

Efeitos do extrato etanólico da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* nas fibras elásticas e túnica média da aorta de camundongos C57BL6J em um modelo de arteriosclerose experimental¹

RODRIGO FREITAS MONTE BISPO

Doutor em Biotecnologia pelo Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO). Universidade Federal de Alagoas –UFAL
GUILHERME BENJAMIN BRANDÃO PITTA

Professor Associado da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL), orientador de doutorado RENORBIO - Rede Nordeste de Biotecnologia e mestrado e doutorado orientador em Cirurgia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

ALDEMAR ARAÚJO DE CASTRO

Professor assistente da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL) e, Cirurgião Vascular Hospital Geral do Estado Oswaldo Brandão Vilela
ROSANE PEREIRA DOS REIS

Doutora em Biotecnologia pelo Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO). Universidade Federal de Alagoas –UFAL
DANIELE GONÇALVES BEZERRA

Professora Assistente da Universidade Federal de Alagoas – UFAL. Doutora em Biologia Humana e Experimental. Universidade Estadual do Rio de Janeiro, UERJ, Brasil

Abstract

Arteriosclerosis is responsible for the highest rate of morbidity and mortality that occurs in the world. This disease occurs initially through the accumulation of cholesterol and proliferation of smooth muscle cells in the endothelium, which leads to its inflammation, hardening and thickening of the artery wall. The objectives are to verify the amount of elastic fibers and thickness of the tunic media of the thoracic aorta artery of mice induced to experimental arteriosclerosis. The study was a randomised preclinical trial in experimental animals for 42 days. The animals were C57BL6J mice, submitted to an

¹ Effects of the ethanol extract of *Himatanthus bracteatus* and *Ocotea longifolia* on elastic fibers and tunic media of the aorta of C57BL6J mice in an experimental arteriosclerosis model

Rodrigo Freitas Monte Bispo, Guilherme Benjamin Brandão Pitta, Aldemar Araújo de Castro, Rosane Pereira dos Reis, Daniele Gonçalves Bezerra- **Efeitos do extrato etanólico da Himatanthus bracteatus e Ocotea longifolia nas fibras elásticas e túnica média da aorta de camundongos C57BL6J em um modelo de arteriosclerose experimental**

arteriosclerotic diet (1.25% cholesterol, 0.5% cholic acid and 15% fat). The animals were divided into: group C (serum control 1mL physiological 0.9%, n=7), group H (hyperlipidemic 1.25% cholesterol, 0.5% cholic acid and fat 15%, n=7), group H1 (Himatanthus bracteatus 25mg/mL, n=7), group H2 (Himatanthus bracteatus 12.5mg/mL, n=7), group O1 (Ocotea longifolia 25mg/mL, n=7), group O2 (Ocotea longifolia 12.5mg/mL, n=7), rosuvastatin group 0.24mg/mL, n=7) total of 49 animals. The ethanol extracts of Himatanthus bracteatus and Ocotea longifolia (at concentrations 25mg/mL and 12.5mg/mL) did not significantly reduce the thickness of the tunic mean of the thoracic aorta, however, there was a reduction in relation to the average thickness es. biologically relevant. The ethanol extract of Ocotea longifolia 12.5mg/mL significantly increased the percentage of elastic fibers, suggesting that the extract has the ability to induce the formation and development of elastin.

Keywords: Arteriosclerosis. Mice. *Himatanthus bracteatus*. *Ocotea longifolia*. elastic fibers.

Resumo

A arteriosclerose é responsável pelo maior índice de morbidade e mortalidade que ocorre no mundo. Esta doença ocorre inicialmente através do acúmulo de colesterol e proliferação de células musculares lisas no endotélio, que leva a sua inflamação, endurecimento e espessamento da parede das artérias. Os objetivos são verificar a quantidade de fibras elásticas e espessura da túnica média da artéria aorta torácica de camundongos induzidos a arteriosclerose experimental. O estudo foi um ensaio pré-clínico aleatório em animais de experimentação por 42 dias. Os animais foram camundongos C57BL6J, submetidos a dieta arteriosclerótica (1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico e gordura de 15%). Os animais foram divididos em: grupo C (controle 1mL de soro fisiológico 0,9%, n=7), grupo H (hiperlipidêmico 1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico e gordura de 15%, n=7), grupo H1 (Himatanthus bracteatus 25mg/mL, n=7), grupo H2 (Himatanthus bracteatus 12,5mg/mL, n=7), grupo O1 (Ocotea longifolia 25mg/mL, n=7), grupo O2 (Ocotea longifolia 12,5mg/mL,

Rodrigo Freitas Monte Bispo, Guilherme Benjamin Brandão Pitta, Aldemar Araújo de Castro, Rosane Pereira dos Reis, Daniele Gonçalves Bezerra- **Efeitos do extrato etanólico da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* nas fibras elásticas e túnica média da aorta de camundongos C57BL6J em um modelo de arteriosclerose experimental**

*n=7), grupo rosuvastatina 0,24mg/mL, n=7) total de 49 aniamais. Os extratos etanólicos da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* (nas concentrações 25mg/mL e 12,5mg/mL) não reduziram significativamente a espessura da túnica média da aorta torácica, contudo, houve redução em relação a média das espessuras sendo biologicamente relevante. O extrato etanólico da *Ocotea longifolia* 12,5mg/mL aumentou significativamente o percentual das fibras elásticas, sugerindo que o extrato possui capacidade induzir a formação e desenvolvimento de elastina.*

Palavras-Chaves: Arteriosclerose. Camundongos. *Himatanthus bracteatus*. *Ocotea longifolia*. Fibras elásticas.

