

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E PSICOBIOLOGIA

Efeito do extrato da casca de uva *Vitis Vinífera* (GSE) na pressão arterial, no perfil lipídico e glicídico e no estresse oxidativo em ratos espontaneamente hipertensos.

Giselle França da Costa

Rio de Janeiro

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E PSICOBIOLOGIA

Efeito do extrato da casca de uva *Vitis Vinífera* (GSE) na pressão arterial, no perfil lipídico e glicídico e no estresse oxidativo em ratos espontaneamente hipertensos.

Dissertação apresentada ao Centro Biomédico da Universidade do Estado do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Mestre em Fisiologia e Fisiopatologia Clínica e Experimental

Rio de Janeiro

2008

Ficha catalográfica

Da Costa, Giselle França

Efeito do extrato da casca de uva *Vitis Vinífera* (GSE) na pressão arterial, no perfil lipídico e glicídico e no estresse oxidativo em ratos espontaneamente hipertensos.

Giselle França da Costa – Rio de Janeiro, 2008.

Tese (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia

Roberto Alcântara Gomes.

Orientador: Roberto Soares de Moura

1. Hipertensão Essencial. 2. Extrato de Casca de Uva. 3. Estresse oxidativo

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E PSICOBIOLOGIA

Efeito do extrato da casca de uva *Vitis Vinífera* (GSE) na pressão arterial, no perfil lipídico e glicídico e no estresse oxidativo em ratos espontaneamente hipertensos.

Giselle França da Costa

Orientador: Professor Dr. Roberto Soares de Moura

Co-orientadora: Professor Dr. Aníbal Sanchez Moura

Aprovada em ____ de _____ de 2008 pela banca examinadora:

Professor: _____

Professor: _____

Professor: _____

Rio de Janeiro

2008

Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.

(Dalai Lama)

Dedicatória

*À minha família e amigos por todo apoio, paciência, carinho, companheirismo e
amor.*

Agradecimentos

À Deus, por ter me dado a vida e permitir que eu continue nela. Por todo o aprendizado adquirido neste período, pela força e coragem. Agradeço por ter confiado em mim e me abençoado com tantas coisas boas nesta caminhada.

À minha mãe e irmão, por todo seu amor e dedicação. Agradeço por estarem ao meu lado me apoiando, não deixando que eu desistisse dos meus objetivos e nem que eu fraquejasse neste meu caminho.

Aos meus amigos que direta ou indiretamente contribuem para tornar realidade os meus sonhos. E por toda a amizade e dedicação.

Às minhas amigas Cristiane Aguiar, Dayane Ognibene, Michelle Teixeira, Fernanda Osso, Mariana Renovato e Annie Moreira pela amizade, apoio no início deste trajeto, por acreditarem em mim e no meu potencial, mesmo quando eu mesma não acreditava e pelo incentivo diário.

À minha família que sempre me apoiou e torce para que eu alcance meus objetivos.

Ao Prof. Dr. Roberto Soares de Moura pela confiança, dedicação e ensinamentos. Por seu apoio, carinho e compreensão nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura pela credibilidade confiada em mim e por permitir que esse mestrado acontecesse.

À toda equipe do laboratório de Farmacologia: Prof. Dr. Ângela Rezende, Lenize Carvalho, Andréa Emiliano, Mariana Costa, Lúcia Alves e Marcelo Vieira por todo apoio e pelos dias de descontração e confraternização. Em especial à Prof. Tania Tano pela atenção e revisão deste trabalho.

À Equipe do Laboratório de Fisiologia da Nutrição e Desenvolvimento: Prof. Dr. Érica Garcia, Mario Pereira, Alessandra Cordeiro e Paula Paraguassú.

Aos colegas e professores do curso de mestrado.

Aos estagiários Thaline, Viviane, Grazieli, Glazieli, Carlos pela colaboração neste período.

Às secretárias do CLINEX, Maria Amélia Souza e Eliane Soares pelo pronto atendimento nas inúmeras vezes que as requisitei.

Ao Prof. Dr. Egberto Moura pela dedicação ao curso de Pós-graduação CLINEX e por toda compreensão.

À todos os acima mencionados, agradeço o apoio dedicado nos momentos difíceis e por contribuírem, de alguma maneira, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Páginas
Lista de Figuras	xii
Lista de Abreviaturas	xv
Resumo	xvii
Abstract	xviii
1. Introdução	1
1.1 Estresse Oxidativo	8
1.1.1 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	10
1.1.2 Patogenia da Ação das ERO	12
1.1.3 Sistema de Defesa Antioxidante	13
1.2 Modelo Experimental de Hipertensão Essencial	15
1.3 Vinho Tinto e Benefícios Cardiovasculares	16
1.3.1 Mecanismos de Ação Cradioprotetora do Vinho Tinto	17
1.4 Extrato da Casca de Uva (Grape Skin Extract - GSE)	18
1.4.1 Características Gerais das Uvas	19
1.4.2 Características Gerais dos Polifenóis	21
2. Objetivo	24
2.1 Objetivos Específicos	24
3. Metodologia	25
3.1 Preparação do Extrato da Casca de Uva (GSE)	25
3.2 Protocolo Experimental e Modelo Animal	25
3.3 Aferição da Pressão Arterial	26

3.4 Análise do Peso Corporal	27
3.5 Análises Bioquímicas	27
3.5.1 Análise da Glicose Plasmática	27
3.5.2 Análise da Insulina Plasmática	28
3.5.3 Análise da Sensibilidade à Insulina	29
3.5.4 Análise dos Triglicerídeos Plasmáticos	29
3.5.5 Análise do Colesterol Total Plasmático	30
3.6 Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	30
3.7 Enzimas Antioxidantes	31
3.7.1 Superóxido Dismutase (SOD)	31
3.7.2 Catalase	32
3.8 Dosagem de Proteína	33
3.9 Análise Estatística	33
4. Resultados	34
4.1 Pressão Arterial	34
4.2 Peso Corporal	35
4.3 Glicemia	36
4.4 Insulinemia	37
4.5 Sensibilidade à Insulina	38
4.6 Triglicerídeos Plasmáticos	39
4.7 Colesterol Total Plasmático	40
4.8 Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	40
4.8.1 Plasma	41

4.8.2 Rim	42
4.8.3 Aorta	43
4.9 Enzimas Antioxidantes	43
4.9.1 Superóxido Dismutase (SOD)	44
4.9.1.1 Plasma	44
4.9.1.2 Rim	45
4.9.1.3 Aorta	46
4.9.2 Catalase	47
4.9.2.1 Plasma	47
4.9.2.2 Rim	48
5. Discussão	49
6. Conclusão	54
7. Referências Bibliográficas	55

Lista de Figuras e Tabelas

		Página
Figura 1	Estresse oxidativo vascular estimulado pela angiotensina II.	5
Figura 2	Ativação de NAD(P)H oxidase e conseqüências funcionais na HAS.	6
Tabela 1	Espécies reativas de oxigênio (ERO)	11
Tabela 2	Classificação das uvas na sistemática botânica	20
Figura 3	Estrutura química de alguns polifenóis	22
Figura 4	Esquema de evolução do experimento, do início (animais com 21 dias) ao final do tratamento com GSE (animais com 110 dias).	26
Figura 5	Efeito do tratamento com GSE na pressão arterial sistólica dos animais normotensos e hipertensos, à partir do 40º dia de tratamento com o extrato da casca de uva. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. $p < 0,001$ *SHR-C x Wistar-C; #SHR-C x SHR-GSE; ∞ SHR-C x Wistar-GSE; † SHR-GSE x Wistar-C; ‡ SHR-GSE x Wistar-GSE.	34
Figura 6	Efeito do tratamento com GSE na peso corporal total dos animais normotensos e hipertensos, dos 20 aos 110 dias de vida. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. * Wistar-C x SHR-C; Wistar-C x SHR-GSE; Wistar-GSE x SHR-C e Wistar-GSE x SHR-GSE, $p < 0,001$. # Wistar-C x SHR-C e Wistar-GSE x SHR-C, $p < 0,05$.	35
Figura 7	Efeito do tratamento com GSE na glicemia de jejum dos animais normotensos e hipertensos, com 110 dias de vida e após 90 dias de tratamento com o extrato da casca de uva. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6	36

- animais por grupo.
- Figura 8 Efeito do tratamento com GSE na insulinemia de jejum dos animais normotensos e hipertensos, com 110 dias de vida e após 90 dias de tratamento com o extrato da casca de uva. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. * $p < 0,05$. 37
- Figura 9 Efeito do tratamento com GSE na sensibilidade à insulina dos animais normotensos e hipertensos, com 110 dias de vida e após 90 dias de tratamento com o extrato da casca de uva. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. 38
- Figura 10 Efeito do tratamento com GSE sobre os níveis de triglicérides plasmáticos dos animais normotensos e hipertensos, com 110 dias de vida e após 90 dias de tratamento com o extrato da casca de uva. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. * $p < 0,05$. 39
- Figura 11 Efeito do tratamento com GSE sobre os níveis de colesterol plasmáticos dos animais normotensos e hipertensos, com 110 dias de vida e após 90 dias de tratamento com o extrato da casca de uva. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ e # $p < 0,001$. 40
- Figura 12 Efeito do tratamento com GSE sobre os níveis de TBARS no Plasma dos animais normotensos e hipertensos, com 110 dias de vida e após 90 dias de tratamento com o extrato da casca de uva. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. * $p < 0,001$. 41
- Figura 13 Efeito do tratamento com GSE sobre os níveis de TBARS no Rim dos animais normotensos e hipertensos, com 110 dias de vida e após 90 dias de tratamento com o extrato da casca 42

- de uva. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo.
- Figura 14 Efeito do tratamento com GSE sobre os níveis de TBARS na Aorta dos animais normotensos e hipertensos, com 110 dias de vida e após 90 dias de tratamento com o extrato da casca de uva. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. 43
- Figura 15 Atividade da enzima superóxido dismutase no plasma dos animais normotensos (Wistar-C, Wistar-GSE) e hipertensos (SHR-C, SHR-GSE), com 110 dias de vida. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. $*p < 0,05$ 44
- Figura 16 Atividade da enzima superóxido dismutase no Rim dos animais normotensos (Wistar-C, Wistar-GSE) e hipertensos (SHR-C, SHR-GSE), com 110 dias de vida. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. $*p < 0,05$; $\#p < 0,001$. 45
- Figura 17 Atividade da enzima superóxido dismutase na Aorta dos animais normotensos (Wistar-C, Wistar-GSE) e hipertensos (SHR-C, SHR-GSE), com 110 dias de vida. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. $*p < 0,05$. 46
- Figura 18 Atividade da enzima catalase no Plasma dos animais normotensos (Wistar-C, Wistar-GSE) e hipertensos (SHR-C, SHR-GSE), com 110 dias de vida. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. 47
- Figura 19 Atividade da enzima catalase no Rim dos animais normotensos (Wistar-C, Wistar-GSE) e hipertensos (SHR-C, SHR-GSE), com 110 dias de vida. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. 48

Lista de abreviaturas

Ang II - Angiotensina II

ATP – Adenosina trifosfato

AVC - Acidente Vascular Cerebral

AVE - Acidente Vascular encefálico

CINDI - Countrywide Integrated Noncommunicable Disease Intervention Programme

Cox - Cicloxigenase

DAC - Doença Arterial Coronariana

DCNT - Doenças Crônicas Não-Transmissíveis

EDCF - Fator de Contração Derivado do Endotélio

EDHF - Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio

EDRF - Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio

eNOS - Óxido Nítrico Sintase Endotelial

ET-1 - Endotelina-1

GSE - (Grape Skin Extract) Extrato da Casca de Uva

GSH - Glutathiona Reduzida

GSH-Px - Glutathiona Peroxidase

GSSG – Glutathiona Oxidada

HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

L• - Radical Lipídico

LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade

LH - Ácido Graxo Polinsaturado

L-NAME - N^G-nitro-L-arginina-metil éster

LO• - Radical Alcoxila

LOO - Radical Peroxila

LOOH - Hidroperóxido Lipídico

Lox - Lipoxigenase

MDA - Malondialdeído

NAD(P)H ox

NO - Óxido Nítrico

OH[•] - Radical Hidroxila

ONOO⁻ - Peroxinitrito

O₂^{•-} - Ânion Radical Superóxido

PA - Pressão Arterial

PAD - Pressão Arterial Diastólica

PAS - Pressão Arterial Sistólica

Receptor AT1 - receptor de Angiotensina 1

RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

SHR - Ratos Espontaneamente Hipertensos

SOD - Superóxido Dismutase

SRAA - Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

TBA - Ácido Thiobartúrico

TBARS - Substâncias Reativas do Ácido Thiobarbitúrico

TEMPOL - 4 –Hidroxi – TEMPO,97%

VSMC - Célula da Musculatura Lisa Vascular

XO - Xantina Oxidase

Resumo

A Hipertensão arterial pode estar associada a várias anormalidades metabólicas, como dislipidemias, intolerância à glicose, resistência à insulina e obesidade. Alguns estudos sugerem que esta patologia está relacionada ao estresse oxidativo. Tem sido atribuído um efeito cardioprotetor aos polifenóis do vinho tinto. Este efeito pode ser decorrente da ação anti-hipertensiva, antioxidante e moduladora do metabolismo lipídico do vinho. Neste estudo, nós analisamos o possível efeito protetor do extrato da casca de uva *Vitis Viniferas* (GSE), na pressão arterial, perfil lipídico e glicídico e no mecanismo oxidativo de ratos Wistar (normotensos) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) machos. Os animais, SHR e Wistar (W) foram separados em quatro grupos cada, tratados com GSE (200mg/kg, via oral), desde os 21 dias de vida, por 90 dias consecutivos (SHR-GSE, W-GSE) e não tratados (SHR-C, W-C). A pressão arterial foi medida a partir do 60º dia de vida em intervalos de 5 dias. Todos os animais foram sacrificados no 90º dia de tratamento com GSE e os tecidos (rim e aorta) e o plasma foram coletados a fim de avaliar a peroxidação lipídica, atividade das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase- SOD), glicemia, insulinemia, colesterol total e triglicerídeos. Nossos dados mostraram que os animais hipertensos tratados com GSE tiveram valores de pressão sistólica reduzido, a valores normais a partir do 45º dia de tratamento. Encontramos um aumento no colesterol total e triglicerídeos plasmáticos dos SHR-C quando comparados aos Wistar, porém os SHR-GSE apresentaram níveis semelhantes aos normotensos. Não foi encontrada alteração na glicemia de ratos SHR em relação aos ratos Wistar, porém os animais hipertensos apresentaram menor insulinemia em relação aos normotensos. A peroxidação lipídica estava aumentada no plasma dos SHR-C em comparação aos Wistar, porém nos ratos hipertensos tratados com GSE a peroxidação lipídica assemelha-se aos Wistar. Não foi encontrada diferença na peroxidação lipídica no rim e aorta dos SHR-C, quando comparados aos Wistar, porém verificou-se uma diminuição na peroxidação lipídica no rim dos SHR-GSE, quando comparado com o seu controle. A SOD, no plasma, rim e aorta, são semelhantes nos dois grupos SHR-C e W-C. Contudo, os grupos SHR-GSE e W-GSE, apresentaram um aumento nos níveis desta enzima antioxidante, em relação aos animais normotensos. Não foi encontrada diferença na atividade da catalase nas amostras estudadas. Concluímos que, possivelmente os efeitos anti-hipertensivo, antioxidante e a melhora no perfil lipídico plasmático, possam participar do efeito cardioprotetor do hábito de se ingerir quantidades moderadas de vinho.

Palavras chaves: Ratos Espontaneamente Hipertensos, extrato da casca de uva, estresse oxidativo, peroxidação lipídica, hipertensão.

Abstract

Arterial hypertension is associated with metabolic abnormalities such as dyslipidemia, impaired glucose tolerance, insulin resistance and obesity. Some studies suggest that this pathology is related with oxidative stress. Epidemiological studies have demonstrated a cardiovascular protector effect of moderate wine consumption, probably related to the polyphenols content in red wine. This cardioprotective effect may be due to an anti-hypertensive and antioxidant effects and also to an effect on the modulation of lipids. In this study, we analyzed the possible protective effects of *Vitis Vinifera* grape skin extract (GSE) in vivo, on blood pressure, lipids alterations and oxidative mechanism in male Wistar and spontaneously hypertensive rats (SHR). The animals, SHR and Wistar (W) were separated in four groups, treated with GSE (200mg/kg) orally since 21 days of life for 90 consecutive days (SHR-GSE, W-GSE) and untreated (SHR-C, W-C). The blood pressure was measured since 60 days of life in intervals of 5 days. All animals were sacrificed at day 90 of treatment with GSE and tissues (kidney and aorta) and plasma were collected to evaluate lipid estimated by Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS), antioxidant enzymes activity (catalase, superoxide dismutase - SOD), glucose, insulin, total cholesterol and triglycerides plasma levels. Our data showed that hypertensive animals treated with GSE had arterial blood pressure (BP) values similar to normotensive animals. The SHR-C had an increase in total cholesterol and triglycerides plasma levels compared to Wistar group, but these levels decreased to the normality in SHR-GSE. The glycemias were not different among the groups studied, but the plasma insulin level was smaller in SHR group than Wistar. The plasma lipid peroxidation was increased in SHR-C. However, when treated with GSE, TBARS reduced to normal levels. TBARS levels in homogenate of kidney and aorta were not different between SHR and controls. The SOD levels in the plasma, kidney and aorta was not different among the hipertensive and normotensive untreated animals. However, SHR-GSE and W-GSE groups, showed an increase in the levels of this antioxidant enzyme. Catalase (plasma and kidney) activities were not different among groups studied. According to our results we can conclude that the antihypertensive, antioxidant effects and the modulation of plasma lipids induced by GSE may participate on the cardio protective action of moderate wine ingestion.

Keywords: spontaneously hypertensive rat, grape skin extract, oxidative stress, lipids peroxidations, hypertension.

