

JAQUELINE MINATTI

**O CHÁ VERDE NO PROCESSO ATEROSCLERÓTICO EM
CAMUNDONGOS *KNOCKOUT* PARA RECEPTOR DE
LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE**

FLORIANÓPOLIS – SC
2010

JAQUELINE MINATTI

**O CHÁ VERDE NO PROCESSO ATEROSCLERÓTICO EM
CAMUNDONGOS *KNOCKOUT* PARA RECEPTOR DE
LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE**

Dissertação apresentada como requisito
à obtenção do título de Mestre pelo
Programa de Pós-graduação em
Nutrição, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Wazlawik

Colaboradores:

Profa. Dra. Rosa Maria Ribeiro-do-Valle Nicolau
(Depto Farmacologia / CCB / UFSC)

Prof. Dr. Edson Luiz da Silva (Depto Análises Clínicas / CCS / UFSC)

Prof. Dr. Marcelo Maraschin (Depto Fitotecnia / CCA / UFSC)

Doutoranda Mariana Appel Hort (Depto Farmacologia / CCB / UFSC)

FLORIANÓPOLIS – SC
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

M663c Minatti, Jaqueline

O chá verde no processo aterosclerótico em camundongos knockout para receptor de lipoproteína de baixa densidade [dissertação] / Jaqueline Minatti ; orientadora, Elisabeth Wazlawik. - Florianópolis, SC, 2010.

91 f.: il., grafs., tabs., +; anexo

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Nutrição.

Inclui referências

1. Nutrição. 2. Chá verde. 3. Aterosclerose. 4. Camundongo LDLr. 5. Knockout. I. Wazlawik, Elisabeth. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. III. Título.

CDU 612.39

AGRADECIMENTOS

*Infinitamente tento agradecer:
aos meus amados pais e irmã,
ao meu amor,
queridos amigos e professores,
cara orientadora e colaboradores,
e todos que,
de alguma forma,
contribuíram com ajudas,
doações,
parcerias,
experiências,
ensinamentos,
conselhos,
incentivo,
confiança,
dedicação
e paciência.
Obrigada por existirem.
Certamente foi Ele
quem tratou de colocar,
em minha vida,
pessoas tão maravilhosas
das quais levo comigo
muitas lembranças!*

Jaqueline Minatti

RESUMO

O chá verde é tradicionalmente preparado a partir das folhas maduras e secas da planta *Camellia sinensis*. Diversos estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais associam o consumo de chá verde à diminuição dos riscos de doenças crônico-degenerativas, dentre elas, as cardiovasculares (DCV). O estudo objetivou verificar a atividade do chá verde sobre o processo aterosclerótico utilizando-se camundongos C57BL6 (homozigotos com deficiência para receptores de lipoproteína de baixa densidade, LDLr $-/-$ KO), que mimetizam lesões ateroscleróticas humanas. Os animais foram mantidos em dieta normal ou aterogênica (contendo 20% de lipídeos, 1,25% de colesterol, 0,5% de colina) e tratados com extrato de chá verde por via oral (50, 100 e 300 mg/kg) ou veículo, uma vez ao dia por 4 semanas. Resultados *in vivo* e *ex vivo* demonstraram que a dose 50 mg/kg provocou redução de aproximadamente 35% no tamanho das lesões, melhora da reatividade vascular em aorta torácica isolada, diminuição da proteína quimiotática para monócitos 1 (*Monocyte Chemotactic Protein 1*, MCP-1) no plasma, diminuição dos triglicerídeos no plasma e não interferiu no colesterol total e nas lipoproteínas plasmáticas. O tratamento com o chá verde provocou menor ganho de peso e redução da ingestão de ração, não sendo verificado uma possível hepatotoxicidade nas doses estudadas. Concluiu-se que 50 mg/kg de chá verde diminuiu a progressão do processo aterosclerótico em camundongos LDLr $-/-$ KO, propiciando efeitos favoráveis ao funcionamento endotelial.

Palavras-chave: Camundongo LDLr $-/-$ KO. Aterosclerose. *Camellia sinensis*.

ABSTRACT

Green tea is typically brewed from the mature and dried leaves of the plant *Camellia sinensis*. Epidemiological, clinical and experimental studies have associated green tea consumption with decreased risk of chronic degenerative diseases, including cardiovascular diseases. This study sought to evaluate the activity of green tea on atherosclerotic progression using C57BL/6J mice (homozygous lacking low density lipoprotein receptors, LDLr $-/-$ KO), which exhibit the features observed in human atherosclerotic lesions. Animals were fed with a normal or an atherogenic diet (containing 20% lipids, 1.25% cholesterol, 0.5% choline) and were treated orally with green tea extract (50, 100 and 300 mg/kg), or vehicle, once a day for 4 weeks. *In vivo* and *ex vivo* results showed that green tea at 50 mg/kg decreased the lesion area by approximately 35%, improved the vascular reactivity in isolate thoracic aorta, reduced plasma monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and plasma triglycerides levels, but did not modify total cholesterol and plasma lipoproteins. Green tea treatment caused a decrease in body weight and reduced the chow consumption, although the dosages used possible induced no hepatic toxicity. We conclude that green tea at 50 mg/kg prevents the atherosclerotic process in LDLr $-/-$ mice, promoting beneficial effects on endothelial function.

Key words: LDLr $-/-$ KO mice. Atherosclerosis. *Camellia sinensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diferenças entre os tipos de chás originários da <i>C. sinensis</i> , de acordo com o método de processamento empregado.....	26
Figura 2 -	Estrutura química dos flavanóis presentes no chá verde.....	28
Figura 3 -	Indícios de atividades biológicas do chá verde.....	33
Figura 4 -	Desenho do estudo.....	42
Figura 5 -	Desenho esquemático do ensaio de reatividade vascular.....	44
Figura 6 -	Esquema com as principais etapas do ensaio histológico.....	45
Figuras do artigo científico:		
Figura 1 -	(A) Curvas concentração resposta cumulativas à fenilefrina (Phe, 1 nM - 3 µM) em anéis de aorta torácica isolada, (B) Curvas concentração resposta cumulativas à acetilcolina (ACh, 1 nM - 3 µM) em anéis de aorta torácica isolada pré-contraídos com Phe; de camundongos LDLr -/- KO alimentados com ração normal ou ração hipercolesterolêmica, tratados por 4 semanas com o chá verde ou veículo.....	59
Figura 2-	(A) Cortes histológicos representativos de aorta ascendente proximal indicando as lesões ateroscleróticas; (B) Extensão das lesões ateroscleróticas (µm ²) em camundongos LDLr -/- KO, alimentados com ração normal ou ração hipercolesterolêmica, tratados por 4 semanas com o chá verde ou veículo.....	60
Figura 3 -	Determinação imunoenzimática (ELISA) de MCP-1 no plasma de camundongos LDLr -/- KO, alimentados com ração normal ou ração hipercolesterolêmica, tratados por 4 semanas com o chá verde ou veículo.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição básica das rações normal (CR1) e hipercolesterolêmica (aterogênica), conforme informações dos fabricantes.....	38
Tabela 2 - Grupos experimentais, tipos de ração e tratamentos..	41
<i>Tabelas do artigo científico:</i>	
Tabela 1 - Grupos experimentais, tipos de ração e tratamentos..	53
Tabela 2 - Variação de peso e consumo de ração em camundongos LDLr -/- KO, alimentados com ração normal ou ração hipercolesterolêmica, tratados por 4 semanas com o chá verde ou veículo.....	56
Tabela 3 - Composição do extrato atomizado hidrossolúvel de chá verde analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC).....	57
Tabela 4 - Perfil lipídico plasmático de camundongos LDLr -/- KO, alimentados com ração normal ou ração hipercolesterolêmica, tratados por 4 semanas com o chá verde ou veículo.....	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AKT	Proteína quinase B (<i>Protein kinase B</i>).
ALT	Alanina aminotransferase.
Apo E <i>knockout</i>	Camundongos geneticamente modificados para não expressarem o ligante Apo E (Apolipoproteína E) dos receptores que reconhecem os remanescentes de quilomicrons e das lipoproteínas de muito baixa densidade (<i>Apolipoprotein E-null mice</i>).
C57BL6	Nome da linhagem de camundongos <i>knockout</i> (geneticamente modificados) para receptores de lipoproteínas de baixa densidade.
CD36	Grupamento de diferenciação 36 (<i>Cluster of differentiation 36; Thrombospondin receptor</i>) – Proteína integral de membrana expressa em diversos tipos celulares de vertebrados.
CD68	Grupamento de diferenciação 68 (<i>Cluster of differentiation 68</i>) – Glicoproteína expressa por macrófagos.
COX-2	Enzima cicloxigenase induzida.
CT	Colesterol total.
DCV (CDV)	Doenças cardiovasculares (<i>Cardiovascular diseases</i>).
EC	Epicatequina.
ECG	Epicatequina galato.
EGC	Epigallocatequina.
EGCG	Epigallocatequina galato.
E-selectin	Molécula de adesão celular expressa por células endoteliais, ativada por citocinas (<i>Endothelial adhesion molecule 1</i>), também denominada CD62E.
HDL	Lipoproteína de alta densidade (<i>High Density Lipoprotein</i>).
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>).
ICAM-1	Molécula de adesão celular (<i>Intracellular adhesion molecule-1</i>), também denominada CD54.
IDL	Lipoproteína de intermediária densidade (<i>Intermediary Density Lipoprotein</i>).
IFN- γ	Citocina Interferon-gama.
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low Density Lipoprotein</i>).