INTRODUÇÃO

Os efeitos de várias substâncias têm sido difundidas em vários meios de comunicação. Na medicina popular várias plantas estão sendo utilizadas para combater as doenças cardiovasculares. A arteriosclerose é responsável pelo maior índice de morbidade e mortalidade que ocorre no mundo. Esta doença ocorre inicialmente através do acúmulo de colesterol e proliferação de células musculares lisas no endotélio, que leva a sua inflamação, endurecimento e espessamento da parede das artérias (CORREA-CAMACHO et al, 2007).

No Brasil, o Ministério da Saúde regulamentou a proposta de Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, que incentiva a pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos a partir de plantas medicinais. O objetivo desta política é garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinal e fitoterápico, promovendo a utilização sustentável da biodiversidade e o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BARROS et al, 2007).

Realizamos uma pesquisa em várias bases de dados sobre artigos publicados com as plantas *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* e a maioria dos trabalhos publicados verificavam a atividade

antinociceptiva, estudos taxonômicos, capacidade antifúngica e antitumoral, encontrou-se poucos artigos verificando o efeito dos extratos etanólicos das plantas *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* na arteriosclerose, o que fez indagar seu efeito nas fibras elásticas, túnica média arterial e perfil lipídico em camundongos. Assim, é relevante responder à pergunta de pesquisa: qual o efeito da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* nas fibras elásticas e túnica média de camundongos C57BL6J submetidos um modelo de arteriosclerose experimental?

Desta forma, o objetivo geral desse estudo foi verificar a eficácia dos extratos etanólicos da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* na redução do espessamento da túnica média e no aumento do percentual de fibras elásticas da aorta torácica de camundongos C57BL6J submetidos a um modelo de arteriosclerose experimental, e como específicos: Quantificar a espessura da túnica média dos animais tratados; Determinar o colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos e glicemia dos camundongos e Verificar massa corpórea dos animais e o peso do coração.

MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas - UNCISAL, Maceió, sob o número 60-A (anexo). Trata-se de um Ensaio pré-clínico aleatório em animais de experimentação por 42 dias, realizado no Biotério da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas - UNCISAL, Maceió.

A amostra do estudo foi Foram usados 49 camundongos C57BL6J machos idade de 3 meses, oriundos do biotério da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas – UNCISAL e foram distribuídos em 7 grupos, os animais pesavam entre 30,90g e 24,82g. Os animais distribuídos utilizando a técnica de randomização com curva em Z. O animais receberam um número de 1 a 49 e depois distribuídos em cada grupo obedecendo a ordem do animal mais pesado para o mais leve, como demonstra a tabela abaixo:

Rodrigo Freitas Monte Bispo, Guilherme Benjamin Brandão Pitta, Aldemar Araújo de Castro, Rosane Pereira dos Reis, Daniele Gonçalves Bezerra- **Efeitos do extrato etanólico da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* nas fibras elásticas e túnica média da aorta de camundongos C57BL6J em um modelo de arteriosclerose experimental**

Grupo Controle (n=7) Peso (g) do animal e número	Grupo Hiperlipidêmico (n=7) Peso (g) do animal e número	Grupo Rosuvastatina 0,24mg/mL (n=7) Peso (g) do animal e número	Grupo Ocotea longifolia I 25mg/mL (n=7) Peso(g) do animal e número	Grupo Ocotea longifolia II 1,25mg/mL (n=7) Peso(g) do animal e número	Grupo Himatanthus bracteatusI 25mg/mL (n=7) Peso(g) do animal e número	Grupo Himatanthus bracteatusI 25mg/mL (n=7) Peso(g) do animal e número
30,90	30,81	30,45	30,18	30,15	29,81	29,79
29,68	28,96	28,89	28,88	28,88	28,85	28,71
28,48	28,41	28,33	28,24	28,21	28,16	28,08
28,02	27,87	27,68	27,49	27,56	27,55	27,43
27,17	27,12	26,97	26,96	26,92	26,86	26,77
26,75	26,56	26,48	26,36	26,33	26,25	25,98
25,52	25,40	25,36	25,29	25,06	24,85	24,82

Os animais foram distribuídos em gaiolas individuais e a identificação do animal foi feita por meio de escrita à tinta azul indelével na cauda, com caneta tipo piloto permanente (*permanent mark*®), seguindo as marcações abaixo:

O camundongo é marcado pela cauda, então para melhor identificação foi realizado esse processo de marcação com caneta permanente de cores azul ou preta, onde são pintados em formas de listras finas e grossas, então as listras , que são finas, equivale a 1, e as listras mais grossas , equivale a 3, sendo assim faz o somatório para



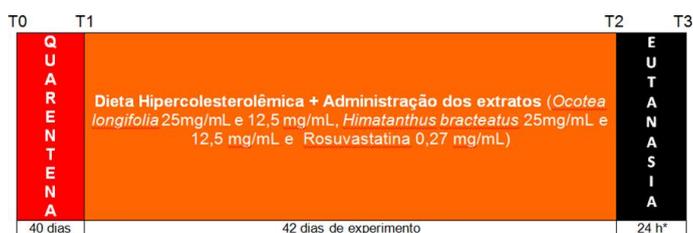
identificar os animais.

1	2	3	4	5	6	7
						

Manejo dos animais

Optou-se pelo manejo fechado dos animais e a experimentação foi realizada no próprio biotério da UNCISAL, onde se dispunha de ambiente propício para os mesmos, com sistema de ventilação exaustão forçado, períodos de luminosidade controlada, temperatura média de 20°C, ruído mínimo e umidade em torno de 50%. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas e individualizadas. A dieta foi constituída de água e ração comercial granulada para o grupo controle (Presence® ratos e camundongos) *ad libitum*, durante os 42 dias do experimento.