1. Introdução

As doenças cardiovasculares representam uma das principais causas de mortalidade no mundo, totalizando cerca de 40% de morte nos países industrializados (Sans, S. e cols., 2000). No Brasil os índices estatísticos revelam que a mortalidade por doenças cardíacas representa cerca de 30% do total de óbitos (Anuário Estatístico de Saúde no Brasil / MS / Funasa / Cenepi / IBGE, 2001).

Dados dos países que participaram do *Countrywide Integrated Noncommunicable Disease Intervention Programme* (CINDI) da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostraram prevalência de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) em 9% a 34% em homens e 12% a 34% em mulheres de 25 a 64 anos, considerando pressão arterial sistólica (PAS) \geq 160 mmHg e pressão arterial diastólica (PAD) \geq 95 mmHg, ou usando medicação anti-hipertensiva (Olmos RD. & Lotufo PA., 2002). Nos Estados Unidos, cerca de 25% de todos os adultos e mais de 60% das pessoas com mais de 60 anos são portadores de HAS (Okoshi MP. e cols, 2001). No Brasil, inquéritos de base populacional revelam que a HAS primária atinge de 22,3% a 43,9% ($>$ 140/90 mmHg) da população urbana adulta brasileira (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006), sendo acima de 25%, na maioria das cidades estudadas, predominando no sexo masculino e com fatores de risco associados semelhantes aos de outros países (Lessa I., 2001). Nas diversas regiões, observa-se ampla variação, sendo 1,28% a 27,1% no Sul, 6,3% a 16,7% no Centro-Oeste, 5,04% a 32,7% no Sudeste e 7,2% a 40,3% no Nordeste (Dórea EL & Lotufo PA., 2004).

A elevação da pressão arterial (PA) representa um fator de risco independente, linear e contínuo para a doença cardiovascular, com custos elevados decorrentes de suas complicações: doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular de extremidades. A HAS é responsável por 40% dos óbitos por acidente vascular encefálico ou cerebral (AVE ou AVC) e 25% dos óbitos por doença arterial coronariana (DAC), e está entre as causas mais freqüentes de hospitalizações entre as afecções cardiovasculares (The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of Hight Blood Presure, 2004).

No Brasil, em 2003, 27,4% dos óbitos foram decorrentes de doenças cardiovasculares, sendo o AVE ou AVC a principal causa em todas as regiões, atingindo as mulheres em maior proporção (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006).

A HAS, como a maioria das doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), envolve componentes etiológicos, ambientais e hereditários, sendo, portanto, classificada como uma doença poligênica e multifatorial, relacionada a mudanças morfológicas e funcionais no sistema cardiovascular e no controle autonômico (Irigoyen MC. e cols., 2005). A PA é determinada pelo débito cardíaco e pela resistência vascular periférica, que, por sua vez, são determinados por volume sistólico e freqüência cardíaca, e pelo tônus vascular, respectivamente, de tal forma que seu controle envolve mecanismos neurais e neuro-humorais que, em curto e longo prazo, modulam não só a atividade do sistema nervoso autônomo para o coração e para os vasos, como também o volume sanguíneo e a secreção

de vários hormônios como renina, vasopressina, peptídeo natriurético atrial, entre outros (Consolim-Colombo FM. & Fiorino P., 2005 e Irigoyen MC, e cols., 2005)

As células endoteliais exercem um papel importante na biologia e na patologia vascular. O funcionamento integrado desta célula é fundamental para os mecanismos de desenvolvimento e resposta da vasculatura a estímulos hemodinâmicos e bioquímicos. O endotélio vascular é um tecido versátil e multifuncional, que possui diversas propriedades sintéticas e metabólicas, como: Manutenção da barreira de permeabilidade; Síntese de reguladores anticoagulantes, antibióticos e fibrinolíticos; Síntese de moléculas pró-trombóticas; produção de matriz extracelular; Modulação do fluxo sanguíneo e reatividade vascular; Regulação da inflamação e imunidade; Regulação do crescimento celular; e oxidação do LDL. A disfunção endotelial, caracterizada por um fenótipo alterado que prejudica a vasorreatividade ou induz uma superfície trombogênica ou anormalmente aderente à células inflamatórias, é responsável, ao menos em parte, pelo início da formação de trombo, aterosclerose e lesões vasculares da hipertensão.

Todas as células vasculares [célula endotelial, célula da musculatura lisa vascular – VSMC e fibroblastos] produzem espécies reativas, seja de oxigênio (ERO), via enzimas NAD(P)H oxidase (NAD(P)Hox) associada à membrana, xantina oxidase (XO), lipoxigenase (LOx), ciclooxigenase (COx), seja de nitrogênio (ERN), através da enzima de síntese do óxido nítrico (óxido nítrico sintase endotelial, eNOS) ou monóxido de nitrogênio ou fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (Touyz RM. & Schiffrin EL., 2004 e Laurindo FRM e cols., 1998).

O óxido nítrico (NO) é produzido na célula endotelial pela enzima eNOS que converte o aminoácido L-arginina a NO + L-citrulina, catalisando a oxidação de cinco elétrons com a participação de NAD(P)H/NADP⁺ e do complexo cálcio/calmodulina (Malinski T., 2005). Sua função é regular o tônus vascular pela ação vasodilatadora sobre as células musculares lisas e de inibição da atividade plaquetária, agregação de leucócitos e proliferação das células musculares lisas da vasculatura endotelial (Ramachandran A. e cols., 2002) sendo fundamental na modulação da pressão arterial.

Na última década o papel das espécies reativas no sistema cardiovascular tem sido objeto de muito interesse e de pesquisas (Paravicini TM. & Touyz RM., 2006) A atuação das ERO e ERN sobre o sistema cardiovascular envolve a regulação e a diferenciação celular, a modulação de matriz extracelular, a inativação de NO e a estimulação de muitas cinases (Sampaio WO. & Santos RAS., 2004). Estes efeitos costumam estar associados à HAS, que por sua vez possui uma rede complexa e importante de mecanismos relacionados à presença de ERO e ERN, que reunidos, explicam a hipótese oxidativa da HAS (Paravicini TM. & Touyz RM., 2006).

Como citado anteriormente, a patogênese da HAS envolve predisposição genética e exposição a fatores ambientais (fumo, hábitos alimentares, sedentarismo, etc), de modo que a pressão normal é mantida por uma complexa rede de sistemas cardiovasculares, entre eles, o balanço de sódio, vasodilatação e função renal, destacando-se a atividade da angiotensina II do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). A angiotensina II (Ang II), originalmente descrita como um potente vasoconstritor, é agora apontado como um hormônio

multifuncional, influenciando vários processos celulares, sendo importante na regulação da função vascular, incluindo crescimento celular, apoptose, migração, inflamação e fibrose (Wolf G & Wenzel UO, 2004 e Touyz RM & Schiffrin EL., 2000). Crescentes evidências indicam que a Ang II induz a produção de ERO, uma vez que estimula a ativação da NAD(P)Hox. As NAD(P)Hox são enzimas associadas às membranas que catalisam a redução de O₂ em ânion radical superóxido (O₂^{•-}) usando NADH ou NAD(P)H como doador de elétron (Equação1).



Quando ativadas por forças hemodinâmicas e múltiplos agonistas vasoativos, destacando-se Ang II (Figura 1) como na hipertensão, as NAD(P)Hox vasculares (isoformas encontradas na célula endotelial, fibroblastos e células da musculatura lisa vascular) produzem O₂^{•-} crônica (minutos a horas), intra e extracelularmente, em contraste com a produção instantânea e apenas extracelular pela NAD(P)Hox do neutrófilo (Griendling KK. & Fitzgerald GA., 2003; Griendling KK e cols., 2000; Griendling KK. & Fitzgerald GA., 2003 e Zalba G. e cols., 2001)

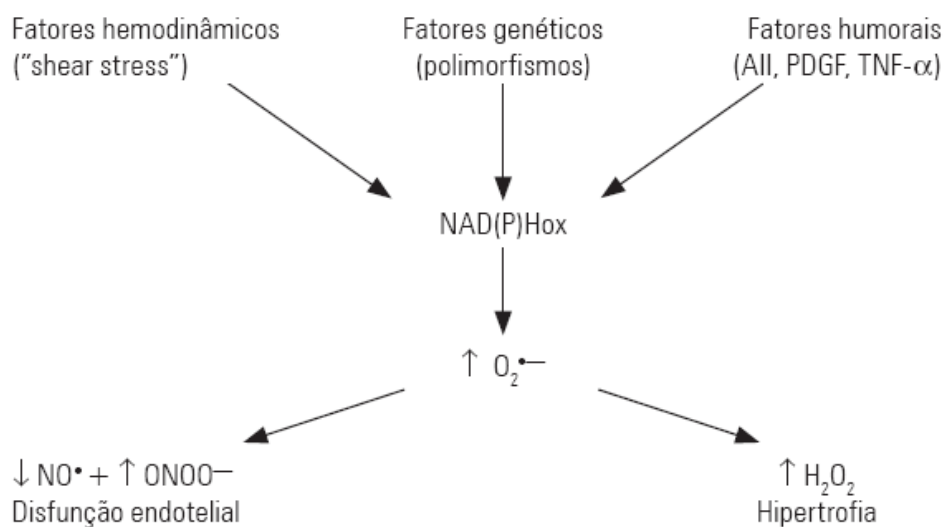


Figura 1 – Ativação de NAD(P)Hox e conseqüências funcionais na HAS. Angiotensina II (Ang II); fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de necrose tumoral (TNF- α); óxido nítrico (NO); peroxinitrito (ONOO⁻); peróxido de hidrogênio (H₂O₂); ânion radical superóxido (O₂^{•-}).

Fonte: Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diez J. Oxidative stress in arterial hypertension. Role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 2001;38:1935-9.

A ativação da NAD(P)Hox via receptor AT1 (receptor de angiotensina II) desencadeia, também, o processo de crescimento vascular, já que as espécies reativas geradas ativam cascatas proliferativas no músculo liso vascular (Romero JC. & Reckelhoff JF., 2000; Reckelhoff JF. & Romero C., 2003 e Violi F. e cols., 2004), além do declínio na biodisponibilidade do NO que pode ser devido a quatro fatores: (1) diminuição na expressão de eNOS; (2) ausência de substrato ou cofator para eNOS; (3) alteração da sinalização celular de modo que eNOS não é apropriadamente ativada; (4) degradação acelerada de eNOS (Cai H. & Harrison DG., 2002) (Figura2).

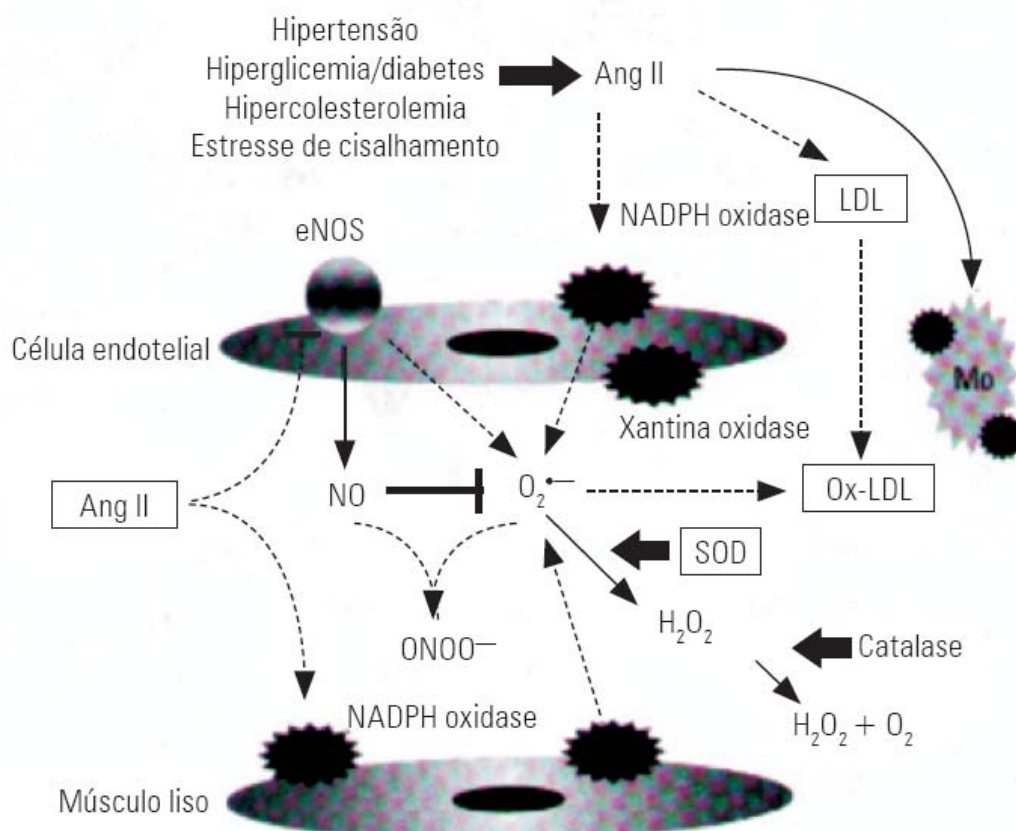


Figura 2 – Estresse oxidativo vascular estimulado pela angiotensina II (AngII). A produção local de Ang II estimula a NAD(P)Hox e XO que são fontes de ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e provoca alterações na atividade do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que também leva à formação de $O_2^{\bullet-}$. Esse desequilíbrio entre a formação de NO^{\bullet} e $O_2^{\bullet-}$, que, em condições fisiológicas, são produzidos em quantidades equimolares, leva à formação de peroxinitrito ($ONOO^-$) e potencializa a oxidação do LDL (oxLDL). Superóxido dismutase (SOD); Monócitos (Mo). Setas pontilhadas: ação de Ang II; setas cheias: sistema antioxidante enzimático.

Fonte: Sampaio WO, Santos RAS. Aplicações clínicas dos mecanismos fisiopatológicos da hipertensão arterial. Sistema renina-angiotensina: bases fisiopatológicas. *Rev.Bras de Hipertensão* 2004;11(1):67-70.

Crescentes evidências indicam que a produção de ERO e a ativação da cascata de sinalização redox-dependente estão diretamente envolvidas com a ação da angiotensina II (Touyz RM., 2000 e Griendling KK. e cols., 2000). As ERO

vasculares são produzidas principalmente no endotélio, célula da musculatura lisa vascular e derivada primariamente da NADPH oxidase. A NADPH oxidase é controlada por fatores humorais (citoquinas, fator de crescimento, agentes vasoativos) e fatores físicos (elasticidade, tensão pulsátil, estresse). Fisiologicamente, as ERO são produzidos de maneira controlada, em baixas concentrações e as funções de moléculas sinalizadoras, mantém a integridade vascular pela regulação da função endotelial e contração-relaxamento vascular (Touyz RM., 2004).

O estresse oxidativo vascular tem sido demonstrado em hipertensão experimental e espontânea. Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) apresentam aumento da NADPH movido pela geração de $O_2^{\cdot-}$ em vasos de resistência e condutância. A geração de $O_2^{\cdot-}$ e a conseqüente diminuição na biodisponibilidade do NO podem contribuir para o estresse oxidativo nos SHR (Touyz RM., 2004). O tratamento com vitaminas antioxidantes, inibidor da NADPH oxidase, Superóxido Dismutase (SOD) mimético e inibidor do receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1), diminuem a produção de $O_2^{\cdot-}$ vascular e atenua o desenvolvimento de Hipertensão nesse modelo (Rodriguez-Iturbe B. e cols., 2003; Shokoji T. e cols., 2003 e Park JB. e cols. 2002).

Estudos clínicos demonstram o aumento da produção de ERO em pacientes com hipertensão essencial, renovascular e preeclâmpsia (Higashi Y. e cols., 2002 e Lee VM. e cols., 2003). Esses achados são geralmente baseados no aumento de marcadores da peroxidação lipídica e estresse oxidativo, no plasma humano, como o malondialdeído (MDA). O MDA é um dos biomarcadores mais utilizados por ser um dos produtos secundários da peroxidação lipídica mais

conhecidos. O principal método utilizado é a reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um complexo colorido que pode ser quantificado por espectrofotometria ou por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ambos com detecção visível (Ward NC. e cols., 2004)

Sendo a HAS um problema de saúde pública, o conhecimento dos fatores associados ao seu desenvolvimento é de grande importância, para que se possa atuar de forma preventiva adequada.

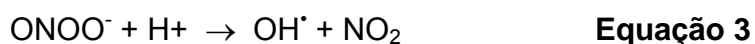
1.1 Estresse Oxidativo

Segundo Gutteridge (1995), o termo antioxidante se refere a qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, atrasa ou inibe consideravelmente a oxidação do substrato. Os antioxidantes atuam por meio dos seguintes mecanismos: remoção ou diminuição da concentração local de oxigênio, remoção de íons de metais catalíticos, remoção das espécies reativas, como o superóxido e peróxido de hidrogênio, varredura de radicais livres iniciadores de reações de oxidação, quebra da reação em cadeia e extinção ou remoção do oxigênio singlete. O estresse oxidativo, que seria o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e o sistema de defesa antioxidante, desempenha um papel importante na patogênese da Hipertensão (Gutteridge JMC., 1995).

O termo radical livre refere-se a átomos ou moléculas altamente reativos que possuem um elétron ímpar em sua última camada (Salido & Fernández, 2002 e Ferreira & Matsubara, 1997). Dentro das moléculas, os elétrons em geral se reúnem em pares. Um par de elétrons é mais estável que os elétrons isolados, e

este não emparelhamento de elétrons da última camada confere uma alta reatividade a esses átomos e moléculas, provocando reações em cadeia que desestabilizam o meio molecular. Os antioxidantes, como os polifenóis contidos no vinho tinto, estabilizam os radicais livres mediante a doação/recebimento de elétrons (Ferreira & Matsubara, 1997).