LDLr -/- KO ou LDLr -/ <i>knockout</i>	Camundongos geneticamente modificados para não expressarem receptores para lipoproteínas de baixa densidade.
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos 1 (<i>Monocyte Chemotactic Protein 1</i>).
M-CSF	Fator de crescimento (<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>).
NO	Oxido nítrico (<i>Nitric oxide</i>).
NOS	Enzima óxido nítrico sintase.
NOS _e	Enzima óxido nítrico sintase endotelial.
NOS _i	Enzima óxido nítrico sintase induzida.
PCAM-1	Molécula de adesão plaquetária (<i>Platelet cell adhesion molecule</i>).
PCNA	Marcador de crescimento celular (<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>).
PON 1	Proteína antioxidante paroxonase.
P-selectin	Molécula de adesão celular encontrada em células endoteliais, ativada por plaquetas.
SR-A	Receptor <i>scavenger</i> classe A.
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (Thiobarbituric acid reactive substances).
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor-α</i>).
VCAM-1	Molécula de adesão para leucócitos (<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>).
VLA-4	Integrina, proteína de adesão (<i>Very late antigen-4</i>), também denominada CD49d / CD29.
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade (<i>Very Low Density Lipoprotein</i>).
β 2 integrin	Subunidade β do receptor transmembrana Integrina que promove adesão celular; também denominada CD18.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Doenças cardiovasculares e aterosclerose.....	16
2.2 Fisiopatologia da aterosclerose.....	18
2.3 Modelo experimental para o estudo da aterosclerose.....	22
2.4 Prevenção e tratamento do processo aterosclerótico: fatores dietéticos.....	24
2.5 Chá verde (<i>Camellia sinensis</i>)	26
2.5.1 Evidências de atividades biológicas do chá verde.....	29
3. JUSTIFICATIVA	34
4. HIPÓTESE DA PESQUISA	35
5. OBJETIVOS	36
5.1 Geral.....	36
5.2 Específicos.....	36
6. MATERIAIS E MÉTODOS	37
6.1 Delineamento do estudo.....	37
6.2 Animais.....	37
6.3 Materiais e reagentes.....	38
6.4 Métodos.....	39
6.4.1 Análise de compostos do chá verde (<i>Camellia sinensis</i>) por HPLC.....	39
6.4.2 Preparo e administração do chá verde.....	40
6.4.3 Protocolo experimental.....	40
6.4.4 Coleta de sangue e obtenção de plasma.....	42
6.4.5 Determinações bioquímicas de lipídios.....	42
6.4.6 Ensaio <i>ex vivo</i> de reatividade vascular em aorta isolada de camundongos LDLr -/- KO.....	43

6.4.7 Ensaio <i>in vivo</i> de histologia de aorta ascendente proximal de camundongos LDLr -/- KO.....	45
6.4.8 Ensaio imunoenzimático (ELISA) de detecção da proteína quimiotática para monócitos 1 (<i>Monocyte Chemotactic Protein 1</i> , MCP-1) no plasma de camundongos LDLr -/- KO.....	46
6.4.9 Determinação de alanina aminotransferase (ALT) no plasma de camundongos LDLr -/- KO.....	46
6.4.10 Análises estatísticas.....	46
6.4.11 Procedimentos éticos da pesquisa.....	47
7. RESULTADOS.....	48
7.1 Artigo científico: “EXTRATO DE CHÁ VERDE PODE EVITAR O PROGRESSO DO PROCESSO ATEROSCLERÓTICO EM CAMUNDONGOS <i>KNOCKOUT</i> PARA RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE”.....	48
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
ANEXO – Laudo técnico do chá verde.....	90

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são consideradas problemas de saúde pública, destacando-se o número de óbitos que se evidenciam no Brasil e em vários outros países do mundo (BRASIL, 2001; FERNANDES *et al.*, 2006; FRASER *et al.*, 2007). Estas doenças caracterizam-se, principalmente, por eventos agudos como: infarto agudo do miocárdio, infarto cerebral, e as suas origens dependem tanto de herança familiar quanto dos hábitos de vida dos indivíduos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007). A doença cardiovascular envolve toda uma condição de distúrbio entre os lipídios plasmáticos, células sanguíneas e parede vascular, pronunciado pelo processo aterosclerótico (ROSS, 1999; KADÁR & GLASZ, 2001; TEDGUI & MALLAT, 2006; RAMESH *et al.*, 2010).

Frente à grande preocupação em se reduzir os casos de doenças cardiovasculares, estudam-se estratégias para o controle ou redução do processo envolvido no desenvolvimento da aterosclerose, sendo, a dieta, um meio de intervenção (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

Evidências têm demonstrado que muitos compostos de origem vegetal - principalmente as substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas, são empregadas, popularmente, para a melhora de diversas doenças, sendo que muitas das substâncias apresentam ação farmacológica conhecida. Além disso, a literatura científica relata importantes atividades biológicas de diferentes substâncias naturais que podem ser benéficas ao tratamento e prevenção das enfermidades, dentre elas, as cardiovasculares (STANGL *et al.*, 2006; CLEMENT, 2009).

O chá verde (*Camellia sinensis*) é uma bebida rica em polifenóis, havendo indícios de que o chá poderia ser benéfico contra o processo aterosclerótico, agindo de diferentes formas (SON *et al.*, 2004; HOTTA *et al.*, 2006; STANGL *et al.*, 2006; ANTONELLO *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007; STANG *et al.*, 2007; JOCHMANN *et al.*, 2008; CLEMENT, 2009). Neste contexto, o presente estudo pretende avaliar se o tratamento com o chá verde pode interferir na progressão das lesões ateroscleróticas de camundongos propícios ao desenvolvimento da aterosclerose; uma vez que essas lesões são o primeiro passo para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares que levam a óbito milhões de pessoas em todo o mundo.

O presente documento vem estruturado com um referencial teórico a respeito da aterosclerose como causa das doenças cardiovasculares, modelo experimental, estratégias de prevenção e

tratamento daquela, através de fatores dietéticos, dentre os quais, o chá verde. O referencial teórico culmina com os objetivos e os respectivos métodos para atingir cada item. Após, está apresentado o artigo científico onde se encontram os resultados da pesquisa, seguido de algumas considerações finais e as referências bibliográficas utilizadas para o embasamento teórico do estudo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doenças cardiovasculares e aterosclerose

As doenças cardiovasculares são a principal causa de óbito em todo o mundo, principalmente em países ocidentais (LIBBY, 2002; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2004; FERNANDES *et al.*, 2006; RAHMANI *et al.*, 2006). No Brasil, representam cerca de um terço dos óbitos totais, isto é, 300.000 mortes por ano (BRASIL, 2001). Para o Sistema Único de Saúde (SUS), as doenças cardiovasculares foram responsáveis, em 2002, por mais de 1,2 milhão de internações e 17 % dos gastos financeiros (ARAÚJO & FERRAZ, 2005). De acordo com as projeções da Organização Mundial de Saúde, há a tendência de elevação do número de casos de doenças cardiovasculares, agravando ainda mais o quadro de morbimortalidade de países em desenvolvimento (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

A causa primária no desencadeamento das doenças cardiovasculares é o desenvolvimento e a progressão do processo aterosclerótico (LIBBY, 2008). A aterosclerose é, atualmente, entendida como um distúrbio inflamatório crônico e progressivo de artérias de médio e grande calibre, caracterizado pela acumulação de lipídios, leucócitos, células de músculo liso e elementos de tecido conectivo na íntima arterial (ROSS, 1999; LUSIS, 2000; LIBBY, 2002; HANSSON, 2005; LIBBY, 2008; RAMESH *et al.*, 2010).

Entende-se que a causalidade do aparecimento e progressão da aterosclerose seja um processo natural, inerente ao envelhecimento orgânico. Entretanto, já é consenso que as células endoteliais da parede dos vasos sanguíneos exercem importante função na manutenção do sistema vascular, sendo que a condição de agressão e disfunção endotelial leva ao aceleração do processo aterosclerótico (ROSS, 1999; LIBBY, 2008).

A elevação das taxas de lipídios plasmáticos, particularmente das lipoproteínas de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein* - LDL) e de muito baixa densidade (*Very Low Density Lipoprotein* - VLDL), é um fator de risco bem estabelecido na incidência de aterosclerose e suas complicações patológicas (ZADELAAR *et al.*, 2007), uma vez que a disfunção endotelial é potencializada pela hipercolesterolemia (ROSS, 1999; LIBBY, 2008). Além desta, a elevação de radicais livres causada pelo tabagismo, a presença de hipertensão arterial, o estresse causado pelo fluxo sanguíneo, a resistência à insulina, a hiperglicemia ou

diabetes, a obesidade, concentrações elevadas de homocisteína, a presença de microrganismos infecciosos como herpes vírus e *Chlamydia pneumoniae*; ou a combinação destes, são fatores promotores da disfunção endotelial e conseqüente aceleração do processo aterosclerótico (ROSS, 1999; STOLL & BENDSZUS, 2006; LIBBY, 2008; LIBBY *et al.*, 2010).

