeu
128 resveratrol (CR) baseado nos resultados das medidas em micrômetros da túnica íntima, com
129 valores de $188,35 \pm 95,36$ para o grupo CL e valores de $64,26 \pm 9,19$ para o grupo CR, e da
130 espessura total da parede com valores de $863,47 \pm 105,56$ e $681,60 \pm 94,27$ para o grupo CL e
131 CR respectivamente. Nos animais do grupo CR observou-se um padrão de lesão mais
132 organizado com menor número de camadas de macrófagos espumosos e gotículas lipídicas
133 extracelulares na túnica íntima.

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

136 Os valores da túnica média em μm evidenciaram que houve um maior espessamento
137 da túnica média para os animais dos grupos CL e CR quando comparados aos grupos CT e R,
138 que foram normais.

139 Na análise dos valores da túnica adventícia, verificou-se diferença entre os grupos
140 estudados, o grupo CL não diferiu do grupo CR, porém os grupos CL e CR diferiram
141 significativamente ($p < 0,05$) dos grupos CT e R.

142 Os valores de espessura total, medidas das túnicas íntima, média e adventícia
143 mostraram que o grupo CL diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre os grupos CT , R e CR.

144

145

DISCUSSÃO:

146

147 Na análise morfométrica dos resultados deste estudo, verificou-se que a espessura da
148 túnica íntima dos animais do grupo CR foi semelhante aquela dos grupos CT e R, mostrando
149 que houve uma significativa diminuição da infiltração por macrófagos espumosos quando

150 comparado aos animais do grupo CL o que concordou com as evidências de WANG et al.
151 (2005) quando comprovaram o efeito anti-aterogênico do resveratrol. Já MOREL et al. (1994)
152 em trabalhos semelhantes utilizando Vitamina E e C não observaram diminuição no
153 desenvolvimento das lesões ateroscleróticas.

154 Entretanto, houve um maior espessamento da túnica média para os animais dos grupos
155 CL e CR quando comparados aos grupos CT e R, que foram normais. Este resultado para a
156 túnica media diferiu daqueles encontrados por WANG et al. (2005) onde não foi constatada
157 diferença para os grupos hipercolesterolêmicos e controle.

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

162 Pode-se imaginar que o resveratrol diminuiu o desenvolvimento das lesões
163 ateroscleróticas com respaldo em alguns relatos da literatura sobre este composto polifenólico
164 onde foi observado um amplo aspecto de efeitos biológicos, tais como propriedades
165 antioxidantes, antiplaquetárias, protetoras endoteliais e sua atividade na proliferação de CML
166 (FRÉMONT, 2000). Estudos feitos por WAKABAYASHI (1999) comprovaram que os
167 polifenólicos do vinho tinto foram capazes de reduzir a oxidação plasmática de LDL, também
168 FREMÓN et al. (1999) em estudos *in-vitro* utilizando alguns compostos antioxidantes,
169 observaram que aqueles do vinho tinto mostraram notável inibição da peroxidação de LDL
170 (80-90%) enquanto o extrato cítrico e o extrato de soja demonstraram 70% e 55% de inibição
171 respectivamente. Os antioxidantes presentes no vinho tinto, segundo ZHAO et al. (2001)
172 foram capazes de inibir o estresse oxidativo endotelial causado após uma refeição rica em
173 gordura, principalmente em pacientes com doença coronária. MARTIN & FREI (1997)
174 pesquisaram a atuação da vitamina C na oxidação da LDL e evidenciaram que esta atuou

175 prevenindo as modificações oxidativas por depurar radicais livres e outras espécies reativas
176 que podem interagir com o LDL. Também MORENO et al. (2000) descreveram por meio de
177 um estudo in-vitro, que o efeito antioxidante proporcionado pelos compostos fenólicos foi
178 maior do que aquele promovido pelas vitaminas C e E. ASCIAK et al. (1995) ao estudarem in
179 vitro o efeito do trans-resveratrol, alguns compostos fenólicos derivados do vinho e alguns
180 antioxidantes, sob a agregação plaquetária e a síntese de eicosanóides em células humanas,
181 observaram um bloqueio na agregação plaquetária e uma redução na síntese de eicosanóides,
182 o que segundo estes autores, contribuíram para um efeito cardioprotetor do resveratrol,
183 principalmente na aterosclerose e em pacientes com doença coronária. Também, outra
184 explicação para a atividade cardioprotetora do resveratrol seria pela melhora da função
185 endotelial, conforme observado por ZOU et al. (2003) em seus trabalhos onde os níveis
186 plasmáticos de endotelina tiveram uma diminuição e os níveis de oxido nítrico aumentaram
187 promovendo assim uma maior vasodilatação. Outra observação que poderia explicar o efeito
188 do resveratrol na aterosclerose, deve-se aos seus efeitos na migração e proliferação de células
189 musculares lisas. Assim, em estudos in vitro com células musculares retiradas da aorta de
190 bovinos, verificou-se que com o uso do resveratrol, em uma dose dependente, houve uma
191 diminuição na proliferação das mesmas; já em outro estudo utilizando células de ratos,
192 também houve uma diminuição da hiperplasia intimal na parede vascular em lesões
193 provocadas (ARAIM et al., 2002; GU et al., 2006).