O estresse oxidativo vascular é caracterizado pela superprodução de $O_2^{\bullet-}$ (Mcintyre M. e cols., 1999; Ward NC. e cols., 2004 e Portaluppi F. e cols., 2004) que inibe a atividade do NO e reage com ele para formar peroxinitrito ($ONOO^-$) um intermediário reativo particularmente lesivo (Equação 2), uma vez que é capaz de formar o radical hidroxil (OH^{\bullet}), independente da presença de metal de transição (Equação 3) (Laurindo FRM. e cols., 1998; Halliwell B. & Gutteridge JMC., 2007 e Lasségue B. & Griendling K., 2004).



A menor disponibilidade de NO favorece maior atividade da Endotelina-1 (ET-1) ou fator de contração derivado do endotélio (EDCF), promove crescimento das células endoteliais e vasoconstrição e, portanto, participa na patogênese do estresse oxidativo da HAS (Portaluppi F. e cols., 2004). Assim, o estresse oxidativo vascular resultaria em HAS, uma vez que fatores vasoconstritores estariam em preponderância em relação aos fatores vasodilatadores. A principal fonte de $O_2^{\bullet-}$ seria o complexo enzimático NADH / NAD(P)Hox, que catalisa a

redução do oxigênio molecular utilizando NAD(P)H como doador de elétrons gerando $O_2^{\cdot-}$. O sistema NADH/NAD(P)Hox é a maior fonte de $O_2^{\cdot-}$, nas membranas das células endoteliais e musculares lisas (Touyz RM., 2004 e Beswick RA e cols., 2001).

A produção excessiva de ERO dentro dos vasos tem sido considerado um importante mecanismo de disfunção endotelial, e se dá primeiramente pelo geração de $O_2^{\cdot-}$. Especificamente, o superóxido reage rapidamente com o NO e forma $ONOO^-$, causando perda da bioatividade do NO (da Luz & Coimbra, 2004).

1.1.1 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

As ERO são formadas através de processos de redução. Pela sua configuração eletrônica, o oxigênio tende a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários, altamente reativos, destacando-se o $O_2^{\cdot-}$, o peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e o OH^{\cdot} (Belló,A., 2002)

Conforme visto acima, o $O_2^{\cdot-}$ é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio até a água, sendo a partir dele formado as demais ERO (Halliwell B. & Gutteridge JMC., 1989)

Tabela 1: Espécies reativas de oxigênio (ERO)

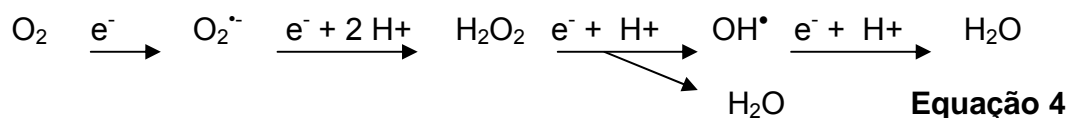
$O_2^{\cdot-}$	Ânion superóxido ou Radical superóxido
HO_2^{\cdot}	Radical perhidroxil
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
OH^{\cdot}	Radical Hidroxila
RO^{\cdot}	Radical alcóxil
ROO^{\cdot}	Radical peróxil
$ROOH$	Hidroperóxido orgânico
1O_2	Oxigênio singlet

Fonte: (Sies,1991)

O íon superóxido é formado com o acréscimo de um elétron ao oxigênio. Essa reação ocorre espontaneamente, em reações com íon ferroso ou com outros metais ou ainda, no metabolismo celular aeróbio. A principal defesa contra esse radical é a sua dismutação, que é uma reação na qual duas moléculas idênticas são transformadas em compostos diferentes. Esta dismutação é feita pela enzima superóxido dismutase.

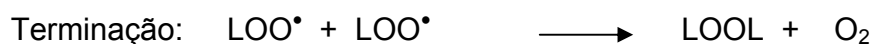
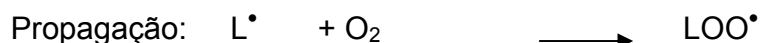
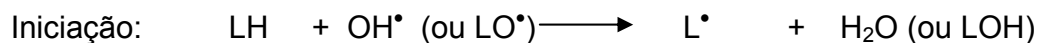
O peróxido de hidrogênio é formado com o acréscimo de dois elétrons excedentes na reação de O_2 . São mais implicados na oxidação de LDL, gerando partículas aterogênicas.

O radical OH^\bullet é um dos mais potentes oxidantes, tendo a capacidade de atravessar membranas e reagir com moléculas como lipídios insaturados e DNA. É formada com o acréscimo de três elétrons excedentes na reação de O_2 (equação 4).



A peroxidação lipídica é definida como a deterioração oxidativa dos lipídios poliinsaturados. Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade (Hershko C.,

1989). A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (Gardès-Albert M.e cols, 1991), como:



Sendo, LH: ácido graxo polinsaturado; L[•]: radical lipídico; LOO[•]: radical peroxila; LOOH: hidroperóxido lipídico; LO[•]: radical alcóxila

1.1.2 Patogenia da Ação das ERO

Há muitas evidências de influências das ERO em doenças degenerativas, como ocorre na catarata, enfisema, artrite, doença de Parkinson, diabetes, hipertensão, câncer e envelhecimento. A forma como ocorrem estas doenças podem ser classificadas como: 1) Estresse oxidativo mitocondrial, quando ocorre um desequilíbrio do estado redox sistêmico (balanço tiol/ dissulfeto) e uma depuração prejudicada de glicose, sugerindo que a mitocôndria do músculo esquelético seja o principal sítio de geração de ROS; 2) Condição oxidativa inflamatória, quando há uma estimulação excessiva da atividade da NADPH oxidase por citoquinas e outros agentes (Bast A. e cols., 1991).

A vida na aerobiose é caracterizada por constante produção destes radicais livres, a qual é contrabalanceada com uma produção equivalente de mecanismos antioxidantes visando neutralizar seus efeitos deletérios. Quando esta

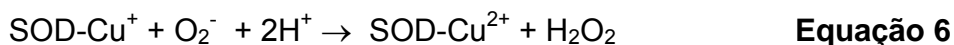
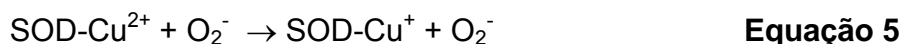
neutralização não é possível devido a uma sobrecarga do mecanismo antioxidante, dizemos que há uma situação de estresse oxidativo, levando a geração de diversos danos aos sistemas biológicos. Frente a um estresse oxidativo, ocorrem os seguintes processos: 1) adaptação, por aumentos da resposta antioxidante; 2) dano tecidual por agressão à lipídios, carboidratos e proteínas; 3) morte celular por necrose ou apoptose.

1.1.3 Sistema de Defesa Antioxidante

Em sistemas aeróbios, é fundamental que haja um equilíbrio entre a formação de ERO e de agentes antioxidantes. Os agentes oxidantes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do O₂. Para se proteger, a célula utiliza um sistema de defesa constituído pelos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes não enzimáticos são exógenos em sua maioria. Os principais são: Vitaminas Lipossolúveis (vitamina A, E e betacarotenos), Vitaminas Hidrossolúveis (Vitamina C e Vitaminas do complexo B), os Oligoelementos (Zinco, cobre, selênio, magnésio, etc.) e os Bioflavonóides (derivados de plantas). Os antioxidantes enzimáticos são as enzimas glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase e glutathiona peroxidase (GSH-Px) Com exceção da Vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, os agentes antioxidantes se encontram no meio intracelular (Ferreira, A.L. & Matsubara, L.S., 1997).

A Superóxido Dismutase (SOD) é o maior sistema de defesa da célula vascular. É responsável pela dismutação do radical superóxido. Esta enzima contém metais redox no centro catalítico e possui duas isoformas de SOD: SOD-cobre-zinco (equação 5 e 6), estável e presente no citosol e a SOD-manganês,

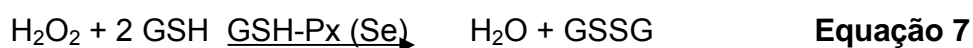
(mais resistente à variações de temperatura e a desnaturação, está presente na mitocôndria) (Halliwell B. & Gutteridge JMC., 1989).



A ação desta enzima protege o DNA contra lesões provocadas pela sobrecarga de ferro (Ferreira, A.L. & Matsubara, L.S., 1997).

A Glutathione Peroxidase (GSH-Px) apresenta um papel fundamental na regulação do estado redox intracelular de células vasculares pela provável redução equivalente através de vias bioquímicas (Wassmann, S. e cols, 2004).

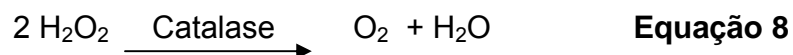
As células animais contêm dois tipos de glutathione peroxidase, sendo que um deles é selênio dependente. A GSH-Px selênio dependente é capaz de reduzir qualquer hidroperóxido orgânico. A GSH-Px catalisa a redução do peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois às custas da conversão da glutathione reduzida (GSH) a Glutathione oxidada (GSSG) (Ferreira, A.L. & Matsubara, L.S., 1997).



A Glutathione Reduzida (GSH) possui uma capacidade redutora que é determinada pelo grupamento tiol (-SH), presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante

da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultra-violeta. Atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da detoxicação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação (Ferreira, A.L. & Matsubara, L.S., 1997).

A Catalase é uma enzima antioxidante intracelular que é localizada nos peroxissomas e também no citosol, no qual catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 . A catalase é muito efetiva em níveis altos de estresse oxidativo e protege as células da produção de peróxido de hidrogênio. A suplementação de catalase exógena previne a oxidação de GSH mediada pelo H_2O_2 (Ferreira, A.L. & Matsubara, L.S., 1997).



1.2 Modelo Experimental de Hipertensão Essencial

A hipertensão é uma doença multifatorial, que envolve interações complexas entre fatores genéticos e ambientais. O modelo animal de hipertensão ideal deve ter as mesmas características das doenças e suas complicações. O modelo de hipertensão mais estudado é o modelo SHR (ratos espontaneamente hipertensos), modelo de hipertensão essencial, no qual múltiplos genes contribuem para o fenótipo individual. O mecanismo genético de hipertensão nos SHR tem sido atribuído à alterações neurais e vasculares (Lerman, L.O. e cols.,2005).

O SHR é um modelo genético de hipertensão, isento de obesidade, que possui as características da hipertensão primária em humanos. Além disso, estes animais possuem hiperglicemia (Mondon CE. & Reaven GM., 1988).

A relação entre estresse oxidativo e aumento da pressão arterial tem sido demonstrado em vários modelos de hipertensão arterial (Paravicini TM. & Touyz RM., 2008). O Aumento na formação de ERO pode ser a causa da hipertensão em modelos SHR (Kitiyakara C. & Wilcox CS.,1998 e Houston MC., 2005). Marcadores de estresse oxidativo, como a substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) estão aumentados em modelos de hipertensão experimental, assim como a diminuição de algumas enzimas antioxidantes (Paravicini TM. & Touyz RM., 2008).

1.3 Vinho Tinto e Benefícios Cardiovasculares

O consumo de vinho tinto tem sido relacionado com menor número de mortes por isquemia cardíaca (St Leger e col., 1979). Esta idéia foi ampliada em 1992, quando Serge Renaud observou que a maioria dos países que consumiam uma quantidade elevada de gordura saturada estavam positivamente relacionados com alta mortalidade por doença cardíaca coronária, mas que, entretanto, esta associação não era observada na França, que mesmo consumindo grandes quantidades de gordura saturada, apresentavam baixa mortalidade por doença cardíaca. Esta relação ficou conhecida como “Paradoxo Francês” e foi atribuída ao consumo elevado de álcool, principalmente vinho, e à dieta mediterrânea (Renaud S. & Lorgeril M., 1992). A partir deste paradoxo, diversos autores vêm

demonstrando que o consumo prolongado de vinho tinto em doses moderadas é benéfico para saúde.

O mecanismo pelo qual o vinho tinto exerce seu efeito cardioprotetor ainda não está completamente estabelecido, mas acredita-se que as ações benéficas provavelmente sejam devido à inibição da agregação plaquetária (Demrow e col., 1995; Hertog e col., 1993), diminuição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Hertog e col., 1993; Stein e col., 1999), redução da síntese de endotelina (Corder e col., 2001), aumento na expressão e atividade da NO sintase endotelial (eNOS) (Wallerath e col., 2003), ação antioxidante (Frankel e col., 1993; Hertog e col. 1993; Soares de Moura e col., 2002), melhora da disfunção endotelial (Stein e col., 1999) e ação antihipertensiva (Frankel e col., 1993; Soares de Moura e col., 2002). Apesar de alguns trabalhos associarem o consumo de álcool com a inibição da agregação plaquetária, os efeitos benéficos do vinho também são atribuídos aos compostos polifenólicos neles presentes (Flesh M. e cols, 1998).

A ingestão de vinho tinto parece ser acompanhada por um significativo aumento nos antioxidantes plasmáticos nos indivíduos diabéticos e não diabéticos com HA (Bagchi e col., 2000). O extrato de casca de uva rico em procianidinas demonstrou ter alta biodisponibilidade e fornecer uma significativa proteção contra radicais livres, melhor do que as vitaminas C, E e beta-caroteno (Bagchi e col., 2000).

1.3.1 Mecanismos de Ação Cardioprotetora do Vinho Tinto

A disfunção endotelial aparece precocemente em diversas doenças cardiovasculares, estando a aterosclerose, a hipertensão e o Diabetes associados

a todos os fatores de risco (Celermajer, 1997). Essa disfunção pode ser definida como um resultado de um desequilíbrio entre a liberação de fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio, produzindo alterações no tônus vascular, o que interfere na homeostasia sanguínea. Os principais fatores relaxantes derivados do endotélio são o NO e o EDHF, enquanto os principais EDCF são a endotelina-1 e as ERRO (Furchgott & Vanhoutte, 1989).

Já foi documentado tanto clinicamente quanto experimentalmente, que os flavonóides são capazes de aumentar a resistência à oxidação da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL). A LDL oxidada é tóxica às células endoteliais e desempenha um importante papel na progressão do desenvolvimento de placas ateroscleróticas (da Luz & Coimbra, 2004). Alguns estudos têm demonstrado que os polifenóis são capazes, ainda, de reduzir a absorção de colesterol, devido à interação desses componentes com os transportadores de colesterol presentes na borda em escova, além de alterar as taxas de secreção de apolipoproteína B e as concentrações de triglicerídeos (Zern & Fernandez, 2005).

1.4 Extrato de Casca de Uva (Grape Skin Extract - GSE)

A partir das evidências, sugerindo que o consumo moderado de vinho exerce um efeito cardioprotetor, nosso laboratório resolveu investigar os possíveis efeitos benéficos de um extrato obtido de casca de uva livre de álcool. Nossos estudos prévios demonstram que o Extrato da Casca de Uva *Vitis Vinífera*(GSE) tem ação antihipertensiva, pois sua administração oral em ratos hipertensos induzidos por N^G-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME) reduziu os valores de

pressão sistólica, média e diastólica (Soares de Moura e col., 2002). Além disso, o extrato induziu uma vasodilatação dependente do endotélio em leito vascular mesentérico isolado e inibiu a peroxidação lipídica, estimada pela produção de malondialdeído em microsomas hepáticos desses animais, mostrando o efeito anti-hipertensivo, vasodilatador e antioxidante do extrato (Soares de Moura e col., 2002).

Em 2004, nosso grupo demonstrou que o extrato tem ação vasodilatadora em vasos isolados de animais experimentais e que esse efeito vasodilatador e anti-hipertensivo eram provavelmente dependentes da liberação do EDRF pelas células endoteliais associados ao NO, uma vez que o uso de L-NAME, que é um análogo competitivo do substrato da biossíntese de NO, a L-arginina, ou seja, um inibidor da liberação de NO, reduziu o efeito vasodilatador do extrato (Soares de Moura e col., 2004). Mais tarde, verificamos que o Ca^{2+} extracelular desempenhou um importante papel no efeito vasodilatador produzido pelo GSE e que esse efeito independe da ativação de alguns receptores de membrana (Madeira SV. e col., 2005). Além disso, o GSE age através de um mecanismo redox-sensível ao nível intracelular, com participação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 (Madeira SV. e col., 2005).

Recentemente demonstramos que o extrato da casca de uva diminui a glicemia em modelo experimental de diabetes, além de reduzir a resistência à insulina através do aumento do conteúdo total de proteínas da cascata de sinalização de insulina no músculo esquelético (Teixeira MT. e cols., 2007). O GSE ainda diminuiu a resistência à insulina, verificada por clampeamento e relação insulina/glicose, quando administrado oralmente em ratas grávidas com pré-eclampsia induzida pelo L-NAME (Soares de Moura e col., 2007).

1.4.1 Características Gerais das Uvas

A uva é o fruto da videira ou vinha, planta que possui a seguinte classificação na sistemática botânica:

Tabela 2 – Classificação das uvas na sistemática botânica

ORDEM	Ramnídea
FAMÍLIA	Vitácea
SUB-FAMÍLIA	Ampelidea
GÊNERO	<i>Vitis</i>
SUB-GÊNERO	<i>Euvitis</i>

As uvas podem ainda ser classificadas de acordo com as espécies, tais como, *Vitis vinífera*, *V. rupestris*, *V. aestivalis*, *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. cinérea*, etc. Cada uma dessas espécies possui muitas variedades, denominadas cepas ou castas.

As uvas que originam os vinhos finos, considerados os melhores, são da espécie *V. vinífera* de origem européia e que possui inúmeras castas, como a Cabernet Sauvignon, a Merlot, a Chardonnay, etc. As demais espécies são denominadas americanas, sendo adequadas à elaboração de vinhos de mesa, vinho colono, vinho de garrafão e suco de uva. Essas espécies também possuem muitas variedades, cujos melhores exemplos no Brasil são a Niágara e a Isabel que até a década de 80 eram as únicas castas utilizadas na elaboração dos vinhos brasileiros.

As uvas Isabel, da espécie denominada *V. labrusca*, caracterizam-se por serem mais robustas e resistentes. Estas uvas são largamente cultivadas no Sul do Brasil, juntamente com as uvas *V. viníferas* que nos últimos anos vêm crescendo significativamente para a produção de vinhos tintos brasileiros (Soares de Moura, 2003).