Outra condição relacionada ao processo aterosclerótico é a Síndrome Metabólica ou Síndrome “X”. Esta síndrome envolve um agrupamento de anormalidades metabólicas: obesidade, inflamação, dislipidemia, hipertensão arterial, além de resistência à insulina e diabetes, atuando na aterogênese por favorecer a disfunção endotelial (CHENG, 2006; KIM *et al.*, 2007).

O estilo de vida e o hábito alimentar ocidentais estão associados ao aumento da prevalência de aterosclerose e, por conseqüência, das doenças cardiovasculares (BONOW *et al.*, 2002). Apesar da dimensão que atinge atualmente, a aterosclerose é uma condição patológica já verificada na antiguidade. Marc Ruffer, em 1911, identificou modificações degenerativas sugestivas de processo aterosclerótico em artérias subclávias de múmias egípcias (RUFFER, 1911 *apud* TEDGUI & MALLAT, 2006). Os achados foram confirmados, posteriormente, em 1962, por Sandison, utilizando técnicas de fixação de tecidos e verificando histologicamente o depósito lipídico e calcificação da parede vascular das múmias (SANDISON, 1962).

O termo “ateroma” é, originariamente, grego e significa “*porridge*”, uma papa ou mingau típico escocês à base de aveia em flocos. Este termo foi inicialmente proposto por Albrecht von Hallet, em 1755, para designar o processo degenerativo nas artérias. Em 1833, o patologista francês Jean Lobstein propôs o termo “arteriosclerose” para caracterizar tal processo que provocava proliferação de tecido conectivo e calcificação da íntima arterial. E, finalmente, em 1904, o patologista alemão Marchand usou pela primeira vez o termo “aterosclerose” (revisado por TEDGUI & MALLAT, 2006), atualmente entendido como um processo inflamatório da camada íntima arterial (LIBBY, 2008, RAMESH *et al.*, 2010).

Um grande passo foi dado ao estudo da aterosclerose a partir de 1908, quando o pesquisador russo Alexander Ignatowski demonstrou, experimentalmente, que a aterosclerose poderia ser induzida em coelhos quando alimentados com uma dieta a base de leite e gema de ovos (IGNATOWSKI, 1908 *apud* TEDGUI & MALLAT, 2006). Os anos 70 e 80 foram marcados por avanços nesta área, sendo que Goldstein, Brown e outros pesquisadores contribuíram, demonstrando que

receptores existentes em macrófagos, que se ligam às partículas de LDL, são os responsáveis pela formação das células espumosas, as quais estão envolvidas no processo aterosclerótico (GOLDSTEIN *et al.*, 1979; BROWN & GOLDSTEIN, 1983).

Uma revolução aconteceu a partir dos anos 90, quando se inicia o desenvolvimento de modelos animais para o estudo experimental da aterosclerose por meio de técnicas de recombinação genética (ISHIBASHI *et al.*, 1993; TEDGUI & MALLAT, 2006). Destacam-se os camundongos deficientes de receptores para LDL e os deficientes de apolipoproteína E, modelos mundialmente reconhecidos e utilizados em pesquisas que envolvem o processo aterosclerótico, bem como em ensaios medicamentosos (FERNANDES *et al.*, 2006; ZADELAAR *et al.*, 2007). A partir daí, protocolos experimentais desvendaram que a aterosclerose se tratava de um processo inflamatório, e que certas substâncias ou circunstâncias poderiam atuar em benefício ou malefício do processo (ROSS, 1999; LIBBY, 2002).

Neste meio, então, emerge o interesse em se verificar a influência de substâncias alimentares sobre a aterosclerose. Dados epidemiológicos demonstraram correlação inversa entre uma alimentação rica em antioxidantes oriundos de vegetais, frutas, bebidas e azeite – Dieta do Mediterrâneo – e os distúrbios cardiovasculares (GRASSI *et al.*, 2008). As pesquisas foram impulsionadas também pela revelação do Paradoxo Francês, isto é, o baixo índice de mortalidade por doenças cardiovasculares observado em populações do Mediterrâneo em associação com o consumo de polifenóis presentes no vinho tinto e uma dieta rica em gordura saturada (RENAUD & LORGERIL, 1992). Desta forma, o hábito alimentar mediterrâneo despertou para diversos estudos sobre a influência de compostos fenólicos nas doenças cardiovasculares (NIJVELDT *et al.*, 2001).

2.2 Fisiopatologia da aterosclerose

As artérias são vasos de estrutura trilaminar, constituídos de uma camada endotelial em contato com o fluxo sanguíneo, camada íntima arterial e camada média, repleta de feixes de células musculares lisas (LIBBY, 2002). O reconhecimento dessa estrutura arterial é importante ao entendimento do processo aterosclerótico.

As células endoteliais vasculares formam uma tênue camada celular que funciona como uma barreira seletivamente permeável, importante à manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. Constituem um dos mais extensos tecidos do organismo (LUSIS, 2000;

GRASSI *et al.*, 2008). Este tecido, presente na luz dos vasos, em contato com o fluxo sanguíneo, executa importantes funções como a regulação do tônus vascular, a coagulação e a resposta inflamatória (BEHRENDT, 2002; RAHMANI *et al.*, 2006).

O endotélio é um regulador da homeostase vascular e adapta a reatividade dos vasos em resposta às forças hemodinâmicas e aos mediadores neurohormonais por meio da liberação de fatores de relaxamento e de contração (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; LIU & HUANG, 2008). O fator de relaxamento derivado do endotélio (vasodilatador), representado pelo óxido nítrico (NO), é um gás endógeno sintetizado a partir da L-arginina por meio da enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOSe) (ZHENG & LIU, 2007; LIU & HUANG, 2008), que se difunde para as células musculares lisas da íntima e média arterial, levando ao relaxamento vascular (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; DEANFIELD *et al.*, 2005; GRASSI *et al.*, 2008).

Além desta propriedade, o NO pode apresentar efeito inibitório sobre a adesão leucocitária, agregação plaquetária, produção de citocinas inflamatórias e proliferação de células musculares lisas da íntima arterial. Ainda, é capaz de capturar radicais superóxidos, evitando danos às paredes vasculares (DIMMELER *et al.*, 1999; PATEL *et al.*, 2000; DEANFIELD *et al.*, 2005; CHEHAL & GRANVILLE, 2006; RAHMANI *et al.*, 2006).

A menor biodisponibilidade de NO, com aumento de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio resulta, entre outros, na diminuição do vasorelaxamento endotélio-dependente (GRASSI *et al.*, 2008). Esta disfunção endotelial (GIMBRONE & BUCHANAN, 1982) é considerada um marcador precoce de doenças cardiovasculares, sendo sugerido que seja o primeiro passo na patogenia das lesões ateroscleróticas, comumente associado a eventos cardiovasculares futuros (BRUNNER *et al.*, 2005; KRIEGER *et al.*, 2006; ANTONELLO *et al.*, 2007; LIU & HUANG, 2008).

O início da lesão aterosclerótica se dá com o dano ao endotélio vascular (como já citado, causado por fatores como: hipercolesterolemia, hipertensão arterial, hiperglicemia, aumento de espécies oxidativas, etc), que leva à disfunção endotelial (GIMBRONE & BUCHANAN, 1982; ROSS, 1999; LIBBY, 2008; CLEMENT, 2009). A agressão ao endotélio tende a ser maior em regiões de fluxo sanguíneo turbulento, como em curvaturas e bifurcações vasculares, uma vez que as forças hemodinâmicas levam ao maior estresse de cisalhamento (RAHMANI *et al.*, 2006).

Como consequência, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas, favorecendo a retenção de LDL no espaço subendotelial. As LDL no interior da parede vascular são modificadas pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e por enzimas como a mieloperoxidase, tornando-se oxidadas e, deste forma, imunogênicas, entendidas pelo organismo como corpos estranhos. Assim, são estímulos para que as células endoteliais expressem moléculas de adesão para leucócitos como: ICAM-1, P-selectin, E-selectin, PCAM-1 e VCAM-1; proteína quimiotática para monócitos: MCP-1; fatores de crescimento como: M-CSF; e moléculas de adesão para monócitos: PCAM-1, β 2 integrin, VLA-4. Em consequência, há uma resposta inflamatória compensatória, resultando no recrutamento e diapedese de monócitos para a íntima vascular (ROSS, 1999; LUSIS, 2000; LIBBY, 2002; ZADELAAR *et al.*, 2007; ZHENG & LIU, 2007; LIBBY, 2008; NAITO & YOSHIKAWA, 2009).