Os camundongos foram pesados no início e término do experimento, para avaliação de seu estado nutricional, em balança digital de precisão. A calibragem foi feita antes da pesagem de cada um dos animais. Iniciou-se e concluiu-se a pesquisa com 49 animais,



*O experimento foi iniciado com 1 semana de diferença entre os grupos.

Onde: T0 é o tempo inicial, T1 é o início da dieta hiperlipidêmica e o tratamento com os extratos, T2 a T3 é o início da eutanásia.

Preparo e administração da dieta aterogênica

A ração ofertada *ad libitum* ao grupo controle foi a de marca PRESENCE® (ratos e camundongos) e para os outros 6 grupos foi confeccionada na PRAGSOLUÇÕES® (biociências), a dieta arteriosclerótica (1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico e gordura de 15%).

Substâncias e grupos:

O grupo controle (C) recebeu a ração PRESENCE® (ratos e camundongos) *ad libitum* e diariamente 1mL de soro fisiológico a 0,9% com o auxílio de uma seringa acoplada a uma agulha de gavagem por via oral. O grupo hiperlipidêmico (H) recebeu a ração confeccionada na

PRAGSOLUÇÕES® (biociências), a dieta arteriosclerótica (1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico e gordura de 15%) ofertada ad libitum durante 42 dias (SHIMIZU et al, 2014).

Os grupos dos extratos antecedendo o experimento realizamos um procedimento piloto para encontrar a DL-50 (dose letal), assim separamos alguns camundongos C57BL6J e dividimos em grupos de 5 animais (cada grupo com uma concentração diferente) a administramos 1mL de cada extrato (Himatanthus bracteatus e Ocotea longifolia) nas concentrações: 1,25µg/mL, 2,5µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL, 20µg/mL, 12,5mg/mL, 25mg/mL e 50mg/mL, sendo a de 50mg/mL a concentração onde todos os animais entraram em óbito em até 24h. Assim, optamos por realizar o experimento com as concentrações de 12,5mg/mL e 25mg/mL em ambos os extratos, diariamente antes da administração o foi agitado e ofertado pela manhã 1mL da solução por gavagem durante os 42 dias de experimento, sendo assim os grupos dos extratos foram Himatanthus bracteatus (H I 25mg/mL e H II 12,5mg/mL) e Ocotea longifolia (O I 25mg/mL e O II 12,5mg/mL).

O grupo rosuvastatina foi utilizada como grupo controle positivo e esta foi confeccionada pela farmácia de manipulação A Fórmula® em forma de suspensão na concentração de 0,27mg/mL, calculada levando em consideração a média do peso dos camundongos no início do experimento (27, 73g) e administrados 1mL por dia por gavagem.

Eutanásia

As substâncias foram administradas por um período de 6 semanas (42 dias), término no qual os animais foram anestesiados usando ketamina e Xilasina e coletado amostra de cerca de 1mL sangue através de punção cardíaca para dosagem do perfil lipídico. Foram coletados por via transabdominal, na seguinte ordem: coração, fígado e artéria aorta.

Análise histológica e morfométrica

A aorta, fígado e coração foram fixados em formalina a 10% por no mínimo 24h e no caso da aorta descendente foi fixada em formol tamponado e em seguida levados para o preparo rotineiro de lâminas histológicas para microscopia óptica: desidratação gradativa e

crescente de álcool a 70% até o álcool absoluto – diafanização em xilol crescentes e embebição em parafina líquida a 60°C, e preparação dos blocos de parafina.

Os blocos de parafina foram cortados no micrótomo com espessura de 3 (três) µm e os cortes montados em lâminas de vidro extra-finas (76 x 25 mm), em seguida, foram coradas com fucsina-resorcina e em seguida montadas com lamínulas e entelan para estudo das fibras elásticas, área da luz e espessura da túnica média da aorta torácica, outras lâminas foram preparadas para imunohistoquímica. O coração e fígado foram pesados.

Para a morfometria, foi utilizado o microscópio óptico acoplado a um sistema de captura de imagens, todas as lâminas histológicas foram fotografadas e devidamente identificadas e em seguida estas imagens foram trabalhadas no Programa IMAGE-PRO PLUS 4.5. Antes de capturar as imagens foi necessário calibrar o programa utilizando uma régua de calibração (lâmina micrométrica). Após calibração, mensuramos a túnica média e quantificamos o percentual de fibras elásticas da aorta descendente.

Lipidograma

Ao fim da coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas, a 5000 (cinco mil) rotações por minuto para separação do soro sanguíneo, e encaminhadas para o laboratório de análise do CPML/UNCISAL foi realizado o lipidograma. Para análise dos lipídeos plasmáticos foram determinadas as concentrações do colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicerídeos (TG), lipoproteína de baixa densidade (LDL) a partir do soro isolado por centrifugação de cada animal. As determinações do lipidograma foram realizadas pelo método enzimático colorimétrico (FOSSATI; PRENCIPE, 1982), utilizando kit enzimático da Labtest® e analisador colorimétrico automático.

A variável primária foi a média da espessura da túnica média, área da luz e percentual de fibras elásticas da aorta torácica de cada grupo: está diretamente relacionada capacidade da artéria responder a dieta hiperlipidêmica ou ao tratamento com os extratos: *Himatanthus bracteatus* (nas concentrações 25mg/mL e 12,5mg/mL) e *Ocotea longifolia* (nas concentrações 25mg/mL e 12,5mg/mL). E as secundárias:

Colesterol total: Foi medido por teste enzimático colorimétrico e medido em mg/dL; HDL: Foi medido por teste enzimático colorimétrico e medido em mg/dL; LDL: essa lipoproteína de baixa densidade e os valores representados em mg/dL; Triglicérideo: foi medido por teste enzimático colorimétrico e medido em mg/dL; Massa corpórea do animal, animais distribuídos através da técnica de randomização com curva em Z; Peso do coração: peso do órgão molhado; Glicemia: jejum de 12h.