1.4.2 Características Gerais dos Polifenóis

O GSE é um extrato hidro-alcoólico da casca de uvas viníferas, *Vitis Vinífera*, rico em polifenóis. Estes são importantes para pigmentação, reprodução, crescimento e para proteção contra patógenos nas plantas (Zern & Fernández, 2005). Dentre os alimentos de origem natural onde os polifenóis são encontrados temos frutas e vegetais, sendo os mais ricos as uvas viníferas.

Os polifenóis podem ser definidos como substâncias aromáticas, de origem natural, contendo uma ou mais hidroxilas (Waterhouse, 2002). Eles são agrupados em duas categorias, designadas flavonóides e não-flavonóides. Os flavonóides compreendem a maioria dos polifenóis derivados da casca da uva vinífera, e são definidos como compostos que contêm um sistema formado por três anéis, sendo que dois anéis são aromáticos.

De acordo com o grau de oxidação os flavonóides podem ser classificados em diversas subclasses, sendo as três maiores, as dos flavanóis (ex: catequina e epicatequina); flavonóis (ex. quercetina e kaempferol) e antocianinas e/ou antocianidinas (ex: malvidina-3-glucosídeo e delphinidina). Os não flavonóides são classificados em ácidos hidroxinâmicos (ex: ácido caféico), ácidos benzóicos (ex: ácido gálico), taninos hidrolizáveis (ex: vescaligina) e estilbenos (ex: resveratrol) (Figura 3) (Waterhouse, 2002).

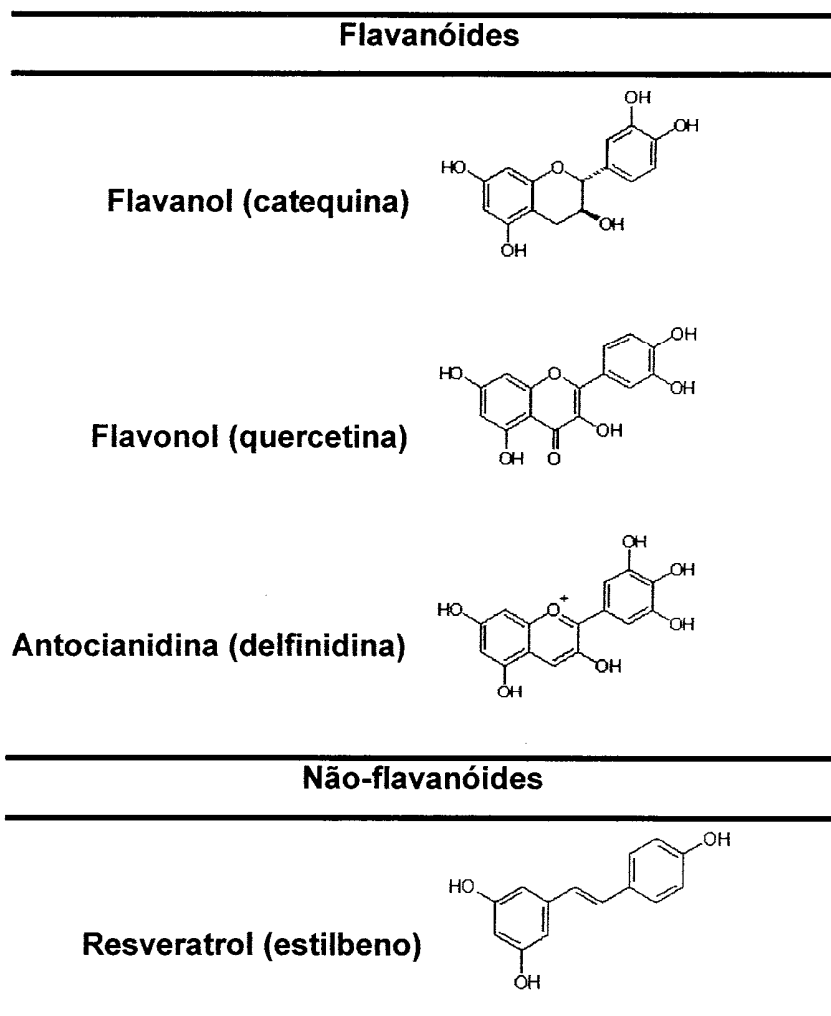


Figura 3 – Estrutura química de alguns polifenóis

Fonte: Waterhouse AL. Wine phenolics. Ann N Y Acad Sci. 2002;957:21-36.

A concentração total de polifenóis nas uvas viníferas, extraídos pelo método de Follin-Ciocalteu, pode variar entre 1,2 e 4,1 g/Kg (Mattivi e col., 2002). Acredita-se, ainda, que a concentração das substâncias presentes nas uvas, variam de acordo com o tipo de uva, solo onde são cultivadas (terroir), os métodos de cultivo, o tempo de fermentação, o tempo de maturação do vinho e as

condições climáticas, como exposição a luz solar (Ryan & Revilla, 2003, Zafrilla e col, 2003).

Em estudos previamente realizados, detectamos que o GSE liofilizado tem uma concentração de fenóis, pelo método de Follin-Ciocalteu, de 55,5 mg/g (Soares de Moura e col., 2002). A casca e o caroço são as partes da uva que contêm maior quantidade de polifenóis, porém como a casca responde por um maior volume da uva que o caroço, fica mais vantajoso, economicamente, utilizá-la, principalmente quando se pensa em comercialização.

2. Objetivo Geral

Considerando que no modelo de hipertensão experimental espontâneo (SHR) ocorre, além do aumento da pressão arterial, uma elevação do colesterol e triglicérides, e ainda um aumento do estresse oxidativo, resolvemos estudar o possível efeito benéfico do extrato da casca de uva (GSE) obtido das uvas *Vitis Vinífera* sobre a hipertensão arterial, perfil lipídico, glicemia, sensibilidade à insulina e mecanismo oxidativo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do GSE sobre o peso corporal dos animais estudados.
- Avaliar o efeito do GSE sobre a pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e Wistar (controle, normotenso).
- Avaliar o efeito do GSE sobre a glicemia e insulina plasmática de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e Wistar.
- Comparar os níveis plasmáticos de triglicérides e colesterol total dos animais estudados.
- Avaliar o dano oxidativo e o efeito do GSE sobre a peroxidação Lipídica em tecidos (Rim e aorta) e plasma de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).
- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (plasma, rim, aorta) e catalase (rim e plasma) nos animais estudados, assim como investigar a ação do GSE sobre estes parâmetros.

3. Metodologia

3.1 - Preparação do Extrato de Casca de Uva (GSE)

As uvas viníferas foram lavadas em água corrente e as cascas foram separadas das polpas. Aproximadamente 100 g de cascas de uva foram fervidas em 400 ml de água destilada por 5 minutos e posteriormente o preparado foi triturado. Posterior à trituração, 400 ml de etanol foram adicionados ao decoto, a solução foi homogeneizada por 4 horas e acondicionada em frasco de vidro de cor escura e este mantido no refrigerador a 4°C por 20 dias. Um extrato hidroalcoólico de casca de uva foi então obtido e posteriormente filtrado através de filtro de papel Whatman nº 1. O etanol foi então evaporado, em regime de baixa pressão a 55° C, e o extrato liofilizado e congelado a -20° C até o seu uso. Constatou-se que para cada 100 g de cascas de uva, obtinha-se a formação de cerca de 8,9 g de extrato liofilizado.

3.2 Protocolo Experimental e Modelo Animal

Foram utilizados ratos Wistar e SHR com 21 dias de vida, mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia/ IBRAG/ UERJ, em temperatura média de 23° C e com ciclo de luminosidade de 12hs (claro e escuro). Os animais receberam ração industrializada específica para ratos (NUVILAB®) com 22% de proteína.

Os animais foram divididos em 4 grupos contendo no mínimo 6 animais (n≥6) em cada grupo: Grupo Wistar controle (W-C), Grupo Wistar tratado com GSE (W-GSE), Grupo SHR controle (SHR-C) e Grupo SHR tratado com GSE

(SHR-GSE). Os Grupos W-GSE e SHR-GSE receberam 200mg/kg/dia de peso de GSE dissolvido na água de beber dos 21, após o desmame, até os 110 dias de vida. Os grupos controle receberam somente água livremente.

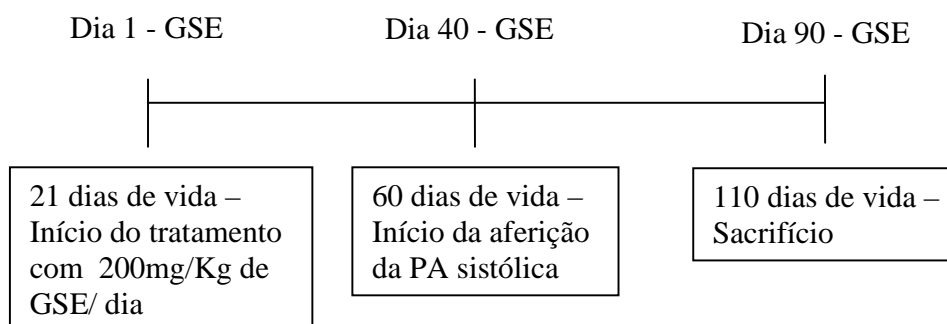


Figura 4 – Esquema de evolução do experimento, do início (animais com 21 dias) ao final do tratamento com GSE (animais com 110 dias).

Todos os experimentos foram revisados e aprovados pela Comissão de Ética de Experimentos Animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

3.3 Aferição da Pressão Arterial

A pressão arterial sistólica foi medida por método não invasivo (pletismografia de cauda – Letica LE 5000), nos ratos acordados de todos os grupos experimentais, por meio de um garrote e de um sensor de pulso colocados em torno da cauda do animal. Estes foram conectados ao registrador, o qual insufla e desinsufla automaticamente o garrote, e detecta o desaparecimento e o aparecimento da onda de pulso na artéria caudal, e assim

determina a pressão arterial sistólica. As medidas foram realizadas uma vez por semana a partir dos 60 dias de vida (após 40 dias de tratamento com GSE), com intervalos de 5 dias entre as medidas, até os 110 dias de vida.

Os animais foram treinados por 2 semanas, antes do período experimental, para minimizar o estresse durante a medida da pressão arterial.

3.4 Análises do Peso Corporal

Os animais normotensos iniciaram o estudo com peso entre 70 e 85g e os hipertensos entre 45 e 65g. O peso dos animais foi acompanhado ao longo de todo o período experimental.

3.5 Análises Bioquímicas

Depois de 90 dias de tratamento com GSE, após 16 horas de jejum, os animais foram anestesiados por administração de Tiopental (30 mg/kg de peso) intra peritoneal e heparinizados (Heparina - 5000 UI/kg). Após o início do efeito da anestesia foi feita uma abertura da região abdominal à torácica. O sangue foi coletado através da aorta abdominal, com seringa previamente heparinizada. As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. Posteriormente o plasma foi separado dos elementos figurados do sangue e mantido em freezer a -20°C até o momento das análises bioquímicas.

3.5.1 Análise da Glicose Plasmática

A glicose do plasma dos animais estudados foi determinada através do método colorimétrico utilizando-se “kit” comercial Glicose-PP (Analisa®, Brasil). Em 10 µl de plasma dos ratos foi adicionado 1 ml do reagente de cor contendo

glicose oxidase 10000 U/ L, peroxidase > 1000 U/ L e 4-aminoantipirina 0,4 mmol/L. Após agitação em vortex AP 56 (Phoenix®, Brasil) as amostras foram incubadas à temperatura ambiente (15 - 30°C) durante 10 minutos. A leitura foi realizada em duplicata da absorbância das amostras e do padrão (glicose 100 mg/dl) em espectrofotômetro (Shimadzer®, Japão) a 500nm. Os resultados foram expressos em mg/dl e calculados através das fórmulas descritas abaixo.

$$FC = Cp / Ap$$

$$Ct = Fc . At (mg/dl)$$

Fc: Fator de calibração

Cp: Concentração do Padrão

Ap: Absorbância do Padrão

Ct: Concentração do teste

At: Absorbância do teste

3.5.2 Análise da Insulina Plasmática

A dosagem da insulinemia de jejum foi realizada por radioimunoensaio nos plasmas coletados após o sacrifício através de kit para diagnóstico de insulina (MP Biomedicals ¹²⁵I RIA Kit). Foram incubados, a temperatura ambiente, 100 µl de plasma ou do padrão de insulina (0; 5,5; 15; 35; 70; 175; 310 µUI/mL), em duplicata, com 900 µl de Insulina ¹²⁵I liofilizada reconstituída com água destilada, por 18 horas em tubos de polipropileno com anticorpo anti-insulina porcina adsorvido à parede do tubo. Após o período de incubação, o sobrenadante foi desprezado e o tudo lavado por 2 vezes com aproximadamente 4 ml de água destilada. A fração radioativa adsorvida foi mensurada em contador Gama (Packard® Cobra Auto-Gamma ®) e os valores expressos da curva padrão em

contagem por minuto foram interpolados na concentração dos valores de insulina padrão em logaritmo. A obtenção dos valores de insulina plasmática das amostras foram calculados a partir da função da regressão logarítima através do software Microsoft Excell ® e os resultados expressos em $\mu\text{UI/ml}$.

3.5.3 Análise da Sensibilidade à Insulina

O indicador da sensibilidade à insulina foi obtido através da relação insulina/glicose ($\mu\text{UI/ml}$ / mg/dl).

3.5.4 Análise dos Triglicerídeos Plasmáticos

Os triglicerídeos totais do plasma de todos os animais do estudo foram determinados, após o sacrifício, através do método colorimétrico utilizando-se “kit” comercial Triglicérides-PP (Analisa®, Brasil). Em 10 μl de plasma dos ratos foi adicionado 1 ml do reagente de cor contendo lipase > 100 U/ ml, glicerol quinase > 1,5 U/ ml, glicerol-3P-oxidase > 4 U/ ml e peroxidase > 0,8 U/ L. Após aquecimento em banho a 37°C durante 5 minutos foi realizada a leitura em duplicata da absorbância das amostras e do padrão (glicerol equivalente a 200 mg/dl de trioleína) em espectrofotômetro (Shimadzer®, Japão) a 500nm. Os resultados foram expressos em mg/dl e calculados através das fórmulas descritas abaixo.

$$\text{FC} = \text{Cp} / \text{Ap}$$

$$\text{Ca} = \text{Fc} \cdot \text{Aa}$$

Fc: Fator de calibração

Cp: Concentração do Padrão

Ap: Absorbância do Padrão

Ca: Concentração da amostra

Aa: Absorbância da amostra

3.5.5 Análise do Colesterol Total Plasmático

O colesterol total do plasma dos animais estudados foi determinado através do método colorimétrico utilizando-se “kit” comercial Colesterol-PP (Analisa®, Brasil). Em 10 µl de plasma dos ratos foi adicionado 1 ml do reagente de cor contendo colesterol estearase > 200 U/ L, colesterol oxidase > 100 U/ L e Peroxidase > 800 U/ L. Após agitação em vortex AP 56 (Phoenix®, Brasil) e aquecimento em banho a 37°C durante 5 minutos foi realizada a leitura em duplicata da absorbância das amostras e do padrão (colesterol 200 mg/dl) em espectrofotômetro (Shimadzer®, Japão) a 500nm. Os resultados foram expressos em mg/dl e calculados através das fórmulas descritas abaixo.

$$FC = Cp / Ap$$

$$Ca = Fc . Aa$$

Fc: Fator de calibração

Cp: Concentração do Padrão

Ap: Absorbância do Padrão

Ca: Concentração da amostra

Aa: Absorbância da amostra

3.6 Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Foi avaliada a peroxidação lipídica em amostras de rim, aorta e plasma de todos os animais estudados. Este método é utilizado para avaliação do estado de oxidação dos ácidos graxos. O dano oxidativo é determinado pela formação de subprodutos da lipoperoxidação (malondialdeído – MDA), que são substâncias

reativas ao aquecimento do ácido thiobartúrico (TBA) formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas e microsomas. O MDA reage com o TBA gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro (532nm) (Draper HH. E cols., 1993).

As amostras (rim e aorta) foram homogeneizadas em 1 ml de tampão fosfato. Foi utilizado 200µl de homogenato para 400µl de ácido tricloroacético (TCA). Para o plasma, foi utilizado 200µl de amostra, diluídos em 600µl de TCA. As amostras foram centrifugadas por 10 min em 1000rpm à 4°C). Separou-se 500µl do sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa e adicionou 500µl de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (100°C) por 30 minutos. Deixou esfriar por 5 minutos e posteriormente foi feita a leitura em espectrofotômetro (532nm).

Para o cálculo foi utilizado:

- Fator de Correção (FC) médio do TBA → $FC = \frac{[nmol.TMP]}{Abs. ptn}$
- Abs. da amostra x FC médio = nmol de TBARS
- nmol de TBARS ÷ quantidade de proteína da amostra (nmol de TBARS/mg de proteína)

3.7 Atividade das Enzimas Antioxidantes

3.7.1 Superóxido Dismutase (SOD)

O produto resultante da reação catalisada pelo SOD é o H₂O₂ que deve ser retirado do meio o mais rápido possível. Uma unidade de enzima é definida pela quantidade transformada em 1µmol de substrato por minuto. A atividade

enzimática foi estimada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480nm). A adrenalina é oxidada pelo $O_2^{\cdot-}$ para formar um produto róseo, adrenocromo (Bannister JV. & Calabrese L., 1982).

Foi utilizado 20, 40 e 60 μ l de cada amostra (rim e aorta) em cubetas separadas. Em cada tubo foi adicionado 20 μ l de catalase (0,0024g/ml de água destilada – C9322, SIGMA) + 970 μ l de tampão glicina (0,75g em 200ml de água destilada – 32°C).

Para o cálculo foi utilizado o alfa da reta de cada amostra em todas as concentrações utilizadas em planilha do excel. Os resultados foram ponderados em mg de proteína.