A proteína quimiotática para monócito-1 (MCP-1) é uma citocina inflamatória quimiotática (quimiocina) de grande importância na regulação da migração e infiltração de monócitos para a parede vascular (HONG *et al.*, 2007). A elevação do nível plasmático de MCP-1 é entendida como um marcador da atividade inflamatória em casos de risco para as doenças cardiovasculares (AHN *et al.*, 2008). Além de quimiotática para monócitos, exerce atração sobre basófilos e células T, sendo crucial na iniciação do processo inflamatório e nas lesões ateroscleróticas (HONG *et al.*, 2007).

O depósito de lipoproteínas na parede arterial é considerado um processo-chave no início da aterogênese e ocorre de maneira proporcional à concentração de LDL no plasma. As lipoproteínas de alta densidade (*High Density Lipoprotein* - HDL) apresentam a capacidade de impedir a oxidação das LDL, uma vez que contêm a paroxonase (PON 1), uma proteína antioxidante protetora contra o processo aterosclerótico (ROSS, 1999; LUSIS, 2000; LIBBY, 2002; LIBBY, 2008).

As LDL oxidadas na íntima arterial também são estímulos para a proliferação e diferenciação dos monócitos em macrófagos – células fagocíticas de defesa, as quais produzem citocinas inflamatórias e expressam receptores “sequestradores” (*scavengers*) das LDL oxidadas, como: SR-A, CD36 e CD68. A expressão desses receptores é mediada por citocinas, como: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ) (LUSIS, 2000; POOLE & FLOREY, 1958 *apud* TEDGUI & MALLAT, 2006; LIBBY, 2008).

Os macrófagos repletos de lipídios são chamados células espumosas (*foam cells*) (BROWN & GOLDSTEIN, 1983); e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (ROSS, 1999; LIBBY, 2002; TEDGUI & MALLAT, 2006; LIBBY, 2008). As estrias já estão presentes em indivíduos jovens; não causam sintomas, mas podem evoluir às placas ateromatosas (HANSSON, 2005).

A progressão à placa aterosclerótica está relacionada com o aumento do número de células espumosas e apoptose destas. Além disso, a lesão vai se estabelecendo com a presença de mediadores da inflamação que estimulam a migração e proliferação das células musculares lisas, produção de matriz extracelular e tecido conectivo que formarão parte da cápsula fibrótica da placa aterosclerótica (ROSS, 1999; LUSIS, 2000; GLASS & WITZTUM, 2001; TEDGUI & MALLAT, 2006; LIBBY, 2008). A placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída pelo núcleo necrótico da lesão: elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico rico em colesterol; e pela cápsula fibrótica, rica em colágeno (ROSS, 1999; LIBBY, 2002).

As placas ateroscleróticas podem tornar-se estáveis ou instáveis (DAVIES & THOMAS, 1981; FALK, 1983; DAVIES, 1996). As estáveis caracterizam-se por um núcleo lipídico relativamente pequeno e um predomínio de colágeno, organizado numa cápsula fibrótica espessa. As instáveis caracterizam-se por um núcleo lipídico proeminente, com atividade inflamatória intensa, especialmente nas bordas laterais da lesão, grande atividade proteolítica e capa fibrótica tênue. Placas estáveis estão associadas a menores chances de complicações, enquanto que as instáveis estão fortemente associadas aos eventos tromboembólicos (DAVIES & THOMAS, 1981; FALK, 1983; DAVIES, 1996; LIBBY, 2002; TEDGUI & MALLAT, 2006; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

A trombose é o último estágio do processo patológico da aterosclerose. Ocorre devido à ruptura da cápsula fibrótica da placa aterosclerótica ou pela erosão endotelial, devido ao processo inflamatório crônico instalado (HANSSON, 2005; LIBBY, 2008). Com a exposição dos lipídios e fatores teciduais da lesão aos componentes do sangue, inicia-se a cascata de coagulação, aderência plaquetária e formação de trombo (GLASS & WITZTUM, 2001). Este, ao se desprender da lesão resulta em oclusão parcial ou total de algum vaso sanguíneo (tromboembolismo), levando à isquemia do coração, cérebro ou extremidades, sendo responsável pelo desfecho clínico das doenças

cardiovasculares, em especial, infarto cerebral e do miocárdio (ROSS, 1999; KADÁR & GLASZ, 2001; TEDGUI & MALLAT, 2006; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007; CLEMENT, 2009).

2.3 Modelo experimental para o estudo da aterosclerose

Estudos sobre aterosclerose conduzidos em humanos apresentam restrições no controle de certas variáveis. Há dificuldades no controle de fatores ambientais e, principalmente, dietéticos, os quais estão estritamente relacionados ao desenvolvimento e progressão do processo aterosclerótico, e podem comprometer os resultados de pesquisas (LI *et al.*, 2008).

A elucidação de mecanismos envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose é pouco provável de ser verificada em humanos devido à complexidade e cronicidade do processo e, também, à impossibilidade de se caracterizar as lesões com métodos não invasivos. As dificuldades desses estudos em humanos demandam alternativas que culminam com a utilização de modelos animais, os quais são extensivamente discutidos e aceitos no meio científico, sendo confiáveis para o estudo da aterosclerose e permitindo a ampliação do conhecimento da sua patogênese e causalidades (ZADELAAR *et al.*, 2007).

A primeira evidência de um modelo experimental para a aterosclerose foi o estudo de Ignatowski, em 1908, com coelhos (IGNATOWSKI, 1908 *apud* TEDGUI & MALLAT, 2006). Desde então, diferentes espécies animais já foram usadas em estudos que objetivaram o entendimento da patogênese, assim como possíveis tratamentos capazes de retardar ou reduzir as lesões ateroscleróticas, existindo dificuldades quanto a um bom modelo experimental para a aterosclerose (JAWIEN *et al.*, 2004).

Animais já utilizados, como alguns primatas, suínos, *hamsters* e pombos, apresentam restrições sejam devido ao tamanho e dificuldade de criação e manutenção, ou por problemas peculiares da espécie. Cachorros e ratos não são bons modelos para o estudo da aterosclerose, já que não desenvolvem lesões espontaneamente e necessitam de alterações drásticas na dieta para apresentarem alguma lesão vascular (JAWIEN *et al.*, 2004). Apesar de coelhos não apresentarem aterosclerose espontaneamente, são bastante responsivos à manipulação dietética de colesterol, desenvolvendo lesões em tempo relativamente curto, porém de localização e composição pouco semelhante às humanas (DROBNIK *et al.*, 2000). Macacos e suínos, atualmente, são pouco

usados; os primeiros devido ao risco de extinção e aos custos, os segundos devido às dificuldades com a manutenção das colônias e manejo desses animais (JAWIEN *et al.*, 2004).

Mesmo frente às dificuldades com os modelos animais, utilizando-se suínos foi, inicialmente, revelado que a infiltração de monócitos era um dos primeiros eventos celulares envolvidos no processo aterosclerótico (GERRITY, 1981). Ainda, estudos com macacos e coelhos foram relevantes na definição de mecanismos envolvidos na iniciação e progressão da aterosclerose (FAGGIOTTO & ROSS, 1984 *apud* JAWIEN *et al.*, 2004; ROSENFELD *et al.*, 1987 *apud* JAWIEN *et al.*, 2004). No entanto, persistia a necessidade de um modelo para o estudo da aterosclerose que fosse viável quanto ao tamanho, reprodutibilidade, custos e semelhança das lesões ateroscleróticas aos humanos (JAWIEN *et al.*, 2004).

Os camundongos são animais com relativa facilidade de manutenção e utilização, entretanto, altamente resistentes ao desenvolvimento da aterosclerose (JAWIEN *et al.*, 2004), sendo que não desenvolvem lesões dentro de um ano nem mesmo quando alimentados com dieta aterogênica (ZADELLAR *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008). Por muitos anos, camundongos não foram usados em estudos sobre aterosclerose devido à convicção de não serem um modelo apropriado, já que não respondiam uniformemente a uma dieta hipercolesterolêmica e não geravam lesões ateroscleróticas reprodutíveis (JAWIEN *et al.*, 2004).

Somente com o uso da engenharia genética foi possível desenvolver linhagens mutantes capazes de apresentar lesões ateroscleróticas: camundongos deficientes de apolipoproteína E (Apo E) e camundongos deficientes de receptores para LDL. Os primeiros são animais que não expressam o ligante Apo E dos receptores que reconhecem os remanescentes de quilomicrons e das lipoproteínas de muito baixa densidade, fazendo com que permaneçam circulantes no sangue, favorecendo a aterosclerose espontânea (ZHANG *et al.*, 1992). Os segundos são animais que não expressam receptores para lipoproteínas de baixa densidade (camundongos LDLr *-/-* KO), LDLr *-/-* *knockout* ou C57BL/6, desenvolvidos em 1993 por Ishibashi e colaboradores, como modelo de hipercolesterolemia familiar (ISHIBASHI *et al.*, 1993).

Em humanos, mutações no gene que codifica receptores para a LDL causam hipercolesterolemia familiar. Logo, camundongos deficientes deste gene para o receptor de LDL apresentaram um modesto aumento nos níveis de colesterol plasmático quando alimentados com

uma dieta padrão para roedores, desenvolvendo morosamente lesões ateroscleróticas. Entretanto, quando estes animais foram submetidos à dieta hipercolesterolêmica (acrescidas em 1,25 % de colesterol) elevaram drasticamente os níveis de colesterol plasmático e desenvolveram lesões ateroscleróticas severas rapidamente (KNOWLES & MAEDA, 2000; ZADELLAR *et al.*, 2007).