O tamanho da amostra foi arbitrado em 49 (trinta) camundongos C57BL6J, sendo 7 (sete) para cada grupo estudado; uma vez que na literatura, há trabalhos, que comprovem resultados estatísticos aceitáveis com número menor de animais no experimento com modelo animal semelhante, tais como Cortelekoglu, 2006; Santos, 2008; Brasselet, 2008 e outros (ALESSI et al., 2010; BRASSELET et al., 2008; CORTELEKOGLU et al., 2006; EFENDY et al., 1997; GUZELOGLU et al., 2012; KWON et al., 2003; LIDDELL et al., 2005; NOGUEIRA, 2012; PLATE et al., 1989; ROLIM, 2012; SANTOS, 2008; STADIUS et al., 1994; WAKSMAN et al., 2008; YASUDA, S. et al., 2002).

Os dados foram analisados através da estatística descritiva usando como ferramenta software GraphPad Prism (versão 5.0). Os dados desta análise serão expressos em média e desvio padrão. Primeiramente foi feito o teste de normalidade em cada grupo para verificar se os dados seguem ou não a distribuição normal. Para comparações entre os grupos será utilizado o ANOVA one-way e o pós-teste de TUKEY para os dados que seguem a distribuição normal. Para os resultados que não seguirem a distribuição normal será utilizado o teste de KRUSKAL-WALLIS e o pós-teste DUNNS. Para saber se existem ou não diferença significativa entre as médias foi adotada o nível significância de 0,05. Foram utilizados tabelas e gráficos para a apresentação dos dados e os valores foram apresentados com até duas casas decimais.

Rodrigo Freitas Monte Bispo, Guilherme Benjamin Brandão Pitta, Aldemar Araújo de Castro, Rosane Pereira dos Reis, Daniele Gonçalves Bezerra- **Efeitos do extrato etanólico da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* nas fibras elásticas e túnica média da aorta de camundongos C57BL6J em um modelo de arteriosclerose experimental**

RESULTADOS

- *Variáveis primárias*

TÚNICA MÉDIA

Foi quantificada utilizando 4 pontos diferentes da aorta torácica e calculada média desses quatro pontos.

ESPESSURA DA TÚNICA MÉDIA DA AORTA TORÁCICA

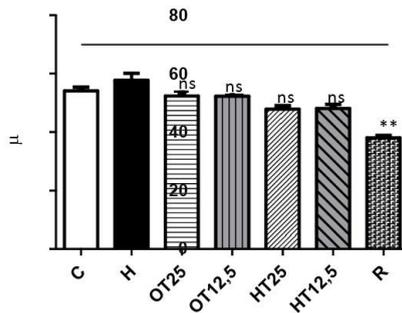


Gráfico 1 - Conforme demonstrado no gráfico acima houve diferença significativa da espessura da túnica média entre o grupo controle C comparado com o grupo Rosuvastatina R 0,27mg/mL valor de $p < 0.0001$. Não houve diferença significativa comparando os grupos OT25 - *Ocotea longifolia* 25mg/mL, OT12,5 - *Ocotea longifolia* 12,5mg/mL, HT25 - *Himatanthus bracteatus* 25mg/mL, HT12,5 - *Himatanthus bracteatus* 12,5mg/mL, no entanto, houve redução comparando as médias sendo biologicamente relevante. Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o teste ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos.

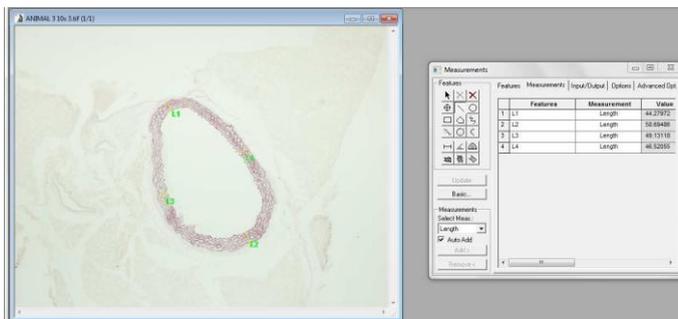


Figura 1 - Foto demonstrando a mensuração dos 4 pontos ortogonais da aorta descendente do animal 3 (IMAGE-PRO PLUS 4.5) grupo *Himatanthus bracteatus* 25mg/mL. Coloração fucsina-resorcina. Corte transversal. Objetiva 10x.

Rodrigo Freitas Monte Bispo, Guilherme Benjamin Brandão Pitta, Aldemar Araújo de Castro, Rosane Pereira dos Reis, Daniele Gonçalves Bezerra- **Efeitos do extrato etanólico da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* nas fibras elásticas e túnica média da aorta de camundongos C57BL6J em um modelo de arteriosclerose experimental**

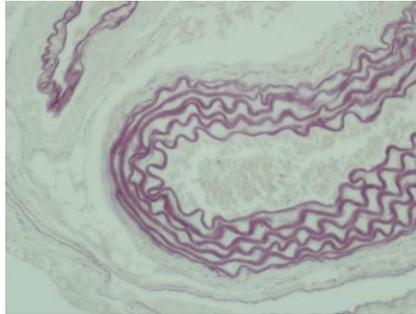


Figura 2 - Foto demonstrando as fibras elásticas da aorta torácica descendente do animal 3 (IMAGE-PRO PLUS 4.5) grupo *Himatanthus bracteatus* 25mg/mL. Coloração fucsina-resorcina. Corte transversal. Objetiva 40x.