194 Ressalta-se ainda o efeito benéfico do resveratrol na preservação da integridade do
195 endotélio, pois observa-se em alguns trabalhos seu efeito inibidor na expressão de VCAM-1,
196 ICAM-1 e no fator de transcrição NF- κ B, responsável este último, por efeitos moduladores
197 pró-inflamatórios (FERRERO et al., 1998; MANNA et al., 2000; Wung et al., 2005).

198

199

CONCLUSÃO:

200 Conclui-se por meio deste estudo morfométrico que o resveratrol atua como agente
201 preventivo no desenvolvimento da lesão aterosclerótica, e que uma suplementação dietética
202 com resveratrol para humanos e espécies animais susceptíveis à aterosclerose mostra ser uma
203 possível alternativa para ajudar na prevenção do desenvolvimento desta enfermidade.

204

205

REFERÊNCIAS:

206

207 Araim, O. et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation with red wine and red
208 wine polyphenols. **Journal of Vascular Surgery**, St Louis, v. 35, n.6, p.1226-1232, 2002.

209

210 Asciak, C. R., et al. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human
211 platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary
212 heart disease. **International Journal of Clinical Chemistry**, Amsterdam, v.235, n. 10, p.
213 207-219, 1995.

214 Cotran, R. S. et al. **Patologia estrutural e funcional**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2000.

215

216 Ferrero, M. E. et al. Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to
217 endothelium. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.68, n. 7, p. 1208-
218 1214, 1998.

219

220 Fremón, L., et al. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols
221 related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. **Life Sciences**, Basel, v. 64, n. 6, p.
222 2511-2521, 1999.

223

224 Fremont, L, 2000: Minireview Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, Elmsford, v.
225 66, n. 8, p. 663-673, 2000.

226

227 Gu, J., et al. Effects of resveratrol on endothelial progenitor cells and their contributions to
228 reendothelialization in intima-injured rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**,
229 Hagerstown, United States, v.47, n.5, p.711-721, 2006.

230

231 Manna, S. K., et al. Resveratrol Suppresses TNF-Induced Activation of Nuclear Transcription
232 Factors NF- κ B, Activator Protein-1, and Apoptosis: Potential Role of Reactive Oxygen
233 Intermediates and Lipid Peroxidation. **The Journal of Immunology**, Weinheim, v.164, n. 12,
234 p.6509-6519, 2000.

235

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

239

240 Morel, D. W., et al. Treatment of Cholesterol-Fed Rabbits with Dietary Vitamins E and C
241 Inhibits Lipoprotein Oxidation but Not Development of Atherosclerosis. **Journal of**
242 **Nutrition**, Philadelphia, v.124, n.11, p.2123-2130, 1994.

243

244 Moreno, C. S., et al. Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the
245 antioxidant activity of dietary polyphenols. **Nutrition Research**, Tarrytown, v.20, n.7, p.941-
246 953, 2000.

247

248 Perez, G., et al. Acute myocardial infarction case fatality, incidence and mortality rates in a
249 population registry in Gerona, Spain, 1990-1992. **International Journal of Epidemiology**,
250 Oxford, v.27, n. 4, p. 599-604, 1998.

251

252 Tolosa, E. M. C. et al. **Manual de técnicas para histología normal e patológica**. São Paulo:
253 Manole, 2003

254

255 Wakabayashi Y. Effect of Red Wine Consumption on Low-Density Lipoprotein Oxidation
256 and Atherosclerosis in Aorta and Coronary Artery in Watanabe Heritable Hyperlipidemic
257 Rabbits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, vol. 46, n. 11, p. 4724-4730,
258 1999.

259

260 Wang, Z., et al. Dealcoholized red wine containing know amounts of resveratrol supresses
261 atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels.
262 **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 16, n.4, p. 533-540, 2005.

263

264 Wung, B. S., et al. Resveratrol suppresses IL-6-induced ICAM-1 gene expression in
265 endothelial cells: effects on the inhibition of STAT3 phosphorylation. **Life Sciences**, England,
266 v. 12, n.4, p.389-397, 2005.

267

268 Zhao, S. P., et al. Impairment of endothelial function after a high-fat meal in patients with
269 coronary artery disease. **Coronary Artery Disease**, London, v.12, n. 7, p.561-565, 2001.

270

271 Figura 1 - Valores médios totais da espessura da parede (íntima +média+adventícia),
272 (\pm desvios padrão) de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT),
273 resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR).

Grupo	Média	Desvio Padrão
CT	490,47c	52,67
R	498,32c	30,75
CL	863,47a	105,56
CR	681,60b	94,27

274 Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de

275 Tukey.

276