É considerado que os camundongos LDLr *-/-* KO apresentam uma anormalidade de lipoproteínas mais modesta que os camundongos deficientes de Apo E, desenvolvendo aterosclerose de forma lenta e sutil quando em dieta padrão para roedores. Entretanto, é um modelo bastante responsivo à dieta, bastando que se aumente o colesterol dietético para que os níveis de colesterol plasmáticos se elevem e se formem grandes lesões ateroscleróticas (JAWIEN *et al.*, 2004).

O aparecimento das placas ateroscleróticas nos camundongos LDLr *-/-* KO é tempo-dependente e se inicia na aorta proximal (ZADELAAR *et al.*, 2007). A morfologia, composição celular e localização preferencial das lesões ateroscleróticas nesses animais são documentadas na literatura científica e são semelhantes às lesões em humanos em vários aspectos, iniciando com células espumosas e estágio de estrias gordurosas, até estágios mais avançados de proliferação de cápsula fibrótica da lesão (ISHIBASHI *et al.*, 1994; ISOBE *et al.*, 2006; ZADELAAR *et al.*, 2007; NAITO & YOSHIKAWA, 2009).

Frente a essa similaridade, o modelo animal geneticamente modificado é aceito e extensivamente utilizado na investigação dos mecanismos aterogênicos e em estudos que buscam intervenções antiaterogênicas (LUSIS, 2000; ISOBE *et al.*, 2006; LIBBY, 2008). Permitiu um grande avanço para o entendimento da patogênese da aterosclerose, contribuindo para a elucidação dos mecanismos inflamatórios envolvidos na sua iniciação e progressão (ROSS, 1999; JAWIEN *et al.*, 2004; LIBBY, 2008).

2.4 Prevenção e tratamento do processo aterosclerótico: fatores dietéticos

A IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2007) pontua algumas medidas de prevenção e de tratamento contra o processo aterosclerótico e as doenças cardiovasculares que visam à melhoria do perfil lipídico. Como primeiro passo para a redução dos riscos de desenvolvimento de doença cardiovascular está a mudança de estilo de vida. Dentre esta, a adoção de hábito alimentar saudável – redução do consumo de alimentos ricos

em colesterol, gorduras saturadas e gorduras trans; preferência por alimentos fontes de ácidos graxos insaturados e fitoesteróis; aumento do consumo de fibras, proteína de soja e substâncias antioxidantes como os polifenóis – parecem ter impacto positivo na prevenção e tratamento da aterosclerose e suas complicações clínicas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

Não havendo melhora satisfatória do quadro dislipidêmico predisponente à aterosclerose com as mudanças de estilo de vida, ou na impossibilidade de aguardar pelos efeitos destas mudanças, a Diretriz aponta para uma segunda estratégia, sendo ela medicamentosa. A escolha da classe terapêutica está condicionada ao tipo de dislipidemia presente; sendo as estatinas a classe recomendada em casos de hipercolesterolemia isolada (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007). Devido ao potencial em reduzir o colesterol plasmático, as estatinas poderiam ajudar no restabelecimento da função vasodilatadora endotélio-dependente de indivíduos com aterosclerose, apresentando efeitos benéficos às doenças cardiovasculares (RAHMANI *et al.*, 2006; STOLL & BENDSZUS *et al.*, 2006; ZAELAAR *et al.*, 2007).

Frente ao grande impacto na saúde coletiva e ao número de óbitos devido às doenças cardiovasculares, estudos que se prestem a desvendar mecanismos da progressão e meios para o controle ou redução do processo aterosclerótico são de grande valia. A dieta, por ser um meio de intervenção, é um campo amplo para estudos sobre a aterosclerose.

Verifica-se que, por vezes, o consumo de alimentos e bebidas de origem vegetal é popularmente feito com o intuito de tratar ou reduzir o risco de doenças. Isto por que produtos de origem vegetal apresentam substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas, as quais podem exercer atividades farmacológicas (STANGL *et al.*, 2006). Através do metabolismo secundário do reino vegetal ocorre a produção de moléculas que cumprem funções importantes, como de proteção contra as adversidades encontradas no meio e de favorecimento à reprodução das plantas (TAIZ & ZEIGER, 2006).

Dentre estas substâncias do metabolismo secundário, há quatro classes significativas para o ser humano: terpenóides, alcalóides e compostos nitrogenados relacionados, fenilpropanóides e compostos fenólicos relacionados e os flavonóides (MANN *et al.*, 2007). A literatura científica relata importantes atividades biológicas de diferentes substâncias naturais, em especial os flavonóides, que podem ser benéficos ao tratamento e prevenção das doenças crônicas não

transmissíveis, dentre elas, as cardiovasculares (MIURA *et al.*, 2001; MANN *et al.*, 2007; STANGL *et al.*, 2007; ZHENG & LIU, 2007; GRASSI *et al.*, 2008; KURIYAMA, 2008, RAMESH *et al.*, 2010).

O termo “fenólico” ou “polifenol” pode ser definido como uma molécula que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, metoxilas, glicosídeos e outros). É um dos mais numerosos grupos de substâncias do reino vegetal, ocorrendo milhares de compostos polifenólicos, divididos em pelo menos 10 classes diferentes, de acordo com a estrutura química. São biossintetizados através da via do chiquimato e acetato e, frequentemente, encontram-se ligados a açúcares (glicosídeos), ou como agliconas (HELDT, 1997).

2.5 Chá verde (*Camellia sinensis*)

O chá é a segunda bebida mais consumida em todo o mundo, só perdendo para a água (CHENG, 2006; YUNG *et al.*, 2008, MOORE *et al.*, 2009). Sejam suas folhas apenas secas: chamado de chá verde; parcialmente fermentadas: denominado chá oolong; ou fermentadas: o chá preto; são todos produtos da mesma espécie: a *Camellia sinensis* (FRASER *et al.*, 2007; STANGL *et al.*, 2007). A diferença está nas quantidades e qualidade dos compostos fenólicos, como catequinas, teaflavinas e tearubiginas, de acordo com o método de processamento empregado às folhas da planta – **Figura 1** (CHENG, 2006; JOCHMANN *et al.*, 2008).

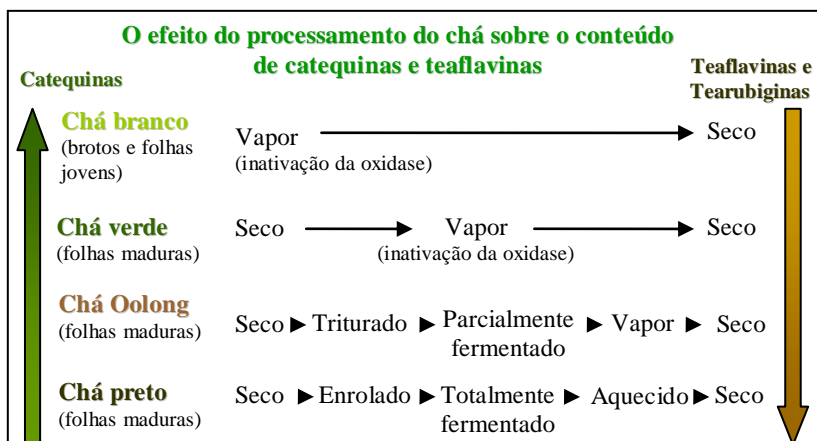


Figura 1: Diferenças entre os tipos de chás originários da *C. sinensis*, de acordo com o método de processamento empregado.

A *C. sinensis* é originária do sul da China e extensivamente cultivada no sul da Ásia, incluindo China, Índia, Japão, Taiwan, Sri Lanka e Indonésia (FIGUEROA *et al.*, 2004; FRASER *et al.*, 2007). Tem uma longa história de uso, sendo consumida há 5.000 anos nos países orientais (HOTTA *et al.*, 2006). Nestas populações o hábito de consumir o chá tem um significado que vai além de uma simples bebida, detém importância social e cultural, sendo sinônimo de bem estar, harmonia, beleza e serenidade (FIGUEROA *et al.*, 2004).

As folhas de *C. sinensis* contêm uma grande quantidade de polifenóis, principalmente, flavonóides, correspondendo a, aproximadamente, 30 % de seu extrato seco (GRAHAM, 1992; STANGL *et al.*, 2006). Dentre esses flavonóides, a maior subclasse encontrada no chá verde são os flavanóis, os quais são representados pelos monômeros de catequinas: catequina, epicatequina, epigalocatequina, epicatequina galato e epigalocatequina galato – **Figura 2** (NAKAGAWA & YOKOZAWA, 2002; YUNG *et al.*, 2008). Além desses flavanóis, outros polifenóis também são encontrados, como, por exemplo, o kaempferol e a quercetina (STANGL *et al.*, 2007).