PERCENTUAL DE FIBRAS ELÁSTICAS DA AORTA DESCENDENTE

Foi quantificada utilizando uma função do programa IMAGE-PRO PLUS 4.5, onde através da quantidade pixels formados pelas fibras elásticas coradas pela fucsina-resorcina foi aplicado o mascaramento e através das cores preto e branco foi conferido o percentual de fibras elásticas.

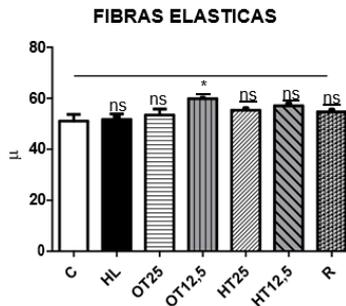


Gráfico 3 - Conforme demonstrado no gráfico acima não houve diferença significativa entre os grupos comparados OT25 - *Ocotea longifolia* 25mg/mL, HT12,5 - *Himatanthus bracteatus* 12,5mg/mL, HT25 - *Himatanthus bracteatus* 25mg/mL e Rosuvastatina 0,27mg/mL com o grupo controle, no entanto, houve diferença significativa comparando o grupo controle C com o grupo OT12,5 - *Ocotea longifolia* 12,5mg/mL, com valor de $p=0,0381$. e todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos.

Rodrigo Freitas Monte Bispo, Guilherme Benjamin Brandão Pitta, Aldemar Araújo de Castro, Rosane Pereira dos Reis, Daniele Gonçalves Bezerra- **Efeitos do extrato etanólico da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* nas fibras elásticas e túnica média da aorta de camundongos C57BL6J em um modelo de arteriosclerose experimental**

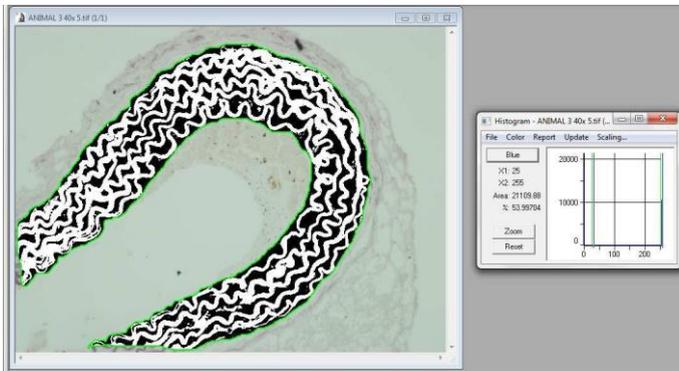


Figura 3 - Foto demonstrando a mensuração de fibras elásticas de 53,99% da área da aorta descendente do animal 3 (IMAGE-PRO PLUS 4.5) grupo controle. Coloração fucsina-resorcina, após a aplicação do mascaramento. Corte transversal. Objetiva 40x.

Variáveis secundárias

Colesterol total de todos os grupos do experimento medido em mg/dL.

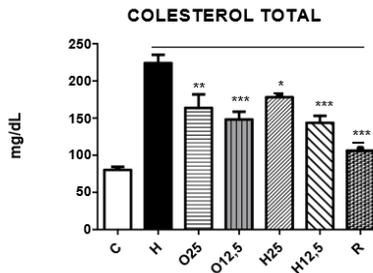


Gráfico 4 - Conforme demonstrado no gráfico acima houve diferença significativa entre o grupo H hiperlipidêmico comparado com todos os grupos testados $p < 0.0001$. Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos.

Rodrigo Freitas Monte Bispo, Guilherme Benjamin Brandão Pitta, Aldemar Araújo de Castro, Rosane Pereira dos Reis, Daniele Gonçalves Bezerra- **Efeitos do extrato etanólico da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* nas fibras elásticas e túnica média da aorta de camundongos C57BL6J em um modelo de arteriosclerose experimental**

HDL de todos os grupos do experimento medido em mg/dL.

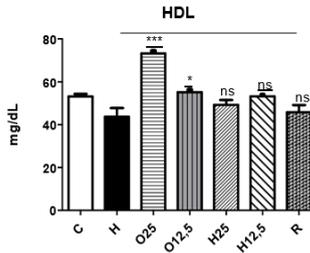


Gráfico 5 - Conforme demonstrado no gráfico acima houve diferença significativa entre o grupo H hiperlipidêmico comparado com todos os grupos O25 *Ocotea longifolia* 25mg/mL e o grupo O12,5 *Ocotea longifolia* 12,5mg/mL testados $p < 0.0001$. Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos.

LDL: essa lipoproteína de baixa densidade e os valores representados em mg/dL

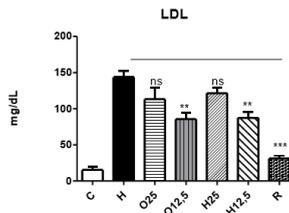


Gráfico 6 - Conforme demonstrado no gráfico acima houve diferença significativa entre o grupo H hiperlipidêmico comparado com os grupos O12,5 *Ocotea longifolia* 12,5mg/mL, H12,5 *Himatanthus bracteatus* 12,5mg/mL e rosuvastatina 0,27mg/mL testados $p < 0.0001$. Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos.

Rodrigo Freitas Monte Bispo, Guilherme Benjamin Brandão Pitta, Aldemar Araújo de Castro, Rosane Pereira dos Reis, Daniele Gonçalves Bezerra- **Efeitos do extrato etanólico da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* nas fibras elásticas e túnica média da aorta de camundongos C57BL6J em um modelo de arteriosclerose experimental**

Triglicerídeo: foi medido por teste enzimático colorimétrico e medido em mg/dL.