3.7.2 Catalase

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do H_2O_2 . Na reação, uma das moléculas de peróxido de hidrogênio é oxidada à oxigênio molecular e a outra é reduzida à água. Este método mede a atividade da enzima produzida pelas células e organelas em resposta a quantidade de peróxido de hidrogênio, medido pelo espectrofotômetro (Aebi H., 1984).

Foram utilizados 200 μ l de homogenato de rim e 20 μ l de amostra de plasma em cubetas separadas (quartzo). Em cada tubo foi adicionado 1ml de tampão fosfato (PBS) com peróxido de hidrogênio (25ml de tampão para 40 μ l de H_2O_2). O comprimento de onda utilizado foi 240nm e a leitura foi feita nos tempos 0, 30 e 60 segundos, a fim de observar o decaimento.

Para o cálculo foi utilizado:

- A diminuição da Abs do primeiro segundo (0 segundos) pelo último segundo (60 segundos) = X
- Multiplicou-se o resultado por 2,361 (constante) $\rightarrow X \cdot 2,361 = Y$
- Este resultado foi multiplicado pela Abs do tempo 0 segundos $\rightarrow Y \cdot \text{Abs. tempo 0} = Z$
- Dividir Y por Z = W
- E por último, dividir W pela quantidade de proteína da amostra (U de catalase/ mg de proteína)

3.8 – Dosagem de Proteína

As proteínas totais das amostras estudadas foram quantificadas através do método de Bradford em placa de ELISA (Jamef®), utilizando a albumina bovina (SIGMA®) (Bradford MM., 1976).

3.9 - Análise estatística

Todos os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média do número dos animais. Foi utilizado Análise da variância (ANOVA) seguido de pós teste Bonferroni para comparação dos 4 grupos estudados e teste t-student para comparação dos pares de grupos, considerando valores de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

4.0 Resultados

4.1 Pressão Arterial

Pressão arterial sistólica (PAS) dos grupos no final do experimento (90º dia de tratamento com GSE) foi: Wistar-C: $127 \pm 1,60$ mmHg; Wistar-GSE: $125,2 \pm 0,73$ mmHg; SHR-C: $220,4 \pm 1,39$ mmHg e SHR-GSE: $126,9 \pm 0,86$ mmHg. Estes resultados mostram uma diferença significativa entre os grupos: Wistar-C e SHR-C ($p < 0,001$); Wistar-GSE e SHR-C ($p < 0,001$); SHR-C e SHR-GSE ($p < 0,001$). Não demonstrando diferença estatística entre os animais normotensos e o SHR-GSE.

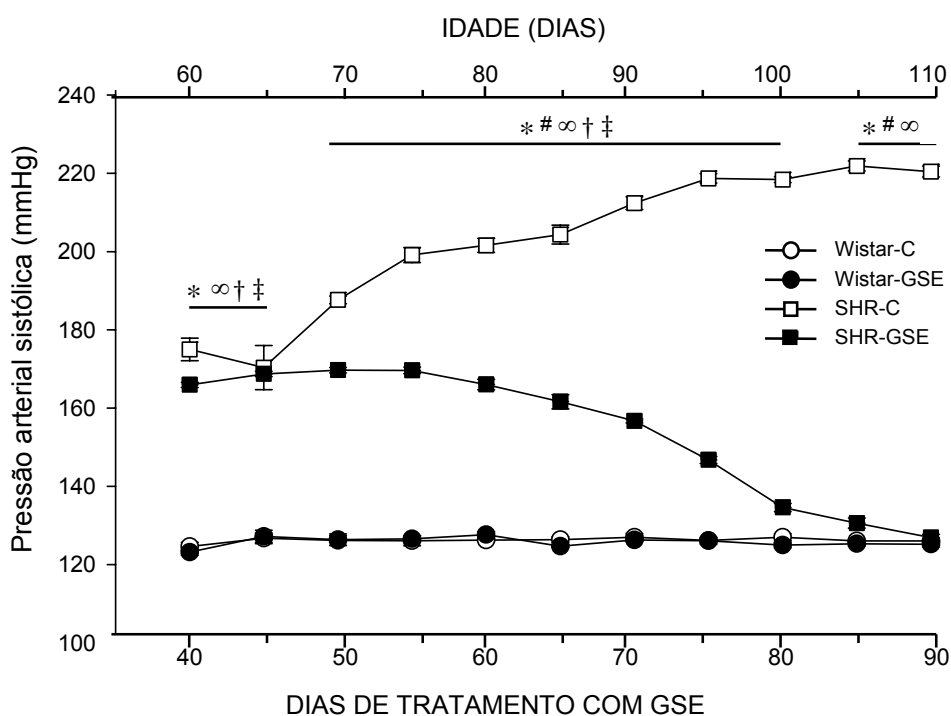


Figura 5 – Efeito do tratamento com GSE na pressão arterial sistólica dos animais normotensos e hipertensos, à partir do 40º dia de tratamento com o extrato da casca de uva. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. $p < 0,001$ *SHR-C x Wistar-C; #SHR-C x SHR-GSE; ∞ SHR-C x Wistar-GSE; † SHR-GSE x Wistar-C; ‡ SHR-GSE x Wistar-GSE.

A suplementação com o extrato da casca de uva diminuiu a PAS dos animais hipertensos (SHR-GSE) à partir da 50ª semana de tratamento com o GSE. Este

grupo chegou ao final do experimento com valor de PAS similar aos normotensos, confirmando assim o efeito hipotensor do GSE.

4.2 Peso corporal

O Peso corporal total dos grupos no final do experimento (110 dias de vida) foi: Wistar-C: $330,22 \pm 0,795g$; Wistar-GSE: $332,44 \pm 1,958g$; SHR-C: $294,0 \pm 2,592g$ e SHR-GSE: $292,33 \pm 1,732g$. Não houve diferença estatística entre os animais tratados e não tratados do mesmo grupo, porém foi observado uma diferença estatística entre os animais normotensos e hipertensos: Wistar-C e SHR-C; Wistar-GSE e SHR-C; W-C e SHR-GSE; W-GSE e SHR-GSE ($p < 0,001$).

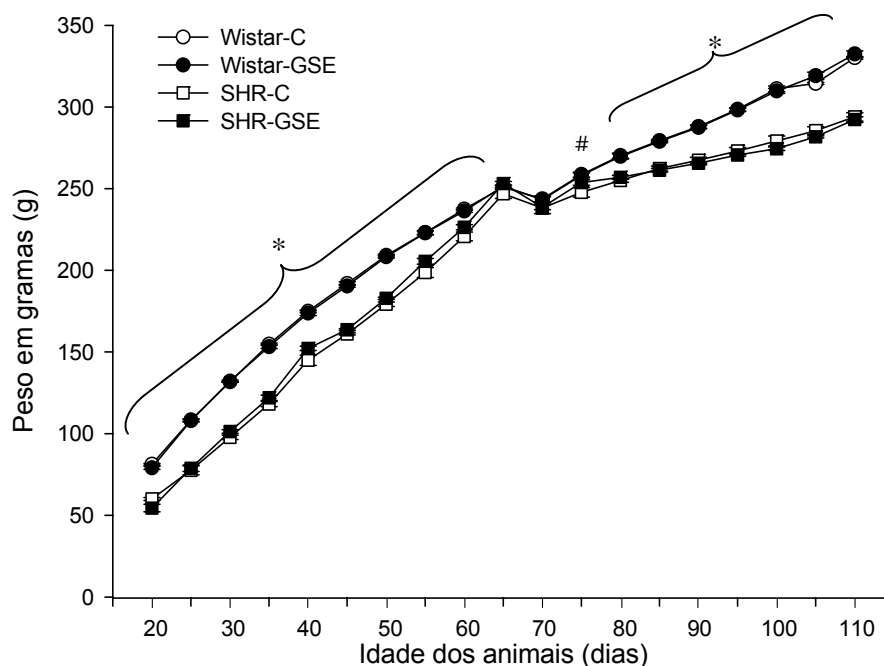


Figura 6 – Efeito do tratamento com GSE na peso corporal total dos animais normotensos e hipertensos, dos 20 aos 110 dias de vida. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. * Wistar-C x SHR-C; Wistar-C x SHR-GSE; Wistar-GSE x SHR-C e Wistar-GSE x SHR-GSE, $p < 0,001$. # Wistar-C x SHR-C e Wistar-GSE x SHR-C, $p < 0,05$.

4.3 Glicemia

Os animais SHR não apresentaram diferença nos níveis de glicemia de jejum, quando comparados aos controles (Wistar-C: $116,6 \pm 9,72$ mg/dl; Wistar-GSE: $121,3 \pm 5,21$ mg/dl; SHR-C: $99,1 \pm 4,66$ mg/dl; SHR-GSE: $99,9 \pm 8,83$ mg/dl), conseqüentemente o GSE não alterou esse perfil nos animais tratados.

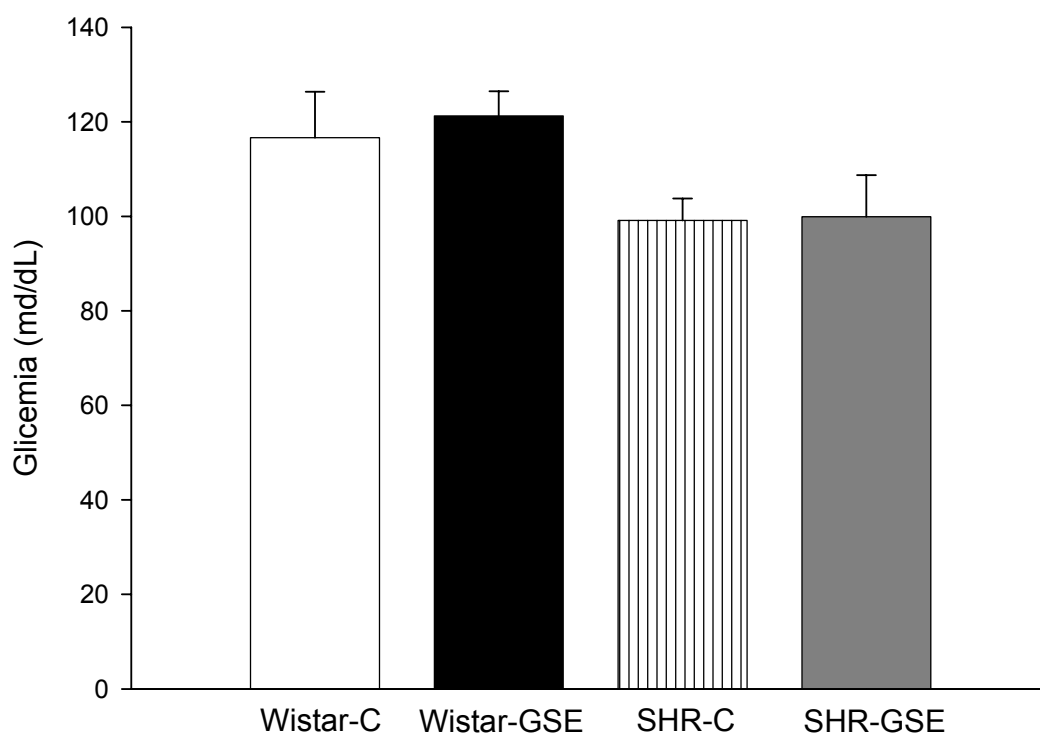


Figura 7 – Efeito do tratamento com GSE na glicemia de jejum dos animais normotensos e hipertensos, com 110 dias de vida e após 90 dias de tratamento com o extrato da casca de uva. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo.

4.4 Insulinemia

O grupo SHR apresentou uma diminuição dos níveis de insulinemia de jejum, quando comparados com os animais normotensos, porém não foi verificada nenhuma ação do extrato estudado (Wistar-C: $30,5 \pm 3,58$ ng/ml; Wistar-GSE: $27,8 \pm 3,65$ ng/ml; SHR-C: $18,6 \pm 1,87$ ng/ml; SHR-GSE: $18,6 \pm 1,38$ ng/ml). Estes resultados mostram uma diferença significativa entre os grupos: Wistar-C e SHR-C ($p < 0,05$); Wistar-GSE e SHR-C ($p < 0,001$); Wistar-C e SHR-GSE ($p < 0,05$); Wistar-GSE e SHR-GSE ($p < 0,001$).

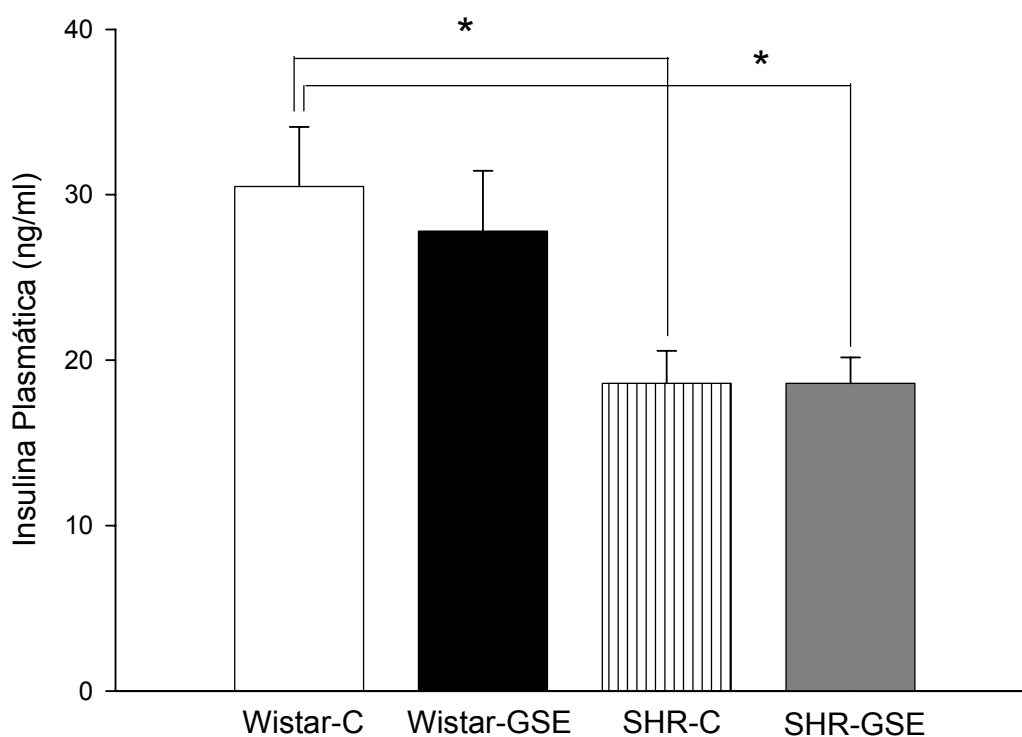


Figura 8 – Efeito do tratamento com GSE na insulinemia de jejum dos animais normotensos e hipertensos, com 110 dias de vida e após 90 dias de tratamento com o extrato da casca de uva. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. * $p < 0,05$.

4.5 Sensibilidade à Insulina

Através da Relação Insulina /Glicose, utilizada para analisar a sensibilidade à insulina, não observamos resistência à insulina nos animais hipertensos quando comparados aos controles (Wistar-C: $0,26 \pm 0,03$ UI; Wistar-GSE: $0,24 \pm 0,03$ UI; SHR-C: $0,19 \pm 0,03$ UI; SHR-GSE: $0,2 \pm 0,03$ UI).

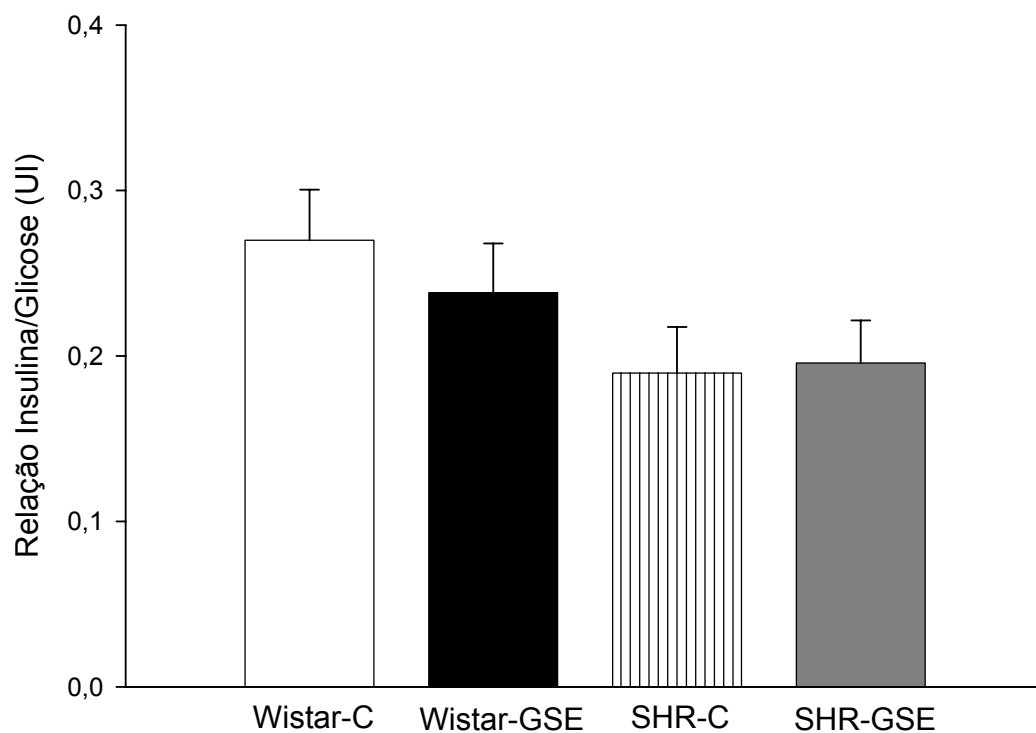


Figura 9 – Efeito do tratamento com GSE na sensibilidade à insulina dos animais normotensos e hipertensos, com 110 dias de vida e após 90 dias de tratamento com o extrato da casca de uva. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo.