Com relação à metabolização das catequinas, estas sofrem alguns processos de biotransformação como metilação, glucuronidação e sulfatação, sendo a EGCG-4'-*O*-glucuronida o maior metabólito formado em humanos, ratos e camundongos. A absorção das catequinas, verificada em ratos, é intestinal. A meia vida da EGCG, em humanos, é de 5 a 5,5 horas, decaindo e não sendo mais detectada no plasma após 24h. Ensaios experimentais indicam que as catequinas são rapidamente e extensivamente metabolizadas; sendo a excreção da EGCG através da bile, enquanto que da EGC e da EC, através da urina e bile (revisado por KHAN & MUKHTAR, 2007).

Devido ao chá verde apresentar esta grande quantidade de polifenóis em sua constituição, é alvo de estudos que sugerem sua influência no processo aterosclerótico e disfunção endotelial (HUANG *et al.*, 1998; NAKAGAWA & YOKOZAWA, 2002; CHYU *et al.*, 2004; HOTTA *et al.*, 2006; HOU *et al.*, 2007; MOORE *et al.*, 2009), entre outros.

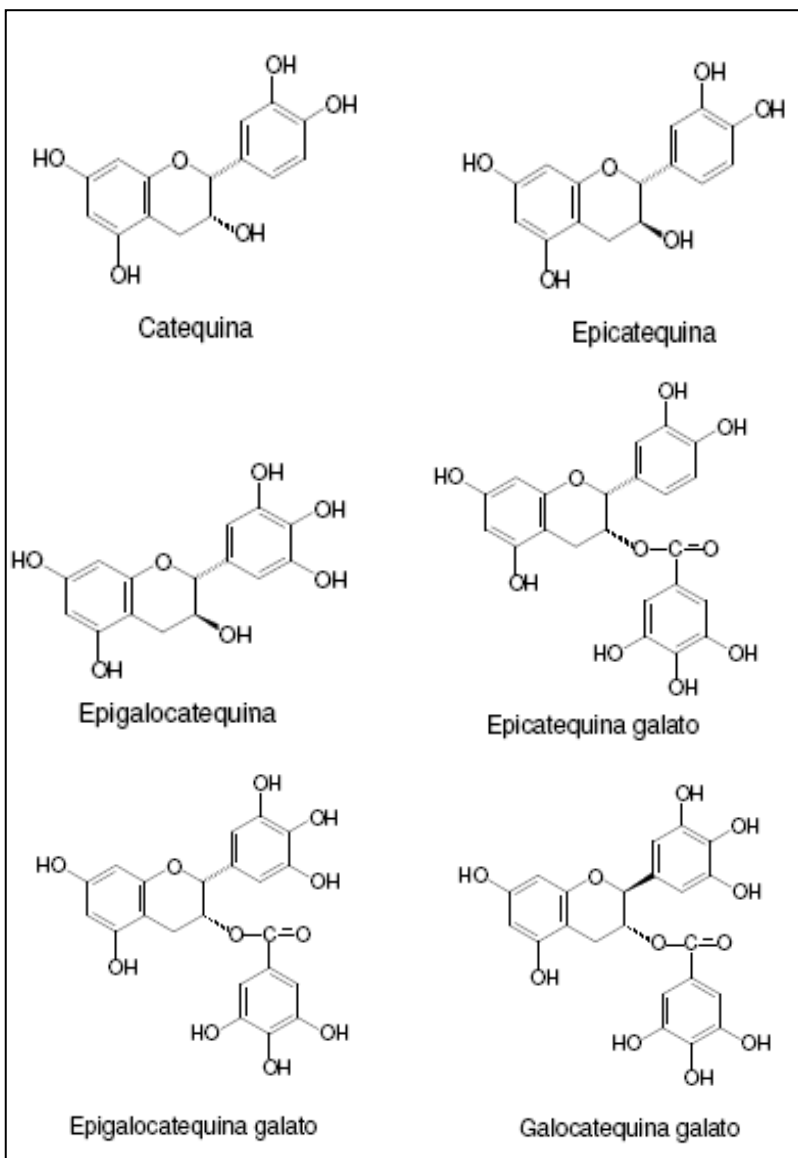


Figura 2: Estrutura química dos flavanóis presentes no chá verde (Adaptado de NAKAGAWA & YOKOZAWA, 2002).

Além de resultados observados em estudos experimentais, dados epidemiológicos também mostraram uma associação entre o consumo de chá verde e proteção cardiovascular (THIFT *et al.*, 1996; LORENZ *et al.*, 2004; ANTONELLO *et al.*, 2007; GRASSI *et al.*, 2008; JOCHMANN *et al.*, 2008; KURIYAMA, 2008). Sendo assim, apesar de algumas contradições, há indícios de que os flavonóides do chá verde podem ser benéficos contra o processo aterosclerótico, seja atuando na sua prevenção ou no seu tratamento (SON *et al.*, 2004; HOTTA *et al.*, 2006; ANTONELLO *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007; JOCHMANN *et al.*, 2008).

Estudos sugerem que os monômeros de catequinas, maiores componentes polifenólicos do chá verde, seriam os responsáveis por efeitos protetores no processo aterosclerótico (HUANG *et al.*, 1998; BABU *et al.*, 2006; HOTTA *et al.*, 2006; HOU *et al.*, 2007; JOCHMANN *et al.*, 2008). Especial atenção tem sido dada à epigalocatequina galato (EGCG), a catequina mais abundante do chá verde, representando 48 a 55 % da sua composição (STANGL *et al.*, 2006).

Apesar do conhecimento dos efeitos positivos do chá verde, busca-se o entendimento de seus mecanismos moleculares e efeitos fisiológicos envolvidos no processo aterosclerótico, os quais ainda são pouco elucidados. Há resultados mostrando que as catequinas do chá estão envolvidas nos processos: antioxidativo, antiinflamatório, antiplaquetário (antitrombogênico) e antihipertensivo (vasodilatador), propiciando efeitos favoráveis ao funcionamento endotelial (SON *et al.*, 2004; HOTTA *et al.*, 2006; STANGL *et al.*, 2006; ANTONELLO *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007; STANG *et al.*, 2007; JOCHMANN *et al.*, 2008); além de ter influência sobre as lipoproteínas plasmáticas (LIN & LIN-SHIAU, 2006), o que poderia interferir no processo aterosclerótico e doenças cardiovasculares (BABU & LIU, 2008).

2.5.1 Evidências de atividades biológicas do chá verde

Dados experimentais e clínicos sugeriram que os constituintes do chá verde melhoraram a função endotelial, podendo, assim, ser benéficos em pacientes com doenças cardiovasculares. No estudo de Duffy e colaboradores (2001), o consumo agudo e por 4 semanas de chá parece ter amenizado o quadro de disfunção endotelial em pacientes com doenças cardiovasculares, verificando-se um aumento da vasodilatação braquial.

Em estudos *in vitro*, catequinas purificadas do chá verde promoveram vasorelaxamento endotélio-dependente através da via do NO, em anéis de aortas de ratos pré-contraídas com fenilefrina, em resposta à ativação dose-dependente da NOSe. Essa vasodilatação é atribuída à rápida fosforilação e ativação da NOSe através da fosfatidilinositol 3-quinase, pela via dependente da proteína quinase B (AKT) (LORENZ *et al.*, 2004; JOSCHMANN *et al.*, 2007).

Um estudo em camundongos deficientes de Apo E sugeriu que a EGCG do chá verde interferiu nos processos de proliferação e migração de células de musculatura lisa aórticas, da média para o espaço subendotelial, mostrando reduzir o crescimento destas, estacionando-as na fase G1 do ciclo mitogênico (CHYU *et al.*, 2004). Demonstraram, também, que o PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), um marcador do crescimento celular, é inibido pela EGCG *in vitro* (CHYU *et al.*, 2004).

Além disso, o chá verde mostrou suprimir a síntese de DNA de células musculares lisas de aortas de ratos e inibir o fator de crescimento derivado de plaquetas, o qual tem um importante papel na proliferação celular, em células musculares lisas de aortas de humanos e ratos. Desta forma, conclui-se que as catequinas do chá verde podem interferir beneficemente no processo aterosclerótico por apresentarem atividade sobre o funcionamento endotelial através do vasorelaxamento via NO e inibição do crescimento celular no músculo liso (revisado por STANG *et al.*, 2006; STANG *et al.*, 2007).

Em geral, os mecanismos que vêm sendo sugeridos como envolvidos na prevenção da aterosclerose pelo consumo de chá verde são vinculados ao poder *scavenger*, ou seja, poder “sequestrador” de radicais livres e propriedades antioxidantes dos flavonóides do chá verde. Os polifenóis do chá são considerados antioxidantes em virtude do número e arranjo de seus grupos fenólicos hidroxila, devido às duplas ligações de seus anéis benzênicos que parecem neutralizar radicais livres e reduzir a peroxidação lipídica. Além disso, estes flavonóides podem fazer quelatação de íons metais, inibindo a ativação de enzimas pró-oxidantes (STANGL *et al.*, 2006; STANGL *et al.*, 2007).