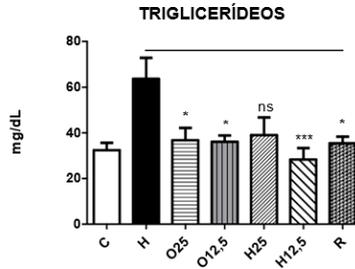


Gráfico 7 - Conforme demonstrado no gráfico acima houve diferença significativa entre o grupo H hiperlipidêmico comparado com os grupos: O25 *Ocotea longifolia* 25mg/mL, O12,5 *Ocotea longifolia* 12,5mg/mL, H12,5 *Himatanthus bracteatus* 12,5mg/mL e rosuvastatina 0,27mg/mL testados $p < 0.0001$, exceto comparado como grupo H25 *Himatanthus bracteatus* 25mg/mL. Os resultados não seguiram a distribuição normal, assim foi feito o teste KRUSKAL-WALLIS e pós teste de DUNNS comparando todos os grupos.

Massa corpórea do animal, animais distribuídos através da técnica de randomização com curva em Z.

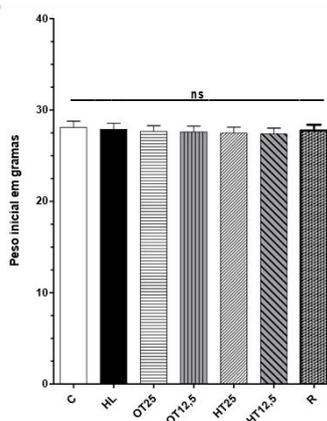


Gráfico 8 - Conforme demonstrado no gráfico acima não houve diferença significativa no peso inicial dos grupos. Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos.

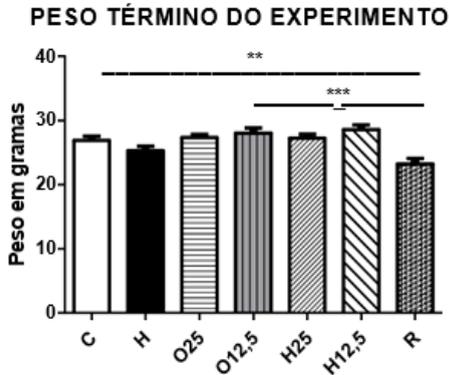


Gráfico 9 - Conforme demonstrado no gráfico acima houve diferença significativa no peso ao término do experimento entre os grupos controle C e rosuvastatina 0,27mg/mL, bem como houve diferença significativa entre os grupos O12,5 *Ocotea longifolia* 12,5mg/mL comparado com a rosuvastatina 0,27mg/mL. Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos.

Peso do coração

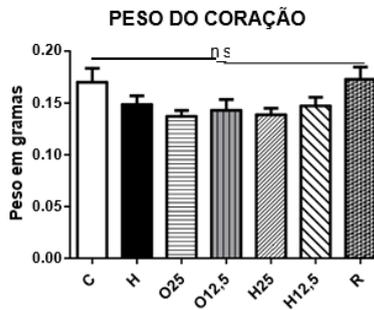


Gráfico 10 - Conforme demonstrado no gráfico acima não houve diferença significativa no peso do coração comparado entre os grupos. Todos os resultados seguiram a distribuição normal, assim foi feito o ANOVA e pós teste de Tukey comparando todos os grupos.

4. DISCUSSÃO

A escolha da rosuvastatina como controle positivo foi decorrente do seu efeito mais eficaz na redução do colesterol LDL do que outras estatinas em doses comparáveis, bem como pelo motivo de possuir um maior número de interações ao se ligar com a HMG – Co A redutase (AQUINO, 2011), isto pode ser comprovado pela redução significativa do colesterol total, triglicerídeos e LDL no presente experimento $P < 0.0001$. Lua et al (2011) e Gronros et al (2008) em pesquisa realizada usando a rosuvastatina em um modelo de arteriosclerose em camundongos por 6 semanas (42 dias) obteve sucesso na redução no depósito de lipídeos e deposição e aumento de colágeno, a rosuvastatina também pode reduzir as respostas inflamatórias decorrentes da lesão arteriosclerótica.

Nicholls et al (2008) estudou os avanços tecnológicos no processamento de imagens da parede arterial no indivíduo vivo utilizando ultrassonografia, verificou o impacto benéfico da rosuvastatina em todo espectro cardiovascular, níveis plasmáticos, HDL e marcadores inflamatórios na arteriosclerose, nesse estudo de Nicholls a rosuvastatina aumentou o HDL o que não aconteceu de forma significativa no presente trabalho.

Shimizu et al (2014) verificaram a eficácia da rosuvastatina e atorvastatina em camundongos C57BL6J submetidos a dieta arteriosclerótica (0,5% de colesterol + 10% de óleo de coco) durante 6 semanas, não houve alterações significantes nos níveis de colesterol de HDL no plasma entre os grupos, resultados não significantes foram encontrados no presente experimento relacionando o grupo rosuvastatina comparado com o grupo controle em relação ao HDL lipoproteína de alta densidade, que desempenha um papel importante no transporte reverso do colesterol in vivo.

