

MORFOMETRIA DO ARCO AÓRTICO DE COELHOS COM ATEROMA INDUZIDO TRATADOS COM RESVERATROL COMO MODELO EXPERIMENTAL NA PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE

MORPHOMETRY OF AORTIC ARCH OF RABBITS WITH INDUCED ATHEROMA TREATED WITH RESVERATROL AS EXPERIMENTAL MODEL FOR THE PREVENTION OF ATHEROSCLEROSIS

M. CASTRO^{1*}, M. R. PACHECO¹, M. R. F. MACHADO¹

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 morfométricos das túnicas íntima, média e adventícia do arco aórtico. 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 colesterol mais resveratrol (CR) ração acrescida de 1,5% de colesterol e administração simultânea de resveratrol na dose de 3 mg/kg/dia. O estudo morfométrico revelou maior espessamento da túnica íntima no grupo CL, espessamento da túnica média para os grupos CL e CR, porém, sem diferença entre eles, e, quando analisado espessura da túnica adventícia, o grupo CL diferiu dos grupos CT e R, porém, não diferiu do grupo CR. Pelos resultados obtidos neste estudo através de análise morfométrica, segere-se que o resveratrol atua como agente preventivo no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas.

PALAVRAS-CHAVE: Antioxidante. Aterosclerose. Coelho. Morfometria. Resveratrol.

SUMMARY

Atherosclerosis is a chronic fiber-proliferative inflammatory condition associated with the production of oxidant species. The phenolic compound resveratrol, found mainly in grapes and red wine, seems to have cardioprotective activity by preventing the oxidation of low-density lipoproteins. In this study we investigated the effect of resveratrol in the prevention of induced atheromatosis, by morphometric studies of tunica intima, media and adventitia of the aortic arch. Thus we used 20 rabbits divided into four groups which received the following diets for 60 days: control group (CT) normal ration; resveratrol group (R) normal ration and resveratrol at a dose of 3 mg/kg/day; cholesterol group (CL) 1.5% of cholesterol added to the ration; group cholesterol plus resveratrol (CR) 1.5% of cholesterol added to the ration and simultaneous administration of resveratrol at a dose of 3 mg/kg/day. The morphometric study showed greater thickening of tunica intima in CL group, thickening of tunica media in CL and CR groups but without differences between them, and when analyzing the thickness of tunica adventitia, CL group differed from CT and R groups but did not differ from CR group. The results obtained in this study using morphometric analysis, suggest that resveratrol acts as a preventive agent in the development of atherosclerotic lesions.

KEY-WORDS: Antioxidants. Atherosclerosis. Rabbit. Morphometry. Resveratrol.

^{1*} Departamento de Morfologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil: Tel: 16 32092654; fax: 16 32035150; e-mail: castrocati@yahoo.com.br, rpacheco@fcav.unesp.br.

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, no 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).

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

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

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do resveratrol como agente terapêutico na prevenção das lesões ateroscleróticas induzidas em coelhos, por meio de estudo morfométrico, das túnica íntima, média e adventícia na região do arco aórtico. O propósito deste estudo foi disponibilizar informações a profissionais da área da saúde Humana e Veterinária, já que algumas raças de cães e gatos são susceptíveis à hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia primária podendo consequentemente desenvolver a aterosclerose.

MATERIAL E MÉTODOS

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

da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal – UNESP.

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 60 dias. Os animais foram previamente alimentados com ração durante 1 semana e foram, então, divididos em quatro grupos experimentais formados por cinco animais cada e 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 (3 mg/kg/dia) cápsulas por via oral. Para o preparo da dieta hipercolesterolemica adicionou-se colesterol em pó à ração de manutenção, previamente moída, que após este procedimento foi misturada, peletizada novamente e mantida em ambiente refrigerado durante todo o período experimental. A dose de resveratrol utilizada foi baseada em prévios estudos realizados por Wang et al. (2005). Durante o experimento o fornecimento de água foi *ad libitum* e a quantidade de ração para todos os animais foi de 100 g/dia.

Finalizado o período experimental, os animais foram desprovidos de alimento durante 18 horas, eutanasiados com pentobarbital sódico intra-venoso e o arco aórtico foi removido. O arco aórtico foi cuidadosamente lavado com solução salina e fixado em solução de Bouin durante 24 horas à temperatura ambiente com posterior processamento para inclusão em paraplast Posteriormente foi realizado a microtomia semi-seriada em micrótomo automático Leica – RM2155, com cortes histológicos à espessura de 5 µm, 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 análise morfométrica com o software *Leica Application Suite* (LAS) 2.5.1 R1. Este estudo foi realizado avaliando-se, em micrômetros, as espessuras das túnica íntima, média e adventícia das áreas ateroscleróticas do segmento do arco aórtico. Para cada animal foram confeccionadas cinco lâminas com cinco cortes histológicos.

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

RESULTADOS

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 tabelas 1, 2, 3 e 4.

Animais alimentados com dieta de manutenção não apresentaram lesões ateroscleróticas, enquanto que estas lesões foram evidentes nos grupos CR e CL. A

Tabela 1 - Valores médios totais da espessura da parede (íntima +média+adventícia), (\pm desvios padrão) de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), 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

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

Tabela 2 - Valores médios de espessura em μm da camada Íntima (\pm desvios padrão) de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR).