As catequinas do chá apresentaram diferentes potenciais antioxidantes, citadas em ordem decrescente: epigallocatequina galato (EGCG) > epicatequina galato (ECG) > epigallocatequina (EGC) > epicatequina (EC) (YANG & KOO, 2000; STANG *et al.*, 2006). Esta propriedade pode promover efeitos benéficos reduzindo o desenvolvimento da aterosclerose, já que a oxidação das LDL parece ser pré-requisito para a diferenciação de monócitos em macrófagos,

formação das células espumosas e início das lesões ateroscleróticas (YANG & KOO, 2000; NAITO & YOSHIKAWA, 2009).

Estudos *in vitro* vêm demonstrando que os flavonóides do chá verde podem inibir a oxidação de LDL, possivelmente pela redução da produção de superóxidos pelos macrófagos e, assim, prevenir a formação de células espumosas. Entretanto, esta evidência não é tão clara em estudos com modelos animais e em humanos (STANGL *et al.*, 2006).

Um estudo de Yang & Koo (2000) analisou o potencial antioxidante do *Lung Chen Tea* – um chá verde chinês não fermentado – sobre a oxidação induzida de LDL em cultura de células endoteliais de vasos do cordão umbilical de humanos. Foi verificado que o chá reduziu a oxidação da LDL num perfil dose-dependente e inibiu a ação das lipoxigenases. A redução da peroxidação lipídica foi evidenciada pela diminuição das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Foi atribuído às catequinas presentes no chá a propriedade de reduzir a oxidação de LDL nas células endoteliais e, desta forma, ser benéfico à prevenção de doenças cardiovasculares.

O chá verde também demonstrou efeito antioxidante em camundongos deficientes de apolipoproteína E (ZHANG *et al.*, 1992), alimentados com dieta hipercolesterolêmica. Verificou-se a inibição da oxidação das partículas de LDL, como também a redução do colesterol plasmático dos animais que receberam o chá verde (MIURA *et al.*, 2001).

Outra hipótese, que vem sendo sugerida para a elucidação de possíveis efeitos benéficos do consumo de chá verde nas doenças cardiovasculares, considera as propriedades antiinflamatórias de seus constituintes. A inflamação tem relação com as doenças cardiovasculares devido ao processo aterosclerótico, uma vez que algumas células relacionadas à resposta imune já estão presentes desde o início das lesões ateroscleróticas, e as moléculas liberadas na inflamação, como as prostaglandinas pró-inflamatórias, aceleram a progressão das lesões (ROSS, 1999; LIBBY, 2002; STANGL *et al.*, 2007).

Plantas tradicionalmente conhecidas por apresentarem poder medicinal e, usadas no tratamento de condições inflamatórias, mostraram efeitos inibitórios sobre a enzima da cascata do ácido araquidônico COX-2 (isoforma induzida da enzima cicloxigenase), inibindo a biossíntese de prostaglandinas catalisadas por ela, *in vitro*. Entretanto, o mecanismo desta inibição não está claro (HOU *et al.*, 2007).

Num estudo em que foi utilizada a cultura de células *murine macrophage-like RAW264*, verificou-se que um polifenol do chá verde, o prodelfinidina B-4 3'-O-galato (PDG) apresentou capacidade de suprimir a COX-2 e a prostaglandina pró-inflamatória E₂ (PGE₂). Além disso, foi sugerido que o referido polifenol possa inibir a expressão da NOS_i (isoforma induzida da enzima NOS) interferindo, assim, na inflamação (HOU *et al.*, 2007) e, conseqüentemente, nos processos de desenvolvimento e progressão da aterosclerose. Ramesh e colaboradores (2010) verificaram, recentemente, que a EGCG reduziu marcadores inflamatórios em ratos alimentados com dieta hipercolesterolêmica, podendo evitar a progressão das lesões ateroscleróticas.

Noutro estudo, as catequinas do chá verde demonstraram inibir a agregação plaquetária e reduzir a formação de trombos em ratos e coelhos em ensaios *in vitro* e *ex vivo*. Foi verificado que as catequinas suprimiram a atividade da enzima cicloxigenase e inibiram a formação do tromboxano A₂. Estes dados permitem a proposição de que, as catequinas do chá verde, por apresentarem um efeito antiplaquetário, possam diminuir as complicações clínicas do processo aterosclerótico (SON *et al.*, 2004).

Há indícios de possíveis ações do chá verde sobre o perfil lipídico, exercendo influência no processo aterosclerótico (LIN & LIN-SHIAU, 2006). Apesar das divergências, num experimento com ratos, foi demonstrada a supressão da lipogênese pela diminuição dos triglicerídeos, colesterol e LDL-colesterol plasmáticos, com o tratamento com *C. sinensis* (KUO *et al.*, 2005). Também foi verificada a redução na absorção intestinal de colesterol devido à diminuição da sua solubilidade nas micelas mistas, quando da infusão de catequinas em ratos canulados (IKEDA *et al.*, 1992).

A **Figura 3** sintetiza conclusões extraídas da revisão de literatura a respeito das possíveis atividades do chá verde sobre o processo aterosclerótico.



Figura 3: Indícios de atividades biológicas do chá verde.

3. JUSTIFICATIVA

É evidente o impacto das doenças cardiovasculares na morbimortalidade da população. Assim, busca-se elucidar estratégias para o seu controle, sendo que algumas substâncias naturalmente presentes em vegetais, derivadas do metabolismo secundário das plantas, como por exemplo, os polifenóis, são relatadas, na literatura, por apresentarem possíveis ações benéficas contra várias enfermidades, incluindo as doenças cardiovasculares.

Na tentativa de se descobrir meios de retardar a evolução do processo aterosclerótico, justificam-se os estudos experimentais, em modelos animais específicos, para o entendimento dos mecanismos envolvidos na patogenia da aterosclerose.

4. HIPÓTESE DA PESQUISA

Diante das evidências e relatos da literatura que mostram algumas atividades biológicas do chá verde, a hipótese do estudo é a de que o tratamento com o chá verde reduz a progressão do processo aterosclerótico.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

- ✓ Avaliar o efeito do tratamento, por via oral, com chá verde no processo aterosclerótico de camundongos LDLr ^{-/-} KO.

5.2 Objetivos específicos

- ✓ Analisar o perfil lipídico de camundongos LDLr ^{-/-} KO submetidos ao tratamento, por 4 semanas, com o chá verde.
- ✓ Avaliar a reatividade vascular *ex vivo* de aorta torácica de camundongos LDLr ^{-/-} KO.
- ✓ Verificar a extensão das lesões ateroscleróticas na aorta ascendente proximal de camundongos LDLr ^{-/-} KO por meio de técnicas histológicas *in vivo*.
- ✓ Quantificar a proteína quimiotática para monócito 1 (*Monocyte Chemotactic Protein 1*, MCP-1) no plasma de camundongos LDLr ^{-/-} KO por meio de detecção imunoenzimática.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Delineamento do estudo

O estudo tem delineamento experimental (HULLEY *et al.*, 2006), avaliando-se a ação do chá verde sobre o processo aterosclerótico com um modelo animal específico para o estudo da aterosclerose.

6.2 Animais

Utilizou-se a linhagem de camundongo C57BL6 (homozigoto com deficiência para receptores de lipoproteína de baixa densidade, LDLr *-/-* KO) (ISHIBASHI *et al.*, 1993), obtida por doação de um casal de animais, do Depto de Farmacologia – UFSC, Laboratório de Produtos Naturais, sob a coordenação da Professora Dr^a Rosa Maria Ribeiro-do-Valle Nicolau. Esses camundongos, originários do *Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine)*, chegaram ao Depto de Farmacologia também através de doação da Professora Dr^a Marta Helena Krieger, Depto de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os camundongos foram criados e mantidos no Biotério do Laboratório de Nutrição Clínica, Centro de Ciências da Saúde - CCS, sob a coordenação da Professora Dr^a Elisabeth Wazlawik.

Foram utilizados 60 camundongos, machos e fêmeas (TSUKAMOTO *et al.*, 1999; VELHO *et al.*, 2006), adultos (12 semanas, ~ 25 g), alojados em gaiolas plásticas com maravalhas, à temperatura de $22 \pm 2^\circ$ C, com ciclo claro/escuro de 12 horas, controlados automaticamente e em ambiente com exaustão de ar (KRIEGER *et al.*, 2006). Receberam ração normal para roedores (comercial, NUVILAB CR1®) ou ração hipercolesterolêmica (aterogênica) (MIURA *et al.*, 2001), procedente da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (KRIEGER *et al.*, 2006) - **Tabela 1**; e água *ad libitum*.

Tabela 1: Composição básica das rações normal (CR1) e hipercolesterolêmica (aterogênica), conforme informações dos fabricantes.