O extrato etanólico da *Ocotea longifolia* (nas concentrações 25mg/mL e 12,5mg/mL) não reduziram significativamente a espessura da túnica média da aorta torácica, contudo, houve redução em relação a média das espessuras sendo biologicamente relevante, no entanto, reduziram de forma significativa o colesterol total, LDL e triglicerídeos e aumentar o HDL. Costa et al (2015) realizou pesquisa verificando atividade anti-bacteriana da *Ocotea nonata* e em seu experimento

mostrou ação antiinflamatória e inibição da COX-1, COX-2. O estudo também investigou fitoquimicamente a planta da espécie *Ocotea notata* da Restinga de Jurubatiba Parque Nacional de Macaé no Rio de Janeiro. O extracto bruto foi avaliado para a atividade antimicobacteriana e apresentou $95,75 \pm 2,53\%$ de inibição de crescimento com $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ do extrato, nesse experimento isolaram os flavonóides isolados afzelina e isoquercitrina.

O extrato etanólico da *Ocotea longifolia* $12,5\text{mg}/\text{mL}$ aumentou significativamente o percentual das fibras elásticas, sugerindo que o extrato possui capacidade induzir de alguma forma a formação e/ou desenvolvimento de elastina, Montanari (2016) acrescenta que as fibras elásticas são produzidas pelos fibroblastos e pelas células musculares lisas da parede dos vasos. A síntese de elastina e de colágeno pode ser simultânea na célula.

Os extratos etanólicos de ambas as plantas (*Ocotea longifolia* e *Himatanthus bracteatus*) e concentrações foram capazes de reduzir de forma significativa o colesterol total, no entanto, não promoveu alterações na glicemia até os 21 dias de experimento, somente ao término (42 dias) do experimento reduziu de forma significativa a glicemia com ambos os extratos e concentrações. Montrucchio (2012) verificou a atividade antinociceptiva do extrato clorofórmio da *Ocotea puberula* (Lauraceae), e análise antinociceptivo ($30\text{-}300 \text{ mg} / \text{kg}$, p. O.) Causou a inibição relacionada com a dose de constrições abdominais provocadas por ácido acético e também inibiu ambas as fases de nocicepção induzida por formalina. No entanto, os extratos hexano ou acetato de etila não produziu qualquer efeito. Rebouças et al (2013) descreveram que a *Himatanthus articulatus* (Apocynaceae) é uma planta nativa da Amazônia, popularmente usado para tratar úlceras externas, tumores, inflamações, câncer, sífilis e malária. Foram utilizados ratos adultos machos foram tratados com $500 \text{ mg} / \text{kg}$, $1,000 \text{ mg} / \text{kg}$ ou $2000 \text{ mg} / \text{kg}$ de extrato etanólico da *Himatanthus articulatus* (casca) por gavagem, foi feito a análise por HPLC indicou plumieride como constituinte principal que é um irinóide (composto fenólico) onde foi atribuído o efeito não-genotóxico induzido pelo peróxido de hidrogênio. Este composto fenólico possui a função de proteção das plantas contra predadores.

O extrato etanólico da *Ocotea longifolia* 12,5mg/mL e 25mg/L foram capazes de aumentar o HDL e reduzir os triglicerídeos de forma significativa. O extrato da *Himatanthus bracteatus* 12,5mg/mL reduziu os triglicerídeos de forma significativa. Os extratos da *Ocotea longifolia* e *Himatanthus bracteatus* ambas na concentração 12,5mg/mL foram capazes de reduzir de forma significativa o LDL, isto sugere que a *Ocotea longifolia* possua (ácido triterpeno) de alguma forma tenha influencia antiinflamatória que é sustentada por Beirith et al (1999) que avaliou a ação antinociceptiva do extrato bruto, isolado quimicamente o isolamento químico de algumas substâncias como triterpenos da casca do caule da *Ocotea* (Lauraceae) produziu dose-dependente e ação antinociceptiva significativa na indução de contrações abdominais com ácido acético e formalina, Beirith e colaboradores acrescentam ainda que o mecanismo através do qual este composto produz antinocicepção ainda permanece incerto, mas é improvável que envolvem efeitos semelhantes a opióides, influência na produção de óxido nítrico ou sistemas de serotonina ou ações depressoras centrais, periféricos ou não-específicas.

Gomes et al (2009) descrevem que o elemento deflagrador do evento aterosclerótico está associado à disfunção e/ou lesão endotelial que podem ser atribuídas a inúmeros fatores físicos e químicos, merecendo destaque a ação da hipercolesterolemia ou hiperlipidemia. Dentre os mecanismos que protegem o endotélio dos fenômenos lesivos, pode-se destacar a ação do óxido nítrico (NO). O NO inibe a expressão de moléculas de adesão celular, como a VCAM- 1, ICAM e E-selectina, bem como a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina- 6 e interleucina-8, impedindo assim atração e adesão monocitária. Os mesmos mecanismos que promovem disfunção e/ou lesão endotelial desencadeiam o processo inflamatório e a liberação de inúmeras proteínas capazes de acusar o evento lesivo quando pesquisado e quantificado no sangue. Esses marcadores inflamatórios são apontados nos últimos anos como elementos fundamentais na avaliação precoce de disfunção e/ou lesão endotelial.

5. CONCLUSÃO

Os extratos etanólicos da Himatanthus bracteatus e Ocotea longifolia (nas concentrações 25mg/mL e 12,5mg/mL) não reduziram significativamente a espessura da túnica média da aorta torácica, contudo, houve redução em relação a média das espessuras sendo biologicamente relevante. O extrato etanólico da Ocotea longifolia 12,5mg/mL aumentou significativamente o percentual das fibras elásticas, sugerindo que o extrato possui capacidade induzir a formação e desenvolvimento de elastina. Os extratos etanólicos de ambas as plantas e concentrações foram capazes de reduzir de forma significativa o colesterol total, no entanto, não promoveu alterações na glicemia até os 21 dias de experimento, somente ao término (42 dias) do experimento reduziu de forma significativa a glicemia com ambos os extratos e concentrações.