4.6 Triglicerídeos Plasmáticos

Foi observado um aumento nos níveis de triglicerídeos plasmáticos no modelo SHR, quando comparado aos animais normotensos (Wistar-C: $27,1 \pm 3,62$ mg/dl X SHR-C: $48,5 \pm 2,84$ mg/dl; $p < 0,05$ e Wistar-GSE: $34,1 \pm 4,75$ mg/dl X SHR-C: $48,5 \pm 2,84$ mg/dl; $p < 0,05$). Ao tratar os animais hipertensos com GSE, obtivemos uma redução destes níveis à valores iguais à normalidade (SHR-C: $48,5 \pm 2,84$ mg/dl X SHR-GSE: $32 \pm 3,88$ mg/dl; $p < 0,05$; não havendo diferença estatística entre os grupos SHR-GSE X Wistar-C e/ou Wistar-GSE).

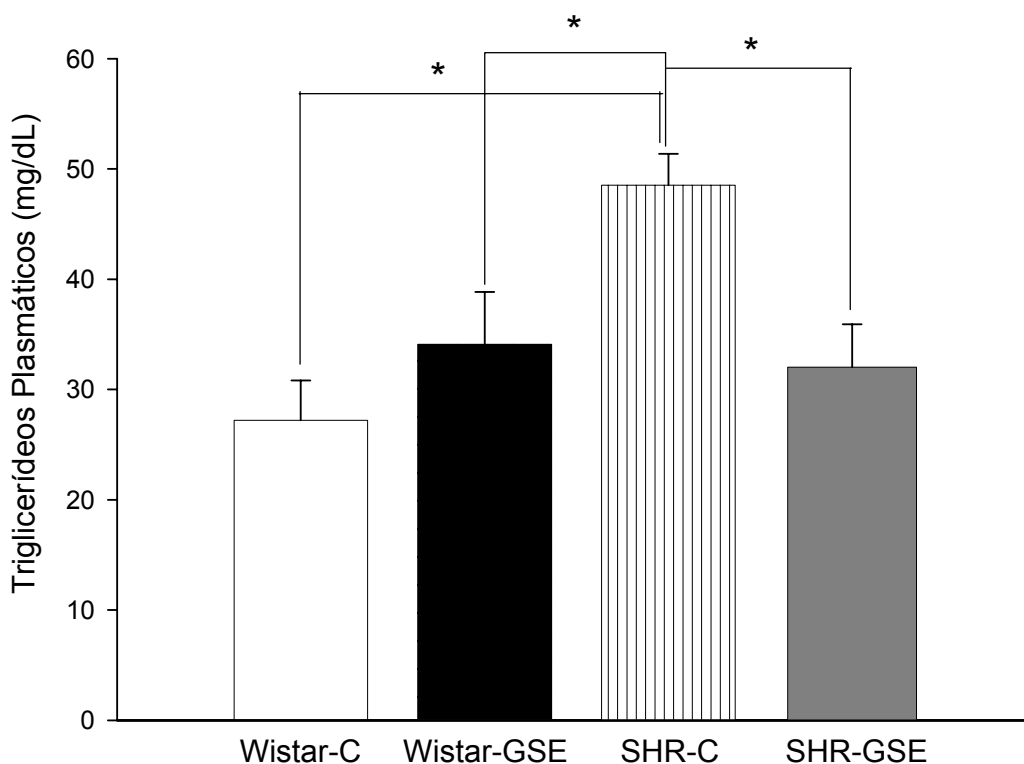


Figura 10 – Efeito do tratamento com GSE sobre os níveis de triglicerídeos plasmáticos dos animais normotensos e hipertensos, com 110 dias de vida e após 90 dias de tratamento com o extrato da casca de uva. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. * $p < 0,05$.

4.7 Colesterol Total Plasmático

O animal SHR apresenta níveis aumentados de colesterol total, quando comparados aos animais normotensos (SHR-C: $48,22 \pm 6,016$ mg/dl X Wistar-C: $21,23 \pm 1,913$ mg/dl, $p < 0,05$; SHR-C X Wistar-GSE: $28,16 \pm 2,720$ mg/dl, $p < 0,05$). A administração oral de GSE proporcionou uma diminuição significativa dos níveis plasmáticos de colesterol total nos animais SHR (SHR-C: $48,22 \pm 6,016$ mg/dl X SHR-GSE: $13,52 \pm 5,240$ mg/dl, $p < 0,001$). Não havendo diferença estatística entre os grupos SHR-GSE e Wistar.

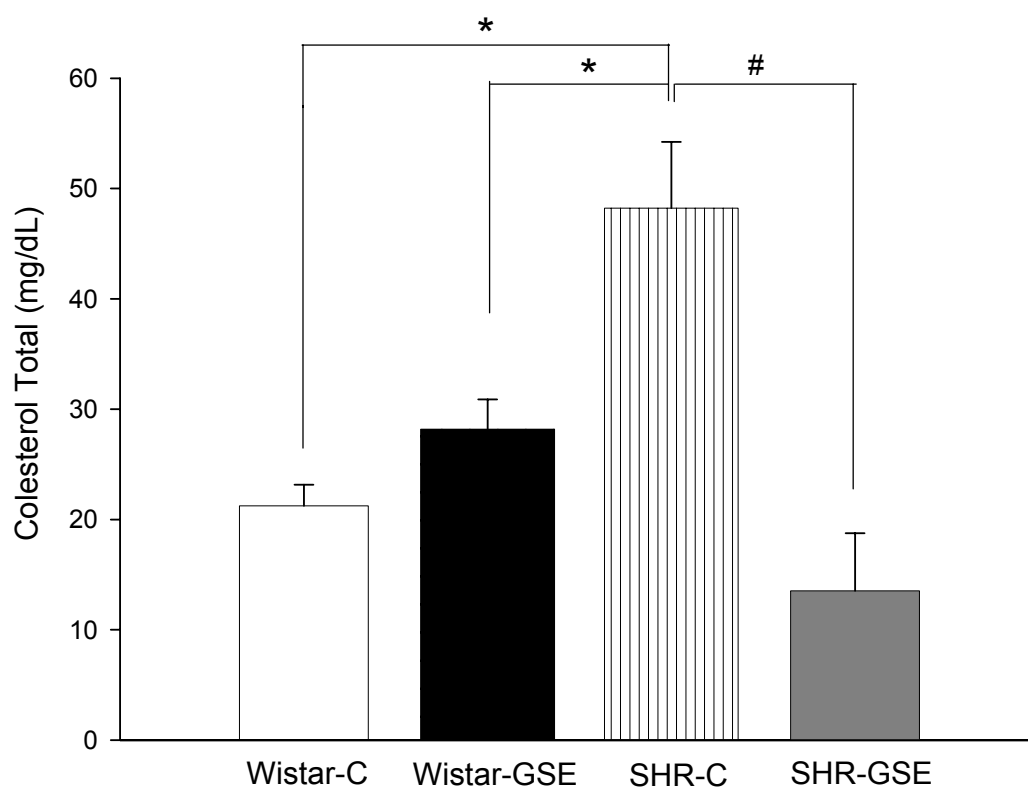


Figura 11 – Efeito do tratamento com GSE sobre os níveis de colesterol plasmáticos dos animais normotensos e hipertensos, com 110 dias de vida e após 90 dias de tratamento com o extrato da casca de uva. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ e # $p < 0,001$.

4.8 Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

4.8.1 Plasma

Foi observado uma maior formação de subprodutos da lipoperoxidação (malondialdeído – MDA) no plasma dos animais hipertensos (SHR-C), caracterizando um aumento da peroxidação lipídica no sangue destes animais (Wistar-C: $0,42 \pm 0,17$ nmol TBA/mg ptn. X SHR-C: $0,95 \pm 0,03$ nmol TBA/mg PTN.; $p < 0,001$ e Wistar-GSE: $0,45 \pm 0,04$ nmol TBA/mg ptn. X SHR-C: $0,95 \pm 0,03$ nmol TBA/mg ptn.; $p < 0,001$). Ao tratar os animais hipertensos com GSE, obtivemos uma redução das TBARS à valores iguais à normalidade (SHR-C: $0,95 \pm 0,03$ nmol TBA/mg ptn. X SHR-GSE: $0,54 \pm 0,04$ nmol TBA/mg ptn.; $p < 0,001$; não havendo diferença estatística entre os grupos SHR-GSE X Wistar-C e/ou Wistar-GSE).

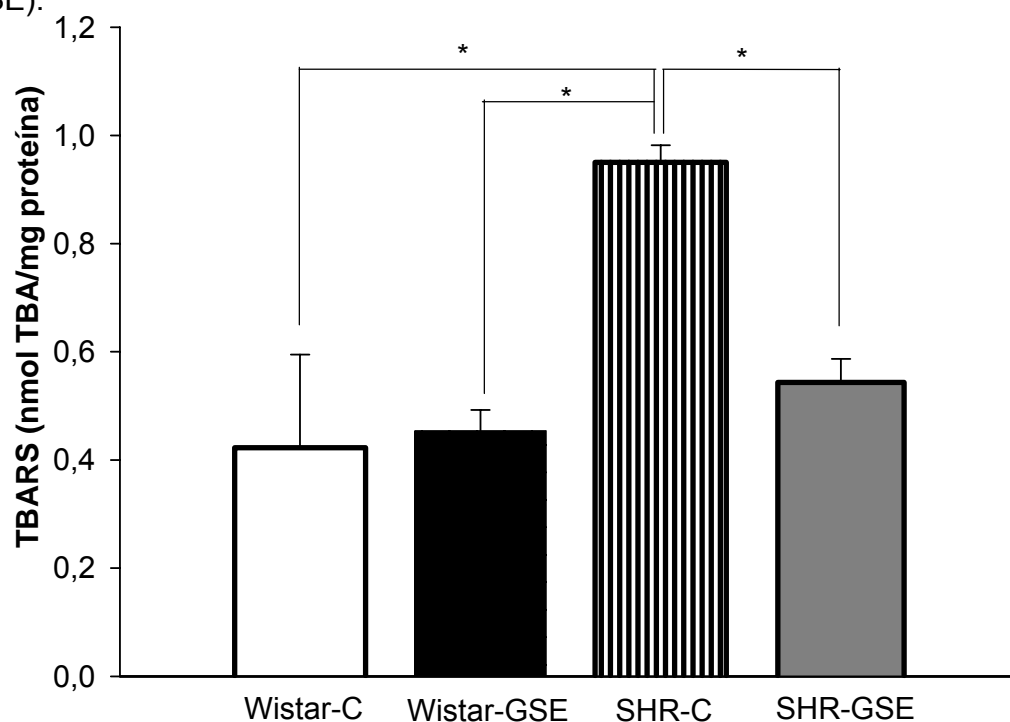


Figura 12 – Efeito do tratamento com GSE sobre os níveis de TBARS no Plasma dos animais normotensos e hipertensos, com 110 dias de vida e após 90 dias de tratamento com o extrato da casca de uva. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. * $p < 0,001$.

4.8.2 Rim

Não foi observado aumento na formação de TBARS no rim dos animais SHR-C, quando comparados com o Wistar-C. Porém, o extrato diminuiu a peroxidação lipídica nos grupo SHR-GSE, quando comparados ao SHR-C (Wistar-C: $0,46 \pm 0,06$ nmol TBA/mg ptn.; Wistar-GSE: $0,30 \pm 0,07$ nmol TBA/mg ptn.; SHR-C: $0,39 \pm 0,05$ nmol TBA/mg ptn.; SHR-GSE: $0,17 \pm 0,04$ nmol TBA/mg ptn.).

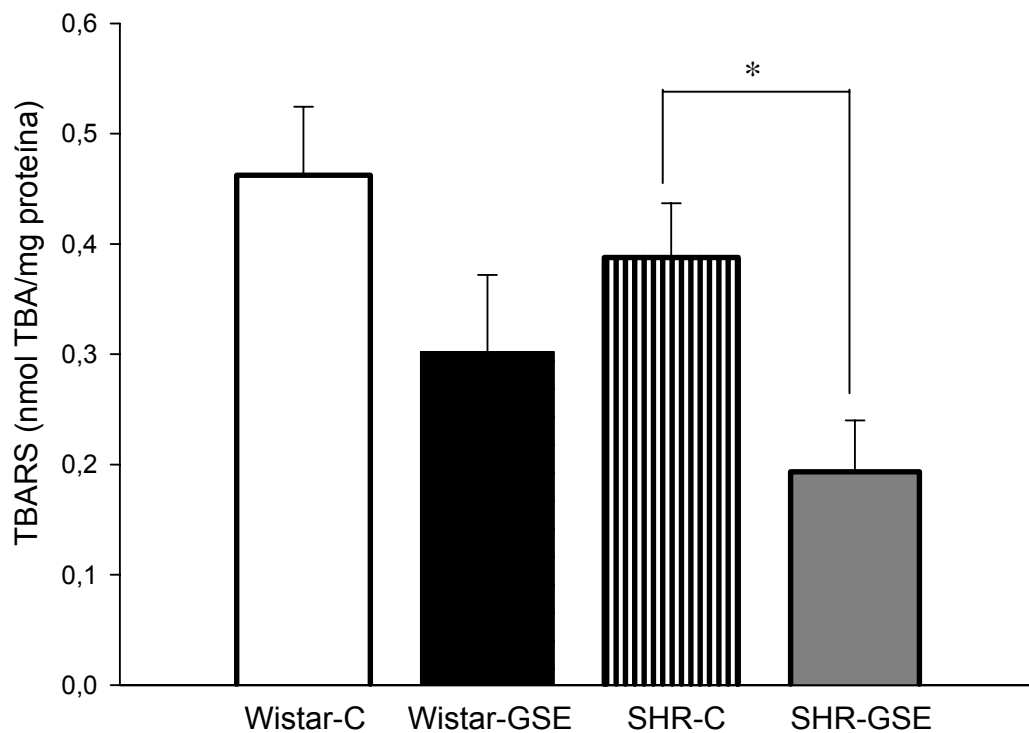


Figura 13 – Efeito do tratamento com GSE sobre os níveis de TBARS no Rim dos animais normotensos e hipertensos, com 110 dias de vida e após 90 dias de tratamento com o extrato da casca de uva. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. * $p < 0,05$

4.8.3 Aorta

Não foi observado aumento na formação de TBARS Na aorta dos animais SHR. Conseqüentemente o GSE não alterou esse perfil nos animais tratados (Wistar-C: $0,75 \pm 0,2$ nmol TBA/mg ptn.; Wistar-GSE: $0,62 \pm 0,12$ nmol TBA/mg ptn.; SHR-C: $0,50 \pm 0,09$ nmol TBA/mg ptn.; SHR-GSE: $0,51 \pm 0,06$ nmol TBA/mg ptn.).

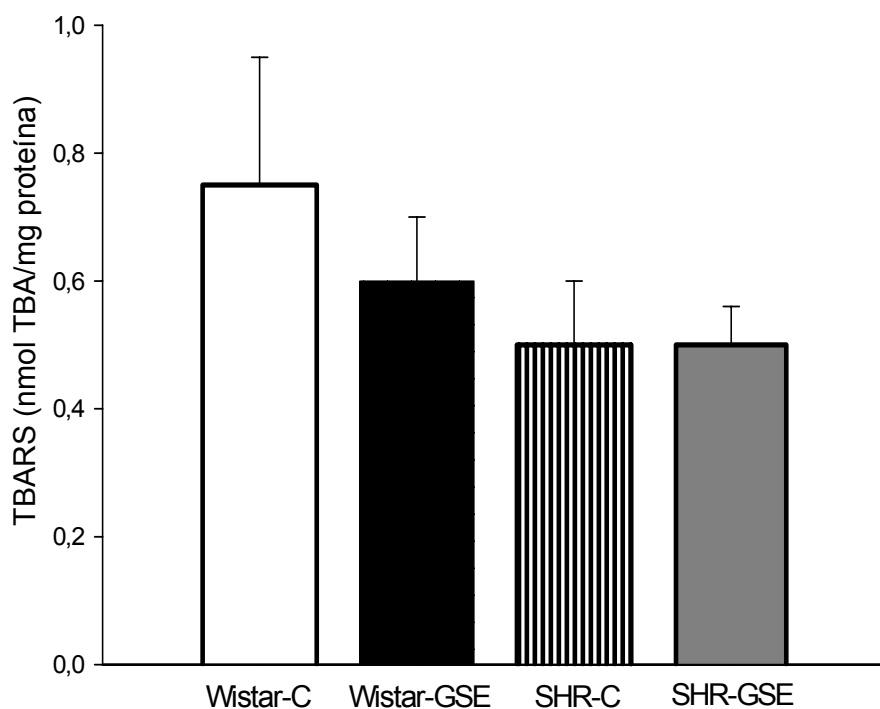


Figura 14 – Efeito do tratamento com GSE sobre os níveis de TBARS na Aorta dos animais normotensos e hipertensos, com 110 dias de vida e após 90 dias de tratamento com o extrato da casca de uva. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo.