Grupo	Média	Desvio Padrão
CT	14,83b	1,51
R	11,60b	0,79
CL	188,35a	95,36
CR	64,26b	9,19

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

Tabela 3 - Valores médios da espessura em μm da camada Média (\pm desvios padrão) de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR).

Grupo	Média	Desvio Padrão
CT	333,76b	49,51
R	384,76ba	21,13
CL	472,10a	41,97
CR	443,91a	94,80

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

Tabela 4 - Valores médios da espessura em μm da camada Adventícia (\pm desvios padrão) de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (CT), resveratrol (R), colesterol (CL) e colesterol + resveratrol (CR).

Grupo	Média	Desvio Padrão
CT	141,88bc	22,93
R	101,95c	14,18
CL	203,00a	41,33
CR	173,41ba	7,16

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

severidade das lesões foi significativamente reduzida naqueles animais do grupo que recebeu resveratrol (CR) baseado nos resultados das medidas em micrômetros da túnica íntima, com 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 espessura total da parede com valores de $863,47 \pm 105,56$ e $681,60 \pm 94,27$ para o grupo CL e CR respectivamente. 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.

Os valores da túnica média em μm evidenciaram que 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.

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

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

DISCUSSÃO

Neste trabalho foi evidenciado o efeito do resveratrol como agente protetor na aterosclerose em coelhos hipercolesterolêmicos, conforme observado pela diminuição do espessamento da parede do arco aórtico. 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. A dose utilizada nos animais deste experimento (3 mg/kg) mostrou-se eficaz conforme resultados obtidos. Os animais alimentados com dieta de manutenção e resveratrol não apresentaram nenhum tipo de efeito adverso aparente, levando-nos a imaginar que o resveratrol, é tolerado por animais desta espécie.

Na análise morfométrica do arco aórtico, 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 na formação da placa aterosclerótica 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 em coelhos, não observaram diminuição no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas na aorta

Houve um maior espessamento da túnica média para os animais dos grupos CL e CR quando comparados aos grupos CT e R, os quais não apresentaram alteração (CT $333,76 \pm 49,51$; R $384,76 \pm 21,13$; CL $472,10 \pm 41,97$; CR $443,91 \pm 94,80 \mu\text{m}$). Este resultado para a túnica média diferiu daqueles encontrados por Wang et al. (2005), os quais não constataram diferença para os grupos

hipercolesterolêmicos e controle em relação à túnica média.

Na análise morfométrica da túnica adventícia verificou-se diferença entre os grupos estudados, acreditando-se que não tenha sido em consequência do estágio das lesões observadas pelo estudo morfométrico da túnica íntima do grupo CL e CR, podendo-se aventar a hipótese que houve uma interferência casual, considerando-se que as lesões encontradas foram classificadas como tipo III, ou seja, não avançadas. Nos animais que não possuíam placas nenhuma alteração foi observada. Pode-se imaginar que o resveratrol diminuiu o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas com respaldo em alguns relatos da literatura sobre este composto polifenólico, os quais descreveram um amplo aspecto de efeitos biológicos, tais como propriedades antioxidantes, antiplaquetárias, protetoras endoteliais e sua atividade na proliferação de células musculares lisas (FRÉMONT, 2000). Estudo feito por Wakabayashi (1999) comprovou que os polifenólicos do vinho tinto foram capazes de reduzir a oxidação plasmática de LDL. Também Fremón et al. (1999) em estudos *in-vitro* utilizando alguns compostos antioxidantes, observaram que aqueles 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.

Os antioxidantes presentes no vinho tinto, segundo Zhao et al. (2001) foram capazes de inibir o estresse oxidativo endotelial causado após uma refeição rica em gordura, principalmente em pacientes com doença coronária, o que em parte poderia explicar os dados encontrados para o grupo CR. 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 promovido pelas vitaminas C e E, fato este que nos motivou na escolha de tal composto antioxidante. 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.

O resveratrol comprovadamente melhora a 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 e atividade cardioprotetora. Araim et al., (2002) constataram o efeito do resveratrol em inibir o crescimento das células musculares lisas da aorta de bezerros.

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

CONCLUSÕES

Concluiu-se que o resveratrol atua como agente preventivo no desenvolvimento da lesão aterosclerótica em coelhos. Estudos em outras espécies, além da humana, são necessários para verificar a eficácia desse composto em relação as suas propriedades anti-aterogênicas para elucidação do mecanismo exato de sua ação. No entanto, pelos dados obtidos neste trabalho, acredita-se que uma suplementação dietética para humanos e animais, seja uma possível alternativa para prevenção do desenvolvimento da aterosclerose.

REFERÊNCIAS

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- WANG, Z.; ZOU, J.; CAO, K.; HSIEH, T. C.; HUANG, Y.; WU, J. M. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses 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 phosphorylation. **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 high-fat meal in patients with coronary artery disease. **Coronary Artery Disease**, London, v.12, n. 7, p.561-565, 2001.