O extrato etanólico da Ocotea longifolia 12,5mg/mL e 25mg/L foram capazes de aumentar o HDL e reduzir os triglicerídeos de forma significativa. O extrato da Himatanthus bracteatus 12,5mg/mL reduziu os triglicerídeos de forma significativa. Os extratos da Ocotea longifolia e Himatanthus bracteatus ambas na concentração 12,5mg/mL foram capazes de reduzir de forma significativa o LDL. Os extratos não promoveram alteração significativa no peso do coração dos camundongos.

REFERÊNCIAS

1. ALESSI, A. et al. Rosiglitazone and vascular injury in hypercholesterolemic rabbits: neointimal formation assessment. Arq Bras Cardiol, v. 95, n. 3, p. 283- 8, Sep 2010.
2. BARROS, Nelson Filice de; SIEGEL, Pâmela; SIMONI, Carmen De. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: passos para o pluralismo na saúde. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 23, n. 12, Dec. 2007.
3. Beirith A, Santos AR, Calixto JB, Hess SC, Messana I, Ferrari F, Yunes RA. Study of the antinociceptive action of the ethanolic extract and the triterpene 24- hydroxytormentonic acid isolated from the stem bark of Ocotea suaveolens. Planta Med. 1999 Feb;65(1):50-5. PubMed PMID: 10083846.

4. BRASSELET, C. et al. Effect of local heating on restenosis and in-stent neointimal hyperplasia in the atherosclerotic rabbit model: a dose-ranging study. *European Heart Journal*, v. 29, n. 3, p. 402-12, Feb 2008.
5. CORTELEKOGLU, T. et al. The effects of clopidogrel and calcium dobesilate on intimal hyperplasia following vascular injury. *Acta Chirurgica Belgica*, v. 106, n. 2, p. 206-210, Mar-Abr 2006.
6. Costa IF, Calixto SD, Heggdorne de Araujo M, Konno TU, Tinoco LW, Guimarães. DO, Lasunskaja EB, Leal IR, Muzitano MF. Antimycobacterial and nitric oxide production inhibitory activities of *Ocotea notata* from Brazilian restinga. *ScientificWorldJournal*. 2015;2015:947248. doi: 10.1155/2015/947248. Epub 2015 Feb19.
7. EFENDY, J. L. et al. The effect of the aged garlic extract, 'Kyolic', on the development of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v. 132, n. 1, p. 37-42, Jul 11 1997.
8. FERRARI, G. Ricerche sulle lauracee del genere *Ocotea* dell' américa latina. In: SIMPOSIO INTERNAZIONALE SULLA MEDICINA INDIGENA E
9. POPOLARE DELL' AMERICA LATINA, 1977. Roma: Instituto Ítalo Latino Americano, 1977. p.373-386.
10. GUZELOGLU, M. et al. The effects of PPARgamma agonist rosiglitazone on neointimal hyperplasia in rabbit carotid anastomosis model. *J Cardiothorac Surg*, v. 7, p. 57, 2012.
11. LIDDELL, R. P. et al. Endovascular model of rabbit hindlimb ischemia: a platform to evaluate therapeutic angiogenesis. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, v. 16, n. 7, p. 991-8, Jul 2005.
12. Montrucchio DP, Miguel OG, Zanin SM, da Silva GA, Cardozo AM, Santos AR. Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid dicentrine isolated from fruits of *Ocotea puberula*. *Planta Med*. 2012 Sep;78(14):1543-8. Epub 2012 Jul 16. PubMed PMID: 22815198.
13. NOGUEIRA, M. R. S. Diferença da média de hiperplasia médio-intimal pós angioplastia na artéria ilíaca de coelhos tratados com extrato seco da *Curcuma longa*. 2012. 80 MESTRADO ACADÊMICO (Master). CIÊNCIAS CIRÚRGICAS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, Banco de Teses da CAPES.
14. PLATE, G. et al. Effect of platelet inhibitors on platelet and fibrin deposition following transluminal angioplasty of the atherosclerotic rabbit aorta. *Eur J Vasc Surg*, v. 3, n. 2, p. 127-33, Apr 1989.
15. ROLIM, J. C. Diferença da hiperplasia médio intimal em coelhos submetidos a angioplastia e tratados com *Moringa oleifera*. 2012. 90 MESTRADO ACADÊMICO (Master). UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, Banco de Teses da CAPES.
16. SANTOS, J. A. B. D. Estudo da aterosclerose induzida por diferentes tipos de dieta hiperlipídica em coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*). 2008. 80 (Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Macéio.

Rodrigo Freitas Monte Bispo, Guilherme Benjamin Brandão Pitta, Aldemar Araújo de Castro, Rosane Pereira dos Reis, Daniele Gonçalves Bezerra- **Efeitos do extrato etanólico da *Himatanthus bracteatus* e *Ocotea longifolia* nas fibras elásticas e túnica média da aorta de camundongos C57BL6J em um modelo de arteriosclerose experimental**

17. STADIUS, M. L. et al. Cell proliferation after balloon injury of iliac arteries in the cholesterol-fed New Zealand White rabbit. *Arteriosclerosis and Thrombosis : a Journal of Vascular Biology / American Heart Association*, v. 14, n. 5, p. 727-33, May 1994.
18. WAKSMAN, R. et al. Effect of clopidogrel on neointimal formation and inflammation in balloon-denuded and radiated hypercholesterolemic rabbit iliac arteries. *J Interv Cardiol*, v. 21, n. 2, p. 122-8, Apr 2008.
19. YASUDA, S. et al. Local delivery of low-dose docetaxel, a novel microtubule polymerizing agent, reduces neointimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery model. *Cardiovasc Res*, v. 53, n. 2, p. 481-6, Feb 1 2002.