4.9 Enzimas Antioxidantes.

4.9.1 Superóxido Dismutase (SOD)

4.9.1.1- Plasma

Não foi observado diferença na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no plasma dos animais hipertensos controle, quando comparados com os normotensos controle (SHR-C: $85,19 \pm 5,03$ U/mg ptn. X Wistar-C: $77,84 \pm 2,61$ U/mg ptn.). O grupo SHR-GSE apresentou um aumento significativo na atividade da SOD quando comparados com SHR-C (SHR-C: $85,19 \pm 5,03$ U/mg ptn. X SHR-GSE $295,83 \pm 25,46$ U/mg ptn.; $p < 0,05$), sendo o GSE eficiente também nos animais normotensos tratados (Wistar-C: $77,84 \pm 2,61$ U/mg ptn. X Wistar-GSE: $367,56 \pm 80,58$ U/mg ptn.; $p < 0,05$)

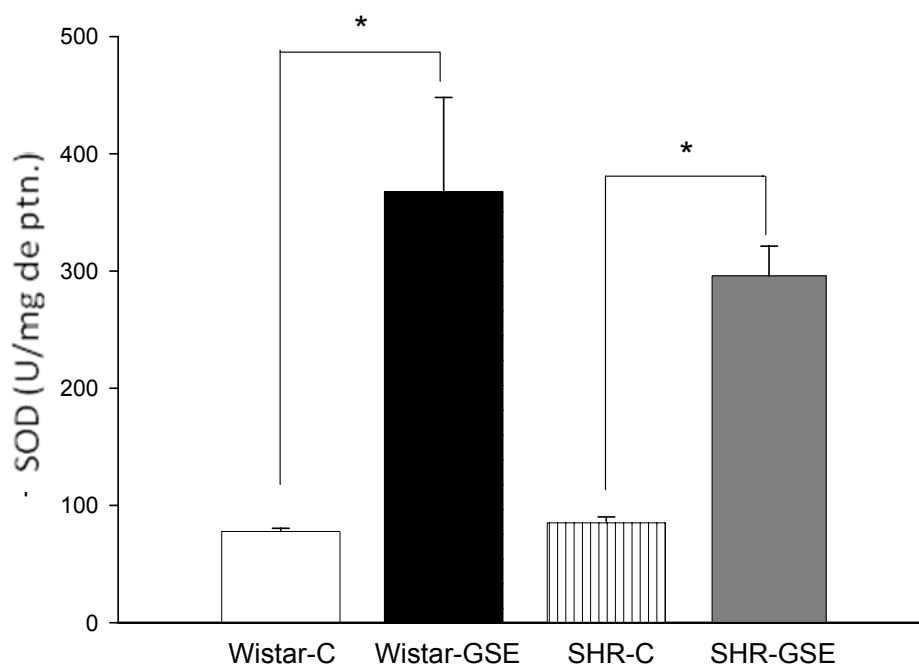


Figura 15 – Atividade da enzima superóxido dismutase no plasma dos animais normotensos (Wistar-C, Wistar-GSE) e hipertensos (SHR-C, SHR-GSE), com 110 dias de vida. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. * $p < 0,05$

4.9.1.2 - Rim

Não foi observado alteração na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no rim dos animais hipertensos controle, quando comparados com os normotensos controle (SHR-C: $57,2 \pm 8,05$ U/mg ptn. X Wistar-C: $72,0 \pm 12,9$ U/mg ptn.). Porém, a suplementação com o extrato da casca de uva aumentou a atividade desta enzima nos animais tratados (Wistar-C: $72,0 \pm 12,9$ U/mg ptn. X Wistar-GSE: $180,7 \pm 37,2$ U/mg ptn.; $p < 0,05$ e SHR-C: $57,2 \pm 8,05$ U/mg ptn. X SHR-GSE: $149,7 \pm 9,79$ U/mg ptn.; $p < 0,05$).

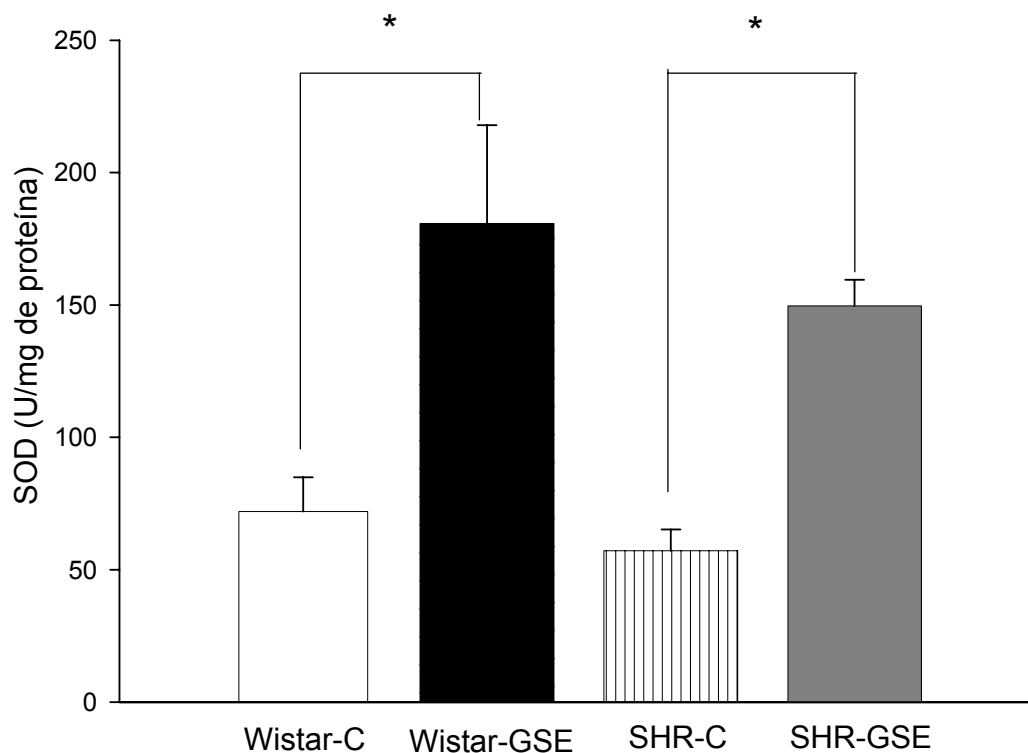


Figura 16 – Atividade da enzima superóxido dismutase no Rim dos animais normotensos (Wistar-C, Wistar-GSE) e hipertensos (SHR-C, SHR-GSE), com 110 dias de vida. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. * $p < 0,05$.

4.9.1.3 Aorta

Não foi observado alteração na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no rim dos animais hipertensos controle / GSE, quando comparados com os normotensos controle (SHR-C: $38,8 \pm 7,09$ U/mg ptn. X Wistar-C: $38,8 \pm 10,2$ U/mg ptn. e SHR-GSE: $90,8 \pm 25,4$ U/mg ptn. X Wistar-C: $38,8 \pm 10,2$ U/mg ptn.). Porém, os animais normotensos tratados com GSE apresentaram uma maior atividade da SOD neste tecido (Wistar-C: $38,8 \pm 10,2$ U/mg ptn. X Wistar-GSE: $159,6 \pm 56,4$ U/mg ptn.; $p < 0,05$ e SHR-C: $38,8 \pm 7,09$ U/mg ptn. X Wistar-GSE: $159,6 \pm 56,4$ U/mg ptn.; $p < 0,05$).

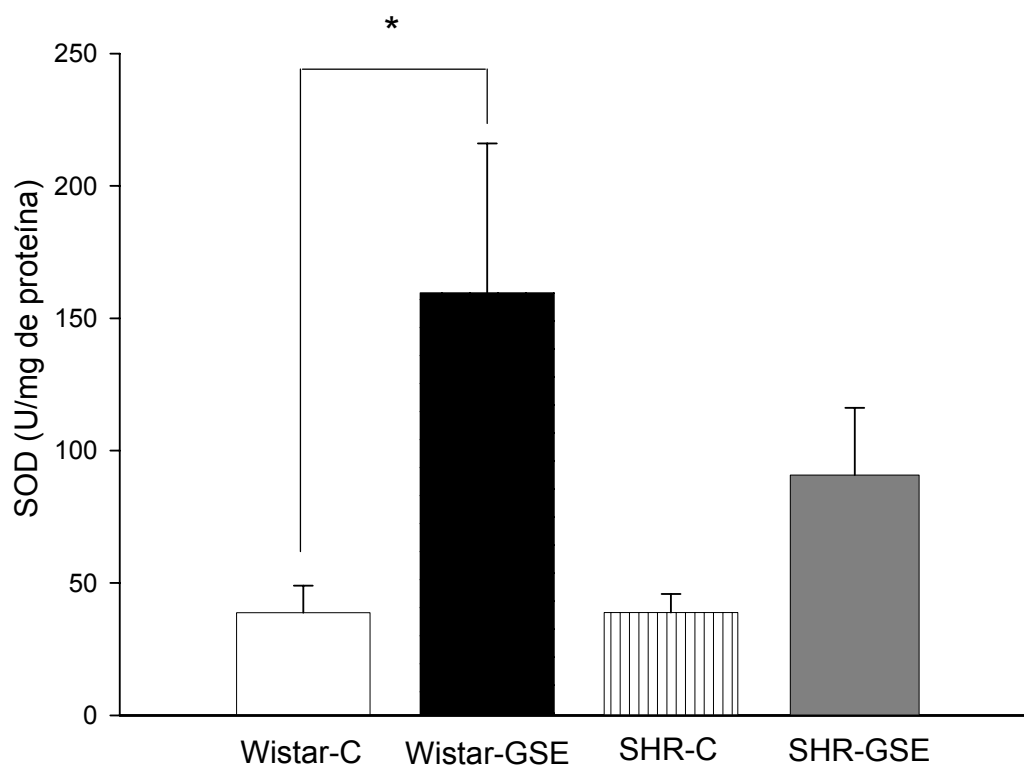


Figura 17 – Atividade da enzima superóxido dismutase na Aorta dos animais normotensos (Wistar-C, Wistar-GSE) e hipertensos (SHR-C, SHR-GSE), com 110 dias de vida. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. * $p < 0,05$.

4.9.2 Catalase

4.9.2.1 Plasma

Não houve alteração na atividade da enzima Catalase no plasma dos animais estudados (Wistar-C: $5,58 \pm 0,22$ U/mg ptn.; Wistar-GSE: $4,76 \pm 0,24$ U/mg ptn.; SHR-C: $5,14 \pm 0,27$ U/mg ptn.; SHR-GSE: $5,05 \pm 0,79$ U/mg ptn.).

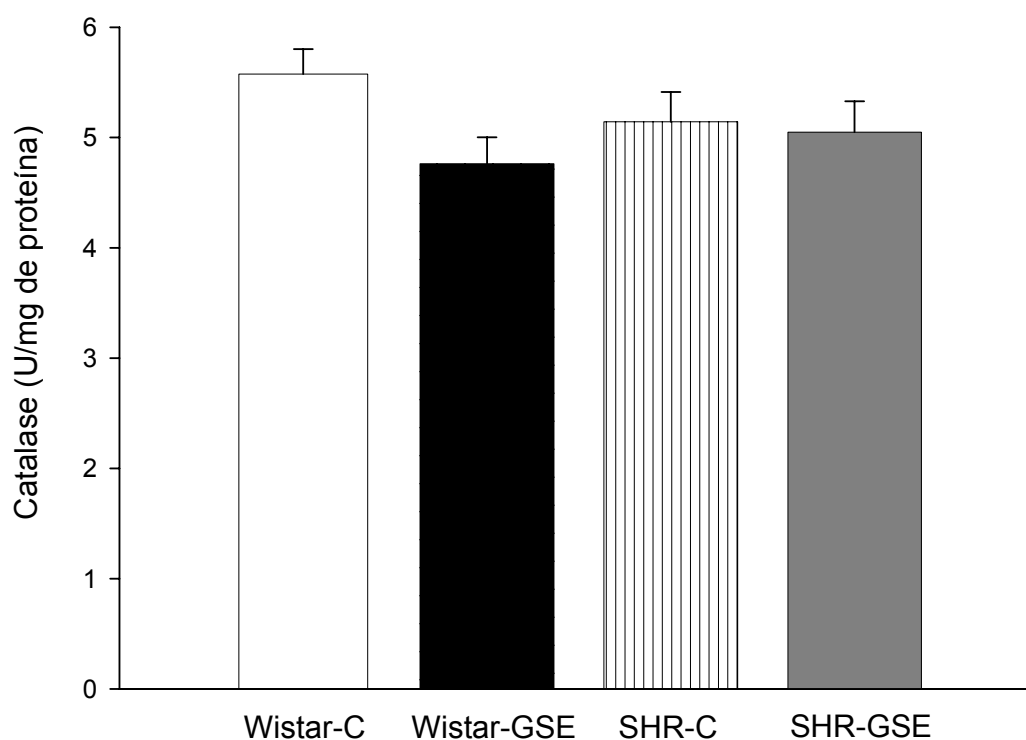


Figura 18 – Atividade da enzima catalase no Plasma dos animais normotensos (Wistar-C, Wistar-GSE) e hipertensos (SHR-C, SHR-GSE), com 110 dias de vida. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo.

4.9.2.2 Rim

Não houve alteração na atividade da enzima Catalase no rim esquerdo dos animais estudados (Wistar-C: $5,43 \pm 0,06$ U/mg ptn.; Wistar-GSE: $5,70 \pm 0,05$ U/mg ptn.; SHR-C: $5,63 \pm 0,56$ U/mg ptn.; SHR-GSE: $5,47 \pm 0,11$ U/mg ptn.).

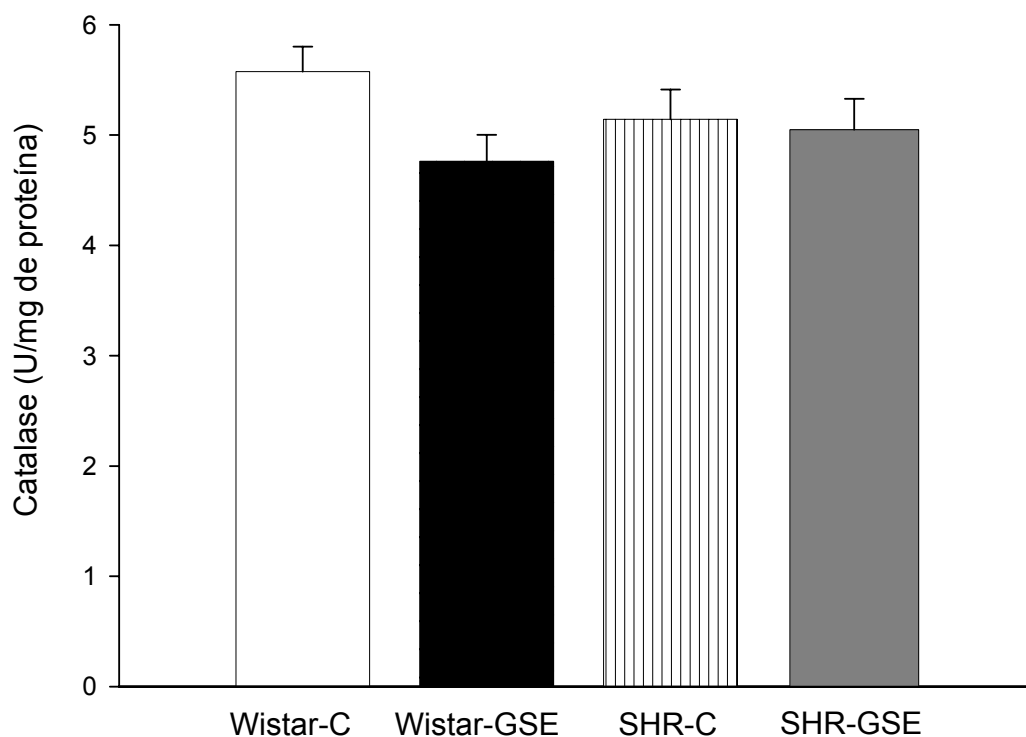


Figura 19 – Atividade da enzima catalase no Rim dos animais normotensos (Wistar-C, Wistar-GSE) e hipertensos (SHR-C, SHR-GSE), com 110 dias de vida. Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo.

5. Discussão

O presente resultado da ação anti-hipertensiva do GSE veio corroborar com os trabalhos já anteriormente publicados pelo nosso grupo (Soares de Moura e cols.,2002; Soares de Moura e cols.,2004). Porém, este estudo nos mostra pela primeira vez, que a suplementação com GSE reduziu a PA no modelo de hipertensão SHR. Entretanto, o extrato não alterou a PA dos animais normotensos.

Estudos mostraram que o efeito hipotensor produzido pelo GSE, bem como polifenóis, parecem envolver um fator relaxante derivado do endotélio, como o NO, visto que a sua resposta vasodilatadora foi reduzida significativamente pelo ácido deoxicólico e L-NAME, respectivamente em leito vascular mesentérico de ratos (Soares de Moura e cols.,2002).

A hipertensão arterial está associada com o aumento do estresse oxidativo vascular, porém existem controvérsias a respeito do que acontece primeiro. Esse estresse seria a causa ou a consequência do aumento da pressão arterial? (Grossman E., 2008).

Diversos estudos relatam que o consumo moderado de vinho tinto é benéfico para a prevenção e tratamento da HAS e que este efeito está mais ligado à quantidade de polifenóis do que ao teor alcoólico do vinho (Peng N. e cols., 2005 & López-Sepúlveda R. e cols., 2008).

Sugerimos que o efeito salutar do GSE se equivale ao efeito do TEMPOL (4 – Hidroxi – TEMPO 97% - mimético da SOD), o qual reduz a pressão arterial de SHR, porém não altera a PA nos animais normotensos (Ganten U. e cols., 1989),

indicando que esta ação anti-hipertensiva do extrato está relacionada em parte mecanismos antioxidantes.

É sabido que os radicais livres e outros compostos ativos podem estar envolvidos em vários processos biológicos. O desequilíbrio entre a formação e a remoção destas espécies, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou ainda do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante. Este processo favorece a ocorrência de ataques dessas ERO a componentes celulares, especialmente os lipídeos. Assim, a peroxidação lipídica provoca dano tecidual, o qual está relacionado com a patogênese de várias doenças, entre elas a hipertensão.

Encontramos um aumento de espécies do ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma dos animais hipertensos, caracterizando um aumento da peroxidação lipídica neste modelo animal. Resultado já mostrado por Friedman e colaboradores (Friedman J. e cols., 2003). O interessante foi que o GSE proporcionou uma diminuição significativa desse estresse oxidativo, o que nos mostra um efeito antioxidante do extrato de uva no plasma de animais hipertensos.

De acordo com Li Sun e cols. (2006), os animais SHR apresentam um aumento de mediadores pró-inflamatórios ($IL-1\beta$, $TNF\alpha$, ICAM-1, iNOS), que diminuem a capacidade antioxidante em tecidos importantes como: rim, fígado, coração e cérebro (Sun L. e cols., 2006). Porém, em nossos estudos, não encontramos diferença estatística na peroxidação lipídica no rim e aorta dos animais SHR quando comparados aos controles. Contudo, verificamos uma

diminuição de TBARS no rim dos animais SHR-GSE, o que nos sugere um efeito protetor do GSE.

As enzimas antioxidantes constituem a principal barreira de defesa contra o dano oxidativo. As mais potentes enzimas antioxidantes são a SOD, Catalase e Glutathione Peroxidase. A SOD age catalisando a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, já a catalase transforma o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A catalase é mais efetiva em níveis elevados de estresse oxidativo (Cai H., 2005).

Os resultados encontrados da atividade da SOD na aorta vão de acordo com estudos anteriormente publicados, onde não foi observado nenhuma diferença estatística entre os grupos SHR e Wistar, sugerindo que o possível efeito oxidativo não se dá pela diminuição desta enzima na aorta (Nakazono K. e cols., 1991). Os animais Wistar tratados com GSE apresentaram um aumento significativo da atividade da SOD neste tecido e nos SHR-GSE nossos estudos mostraram uma tendência ao aumento desta enzima.

Não foi encontrada diferença estatística na atividade de SOD nos rins dos animais hipertensos, quando comparados aos controles. Contudo, os grupos tratados com GSE (Wistar-GSE, SHR-GSE), apresentaram um aumento significativo desta enzima do tecido estudado, elucidando o efeito antioxidante do GSE. O que sugere, que o extrato da casca de uva, melhora a função antioxidante.

Uma vez que não foi encontrado estresse oxidativo nos tecidos analisados (aorta, rim), é bastante plausível que não haja diferença na atividade da enzima superóxido dismutase nos tecidos dos SHR-C quando comparados com Wistar-C.

Já no plasma, onde encontramos um aumento das espécies reativas do ácido thiobarbitúrico nos animais SHR-C e uma redução dessas espécies nos SHR-GSE, verificamos um aumento significativo da SOD nos animais tratados (SHR-GSE e W-GSE), o que nos sugere, que esta diminuição da peroxidação lipídica no plasma, se dá através do aumento da enzima superóxido dismutase, aumento este potencializado pela administração do extrato de uva. Estudos mostram, que a atividade da SOD no plasma está inversamente relacionado com a pressão arterial em pacientes com hipertensão (Simic DV. E cols., 2006).

Não foi observada diferença estatística na atividade da catalase nos animais hipertensos e tão pouco mudança desta nos animais tratados com GSE.

Conforme dito anteriormente, a Catalase é mais efetiva em casos de elevado dano oxidativo, o que nos sugere que o estresse nos tecidos dos animais estudados não está elevado a ponto de diminuir a sua atividade.

Estudos demonstram que o modelo experimental de hipertensão essencial (SHR) apresenta ainda intolerância à glicose, hiperinsulinemia e resistência á insulina quando comparados com animais normotensos (Swislocki A. e cols., 1993 & Hulman S. e cols., 1991). Mesmo anormalidades no metabolismo da glicose e na ação da insulina sendo encontrados no SHR (Gouveia LMFB. E cols., 2000) não obtivemos os mesmos achados neste estudo, onde a glicemia plasmática apresentou valores fisiológicos entre os animais estudados, caracterizando que o nosso modelo SHR é euglicêmico. Resultado este, que está de acordo com o estudo publicado por Swislocki e cols. em 1997, onde não encontra alteração na glicemia de animais hipertensos. Além disso, contradizendo os estudos anteriormente relatados, observamos uma diminuição da insulina plasmática no

nosso modelo de hipertensão, quando comparados aos controles e não encontramos diferença na sensibilidade à insulina entre os grupos estudados. A explicação para estes resultados seria a afirmação que variações individuais no “background” genético dos SHR podem influenciar a evolução da hipertensão e no metabolismo dos mesmos (Pinto, Y.M. e Ganten, D., 1998).

De acordo com a literatura (Mulvany M.J. e N. Niborg, 1980), animais normotensos apresentam peso corporal significativamente mais elevados que os SHR, o que vêm corroborar com os resultados encontrados neste estudo. Porém o GSE não apresentou influência no ganho ou perda ponderal.

A hipertensão arterial está diretamente relacionada com alterações no perfil lipídico (The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure, 2004). Anormalidades no metabolismo do colesterol e triglicerídeos são comumente encontradas no modelo de hipertensão essencial (Lerman LO. e cols., 2005). De acordo com Lerman, encontramos um aumento significativo do colesterol total e triglicerídeos no plasma do SHR, quando comparados aos normotensos. Porém, pela primeira vez, o GSE mostrou-se eficaz, como agente hipocolesterolêmico e Hipotrigliceridêmico, reduzindo esses níveis, no plasma dos animais hipertensos tratados com extrato, à valores de normalidade.

O mecanismo pelo qual o GSE induz a diminuição da PA nos animais SHR ainda não está completamente esclarecido. Os compostos fenólicos presentes no vinho tinto reduzem e/ou neutralizam os radicais livres e promovem a formação de NO (Marfella e cols., 2006). Este então, seria o possível mecanismo sugerido para o efeito antihipertensivo do GSE, já que o extrato aumenta a produção de NO

(Soares de Moura e cols., 2002; Soares de Moura e cols., 2004) provavelmente induzido pelo aumento das enzimas antioxidantes e uma diminuição da peroxidação lipídica. Todavia, mais estudos serão necessários para elucidar o mecanismo pelo qual o extrato de uva GSE atua no controle da hipertensão arterial.

6. Conclusão

De acordo com nossos resultados concluímos que o extrato de casca de uva apresenta um efeito anti-hipertensivo, antioxidante e redutor dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos, efeitos que podem participar da ação cardioprotetora da ingestão moderada de vinho tinto. Este estudo sugere uma possibilidade pré-clínica do efeito protetor do extrato obtido das uvas em pacientes com hipertensão.

7. Referências bibliográficas

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105: 121-126.

Anuário Estatístico de Saúde no Brasil/Ministério da saúde / Fundação Nacional de Saúde – Funasa / Centro Nacional de Epidemiologia Cenepi / Sistema de informação sobre mortalidade – Fundação IBGE, 2001.

Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology.* 2000;7;148(2-3):187-97.

Bannister JV., Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.*1982; 32:131-138.

Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med;* 1991;91:2-13.

Belló, A. Dano Oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres. In: Marroni, NP. E cols. *Estresse Oxidativo e Antioxidantes.* Porto Alegre: Editora Ulbra; 2002;p.15-19.

Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, Webb RC. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension* 2001;38:1107-11.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. The role of oxidant stress. *Circ Res* 2002;87:840-4.

Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res.* 2005;68:26 –36.

Calermajer DS. Endothelial Dysfunction: Does It Matter? Is it Reversible? *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1997;30(2):325-33.

Consolim-Colombo FM, Fiorino P. Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial sistêmica – aspectos clínicos. *Rev Bras de Hipertensão* 2005;12:251-5.

Corder R, Douthwaite JA, Lees DM, Khan NQ, Viseu Dos Santos AC, Wood EG, Carrier MJ. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature.* 2001; 20-27;414(6866):863-4.

da Luz PL, Coimbra SR. Wine, alcohol and atherosclerosis: clinical evidences and mechanisms. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(9):1275-95.

de Moura RS, Miranda DZ, Pinto AC, Sicca RF, Souza MA, Rubenich LM, Carvalho LC, Rangel BM, Tano T, Madeira SV, Resende AC. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilation and the antihypertensive effect of Brazilian red wine. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004 Sep;44(3):302-9.

de Moura RS, Resende AC, Moura AS, Maradei MF. Protective action of a hydroalcoholic extract of a vinifera grape skin on experimental preeclampsia in rats. *Hypertens Pregnancy.* 2007;26:89-100.

Demrow HS, Slane PR, Folts JD. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation.* 1995;15:1182-8.

Dórea EL, Lotufo PA. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica. *Rev Bras de Hipertensão.* 2004;7(6):86-9.

Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic. Biol. Med.* 1993;15 (4): 353-363.

Ferreira, AL; Matsubara, LS. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev. Méd. Brasil. 1997;43(1): 61-8.

Flesh M, Schwarz A, Bohm M. Effects of red and White on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries. Am. J. Physiol. 1998;275(4): H1183-90.

Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. Lancet. 1993;20:454-7.

Friedman J, Peleg E, Kagan T, Shnizer S, Rosenthal T. Oxidative Stress in Hypertensive, Diabetic, and Diabetic Hypertensive Rats. Am. J. Hypert. 2003;16:1049-1052.

Furchgott, RF, Vanhoutte, PM. Endothelium-derived relaxing and contractin factors. FASEB J. 1989;3(9): 2007-18.

Ganten U, Schrader G, Witt M, Zimmerman F, Ganten D, Stock G. Sexual Dimorphism of blood pressure in Spontaneously Hypertensive rats: Effects of anti-androgen treatment. J. Hypertension. 1989;7:721-6.

Gardés-Albert M, Jore D, Ferradini C. Membrane lipid peroxidation: pulse and γ -radiolysis in oxyradical research. In Vigo-Pelfrey C (ed): Membrane Lipid peroxidation. 1th ed. Santa Clara, CRC Press, 1991;2-30.

Griendling KK, Fitzgerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003(a);108:1912-6.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NADPH oxidase. Role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*. 2000;86:494-501.

Grossman E. Does Increased Oxidative Stress cause Hypertension? *Diabetes Care*. 2008;(Suppl.2):S185-S189.

Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*.1995;41(12):1819-1828.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radical in Biology and Medicine*. 4 ed. Oxford: Oxford University Press. 1989; 543p.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radical in Biology and Medicine*. 4 ed. Oxford: Oxford University Press. 2007; 851p.

Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Semin Hmatol.* 1989;26:277-85.

Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 1993;342(8878):1007-11.

Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med.* 2002;346:1954–1962.

Houston MC. Nutraceuticals, vitamins, antioxidants, and minerals in the prevention and treatment of hypertension. *Prog Cardiovasc Dis.* 2005;47:396–449.

Hulman S, Falkner B, Chen YQ. Insulin Resistance in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Metabolism.* 1991;40:359-361.

Irigoyen MC, Fiorino P, De Angelis K, Krieger EM. Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial: reflexos cardiocirculatórios. *Rev Bras de Hipertensão.* 2005;12:229-33.

Kitiyakara C, Wilcox CS. Antioxidants for hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1998;7:531–538.

Lasségue B, Griendling K. Reactive oxygen species in hypertension. *Am J Hypertens*. 2004;17:852-60.

Laurindo FRM, Souza HP, Luz PL. Estresse oxidativo: um denominador comum de condições vasculares patológicas. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 1998;8(2):344-55.

Lee VM, Quinn PA, Jennings SC, Ng LL. Neutrophil activation and production of reactive oxygen species in pre-eclampsia. *J Hypertens*. 2003;21:395–402.

Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C. Animal models of hypertension: An overview. *J.Lab. Clin. Méd*. 2005;146:3-160/173.

Lessa I. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica e da insuficiência cardíaca no Brasil. *Rev Bras de Hipertensão* 2001;8(4):383-92.

López-Sepúlveda R, Jiménez R, Romero M, Zarzuelo MJ, Sánchez M, Gómez-Guzmán M, Vargas F, O`Valle F e cols. Wine Polyphenols Improve Endothelial Function in Large Vessels of Female Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 2008;51:1088-1095.

Lusis, A.J. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-41.

Madeira SV, de Castro Resende A, Ognibene DT, de Sousa MA, Soares de Moura R. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilator effect of an alcohol-free extract obtained from a vinifera grape skin. *Pharmacol Res.* 2005;52:321-7.

Malinski T. Understanding nitric oxide physiology in the heart: a nanomedical approach. *Am J Cardio.* 2005;96 Suppl 1:13-24.

Marfella R, Cacciapuoti F, Siniscalchi M, Sasso FC, Marchese F, Cinone F, et al. Effect of moderate red wine intake on cardiac prognosis after recent myocardial infarction of subjects with type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2006;23:974-81.

Mcintyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension. The role of superoxide anion. *Hypertension.* 1999;34:539-45.

Mulvany MJ, Nyborg N. An Increased Calcium Sensitivity Of Mesenteric Resistance Vessels In Young And Adult Spontaneously Hypertensive Rats. *Br. J. Pharmac.* 1980;71, 585-596.

Paravicini TM, Touyz RM. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension. *Diabetes Care.* 2008;31 (Suppl.2): S170-S180.

Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res.* 2006;71:247-58.

Park JB, Touyz RM, Chen X, Schiffrin EL. Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2002;15:78–84.

Peng N, Clark JT, Prasain J, Kim H, White R, Wyss JM. Antihypertensive and cognitive effects of grape polyphenols in estrogen-depleted, female, spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005;289:R771-R775.

Pinto, Y.M., Ganten, D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc. Res.* 1998;39(1):77-88.

Portaluppi F, Boari B, Manfredini R. Oxidative stress in essential hypertension. *Curr Pharm Design.* 2004;10(14):1695-8.

Okoshi MP, Okoshi k, Zornoff LAM, Inoue RMT, Paiva SAR, Matsubara LS. Hipertensão arterial sistêmica. Diagnóstico, evolução e tratamento. *Rev Brás. Clinica & Terapêutica.* 2001;27(6):228-34.

Olmos RD, Lotufo PA. Epidemiologia da hipertensão arterial no Brasil e no mundo. *Rev Bras de Hipertensão.* 2002;9(1):21-3.

Ramachandran A, Levonen AL, Brookes PS, Ceaser E, Shiva S, Barone MC, Darley-Usmar V. Mitochondria, nitric oxide, and cardiovascular dysfunction. *Free Rad Biol Med.* 2002;33(11):1465-34.

Reckelhoff JF, Romero C. Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;284:R893-R912.

Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 1992;20:1523-6.

Rodriguez-Iturbe B, Zhan CD, Quiroz Y, Sindhu RK, Vaziri ND. Antioxidant-rich diet relieves hypertension and reduces renal immune infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2003;41:341–346.

Romero JC, Reckelhoff JF. Oxidative stress may explain how hypertension is maintained by normal levels of angiotensin II. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33:653-60.

Salido FP, Fernández JJR. Influencia de los radicales libres em el envejecimento celular. *OFFARM.*2002;21(7):96-100.

Sampaio WO, Santos RAS. Aplicações clínicas dos mecanismos fisiopatológicos da hipertensão arterial. Sistema renina-angiotensina: bases fisiopatológicas. *Rev Bras de Hipertensão* 2004;11(1):67-70.

Sans, S. Kesteloot, H., Kromhout, D. The burden of cardiovascular diseases mortality in Europe Task Force of the European Society of Cardiology on Cardiovascular Mortality and Morbidity Statistics in Europe. *Eur. Heart J.* 1997; 18:1231-48.

Shokoji T, Nishiyama A, Fujisawa Y, Hitomi H, Kiyomoto H, Takahashi N, Kimura S, Kohno M, Abe Y. Renal sympathetic nerve responses to tempol in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2003;41:266–273.

Sies H. Oxidative Stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 1999; 77:36-39.

Simic DV, Mimic-Oka J, Pljesa-Ercegovac M, Savic-Radojevic A, Opacic M, Matic D, Ivanovic B, Simic T: Byproducts of oxidative protein damage and antioxidant enzyme activities in plasma of patients with different degrees of essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2006;20: 149–155.

Soares de Moura, R. Efeito Cradioprotetor do vinho. *Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica.* 2003;v.1, mai.

Soares de Moura R, Costa Viana FS, Souza MA, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EP et al. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *J Pharm Pharmacol.* 2002;54:1515-20.

ST. Leger, A.S., Cochrane, A.L., Moore, F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*. 2004;1(N.8124):302-9.

Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1999;100(10):1050-5.

Swislock A, Tsuzuki A. Insulin resistance and hypertension: glucose intolerance, hyperinsulinemia, and elevated free fatty acids in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Am. J. Med. Sci*. 1993;306:282-286.

Swislock ALM, Goodman MN, Khuu DT, Fann KY. Insulin resistance and hypertension: In vivo and In Vitro Insulin Action in Skeletal Muscle in Spontaneously Hypertensive and Wistar Kyoto Rats. *Am. J. Hypertension*. 1997;10:1159-1164.

Teixeira MT, Moreira ASB, França GC, Garcia E, Resende AC, Moura AS, Soares de Moura R. Effect of a vinifera (*Vitis vinifera*) grape skin extract (ACH09) on hyperglycemia and insulin signaling system of alloxan treated mice. *Eur J Hypertension* 2007;25:S72.

The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. U . S . Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute. National High Blood Pressure Education Program. 2004; NIH Publication No. 04-5230.

Touyz RM. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Current Hypertension Reports*. 2000; 2: 98-105.

Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension. What is the clinical significance? *Hypertension* 2004;44:248-152.

Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological Reviews*. 2000;52: 639-672.

Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol*. 2004;122:339-59.

Wallerath T, Poleo D, Li H, Forstermann U. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J Am Coll Cardiol*. 2003;5:471-8.

Ward NC, Hodgson JM, Puddey IB, Mori TA, Beilin LJ, Croft KD. Oxidative stress in human hypertension: association with antihypertensive treatment, gender, nutrition, and lifestyle. *Free Rad Biol Med.* 2004;36(2):226-32.

Wassmann, S., Wassmann, K., Nickenig, G. Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells. *Hypertension.* 2004;44:381-386.

Waterhouse AL. Wine phenolics. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;957:21-36.

Wolf G, Wenzel UO. Angiotensin II and cell cycle regulation. *Hypertension.* 2004;43: 693-698.

V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Rev Bras de Hipertensão.* 2006;13(4):260-2.

Violi F, Loffredo L, Mucella L, Marcocchia A. Should antiioxidant status be considered in interventional trial with antioxidants? *Heart.* 2004;90:598-602.

Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diez J. Oxidative stress in arterial hypertension. Role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension.* 2001;38:1935-9.

Zern TL, Fernandez ML. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J Nutr.* 2005;135(10):2291-4.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)