Ingredientes	Normal	Aterogênica g/100g
Proteína	22,0	20,7
Lipídios	4,0	20,0
Carboidrato	43,5	48,3
Fibra	8,0	5,0
Mix vitamínico-mineral	10,0	4,5
Umidade	12,5	--
Colina	--	0,5
Colesterol	--	1,25

6.3 Materiais e reagentes

Foi utilizado o extrato atomizado hidrossolúvel de folhas de *Camellia sinensis* (Sunphenon 30S® - *Standardized Green Tea Extract Powder*), família *Ternstroemiaceae*, de único lote, originário da China e comercializado por Taiyo *International Inc.*, Taiyo Kagaku Co., Ltd. (China), doado pela farmácia de manipulação Vital Farm Ltda., Florianópolis, SC, Brasil. O produto tem certificação garantindo quantidades de, no mínimo, 30 % de polifenóis; e quantidades de, no máximo, 8 % de cafeína, 3,0 µg/g de chumbo e 2,0 µg/g de arsênio. Além disso, o laudo microbiológico atesta ausência de Coliformes totais, *E. coli*, *Salmonella* e *S. aureus* (ANEXO). O extrato seco de chá verde foi armazenado sob temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), protegido de umidade e da luz direta.

As substâncias a seguir foram obtidas da empresa Sigma (*Steinheim*, Alemanha ou *St. Louis*, EUA): Gelatina de pele suína tipo A, Salina Tamponada (*Phosphate Buffered Saline* – PBS), KCl, Acetilcolina, Fenilefrina. As substâncias: KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , NaCl, NaHCO_3 , provenientes da Vetec Química Fina Ltda. (Taboão da Serra/SP, Brasil). Formol e NaHCO_3 , adquiridos da Nuclear Ltda. (Diadema/SP, Brasil); hematoxilina e glicose, empresa Merck S.A (Rio de Janeiro/RJ, Brasil); os corantes *Oil red* e *Light Green*, empresa Amresco Inc. (*Solon*, EUA); o anticorpo para proteína quimiotática para monócitos 1, *Monocyte Chemotactic Protein 1* (CCL2/IE MCP-1) adquirido da empresa R&D Systems, Inc. (*Minneapolis*, USA). Os anestésicos injetáveis quetamina e xilazina foram adquiridos da Vetbrands Saúde Animal Ltda. (Paulínia/SP, Brasil). Os kits enzimáticos

para análise de lipídios sanguíneos foram oriundos da Labtest Diagnóstica S.A (Lagoa Santa/MG, Brasil). E o *kit* para detecção de alanina aminotransferase (ALT), Bioclin, foi obtido de Quibasa Química Básica Ltda (Belo Horizonte/MG, Brasil).

6.4 Métodos

6.4.1 Análise de compostos do chá verde (*Camellia sinensis*) por HPLC

A análise de compostos fenólicos foi feita com a injeção de 5 μL da amostra em cromatógrafo Shimadzu LC-10A (Quioto, Japão), equipado com coluna de fase reversa (C18 Shim-pack, 250 mm x 4,6 mm \varnothing , 5 μm , 40°C) acoplada a pré-coluna (Shim-pack, 30 mm x 4,6 mm \varnothing , 5 μm) e detector UV-visível (Shimadzu SPD 10A, 280 ηm). A fase móvel foi composta de água: ácido acético: η -butanol (350: 1: 10, v/v/v), com fluxo de 0,8 mL/min. Os analitos de interesse foram identificados segundo o tempo de retenção de compostos padrões (Sigma-Aldrich, 10 $\mu\text{g/mL}$) e co-cromatografia destes. A quantificação dos metabólitos utilizou curvas-padrão externas de ácido gálico ($y = 9781x - r^2 = 0.99$) e galocatequina ($y = 795,09x - r^2 = 0.99$) (MORAIS et al., 2009), sendo os valores apresentados correspondentes à média de 3 injeções por amostra, calculada a partir da área dos picos de interesse.

As metilxantinas foram isoladas do extrato de chá verde pela incubação com 60 mL de diclorometano por 60 min. O extrato solvente foi recuperado e concentrado a 2 mL sob baixa pressão. Alíquotas (5 μL) foram injetadas em cromatógrafo Shimadzu LC-10A (Quioto, Japão), equipado com coluna de fase reversa (C18 Shim-pack, 250 mm x 4,6 mm \varnothing , 5 μm), acoplada a pré-coluna (Shim-pack, 30 mm x 4,6 mm \varnothing , 5 μm), termostatizadas a 30°C, com detecção a 272 ηm . Uma solução de acetonitrila: 0,1 % ácido fórmico (15: 85, v/v) foi utilizada como fase móvel, em fluxo de 1,0 mL/min. A identificação das metilxantinas baseou-se no tempo de retenção e na co-cromatografia de compostos padrões (10 $\mu\text{g/mL}$), sob as mesmas condições experimentais. A análise quantitativa utilizou curvas-padrão externas de cafeína (Sigma-Aldrich, $y = 14502,02x; r^2 = 0.99$) e teofilina (Sigma-Aldrich, $y = 34931,57x; r^2 = 0.99$) (MORAIS et al., 2009) e considerou a área dos picos de interesse para efeito dos cálculos de concentração. Os valores apresentados ($\mu\text{g/mL}$) correspondem à média de 3 injeções por amostra.

Para a análise dos carotenóides no extrato de chá verde, alíquotas (10 µL) da amostra concentrada foram injetadas em cromatógrafo Shimadzu LC-10A (Quioto, Japão), equipado com coluna de fase reversa (C18 Vydac 218TP54, 250 mm x 4.6 mm Ø, 30°C) acoplada a uma pré-coluna (Vydac 218TP54, 30 mm x 4.6 mm Ø, 5 µm) e detector UV-visível (450 nm). A fase móvel foi composta de MeOH: CH₃CN (90: 10, v/v), com fluxo de 1,0 mL/min. A identificação dos analitos considerou os tempos de retenção e a co-cromatografia de compostos padrões (10 µg/mL) sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos carotenóides utilizou curvas-padrão externas [0,5–45 µg/mL para luteína e zeaxantina ($r^2 = 0,99$) e 0,01–12 µg/mL para β-caroteno ($r^2 = 0,98$)] (KUHLEN *et al.*, 2009). Os valores médios de concentração (µg/mL) foram calculados baseando-se na área dos picos dos analitos de interesse e correspondem à média de 3 injeções por amostra.

6.4.2 Preparo e administração do chá verde

O chá verde constituiu-se de uma solução de reconstituição do extrato atomizado de chá verde com água destilada (veículo) à temperatura ambiente, preparado diariamente, imediatamente antes do tratamento dos animais, evitando-se a oxidação do produto. As doses foram: 50, 100 e 300 mg/kg, baseadas em relatos da literatura utilizando protocolos experimentais semelhantes, em camundongos ou ratos (YAMAGUCHI *et al.*, 1991; MIURA *et al.*, 2001; BABU *et al.*, 2006).

O tratamento de chá verde foi administrado aos animais por via oral, com uma agulha para gavagem específica para camundongos, diariamente, por um período de 4 semanas (FERNANDES *et al.*, 2006); sendo o volume dado proporcional ao peso de cada camundongo (aproximadamente 0,2 mL/animal/dia).

6.4.3 Protocolo experimental

No início do experimento, tempo zero, os animais foram pesados e distribuídos de forma homogênea entre os grupos experimentais – **Tabela 2**. O peso dos animais foi aferido semanalmente em balança digital Marte – Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda. (AS2000C, n°série: 284449, capacidade 2.000 g/0,1 g, SP, 2005), sendo o cálculo dos volumes dos tratamentos corrigido pelo peso de cada camundongo. A ingestão alimentar também foi avaliada semanalmente,

por meio da diferença entre o peso da ração oferecida, menos o peso das sobras, dividido por 12 (número de animais por grupo, n).

Tabela 2: Grupos experimentais, tipos de ração e tratamentos.

Grupos experimentais:	Ração	Tratamento via oral (V.O.)
Ração Normal (RN)	Normal*	Veículo
Controle		
Hipercolesterolêmico (CH)	Hipercol.**	Veículo
H 50	Hipercol.	Chá verde 50 mg/kg
H 100	Hipercol.	Chá verde 100 mg/kg
H 300	Hipercol.	Chá verde 300 mg/kg

* Ração comercial para roedores.

** Hipercolesterolêmica (aterogênica): 20 % de lipídeos, 1,25 % de colesterol, 0,5 % de colina.

Pesquisas com modelos animais utilizam um n de 8 a 10 animais por grupo, sendo que quantidades menores podem colocar em risco os resultados. Por prudência, devido à sensibilidade dos camundongos LDLr -/- KO e perda de material biológico para as análises no momento de coleta e experimentação, principalmente em função do tamanho reduzido desses animais (CARVALHO & LOPES, 2006), foram utilizados 12 animais para cada grupo experimental.

Este n considerou os diferentes métodos empregados para a análise da progressão aterosclerótica – **Figura 4**. Para análises de lipídeos sanguíneos foram coletadas amostras de sangue de todos os animais do experimento: 12 por grupo. Para análises de reatividade vascular em aorta torácica e para a histologia de aorta ascendente proximal: 8 amostras de cada grupo. Para a detecção imunoenzimática da proteína quimiotática para monócitos 1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*, MCP-1) no plasma: 6 amostras de cada grupo. Para a determinação da alanina aminotransferase (ALT) no plasma: 6 amostras de cada grupo; sendo que, camundongos dos quais retirou-se a artéria torácica e coração, também tiveram o sangue coletado para análises de outros parâmetros (MCP-1 e ALT).

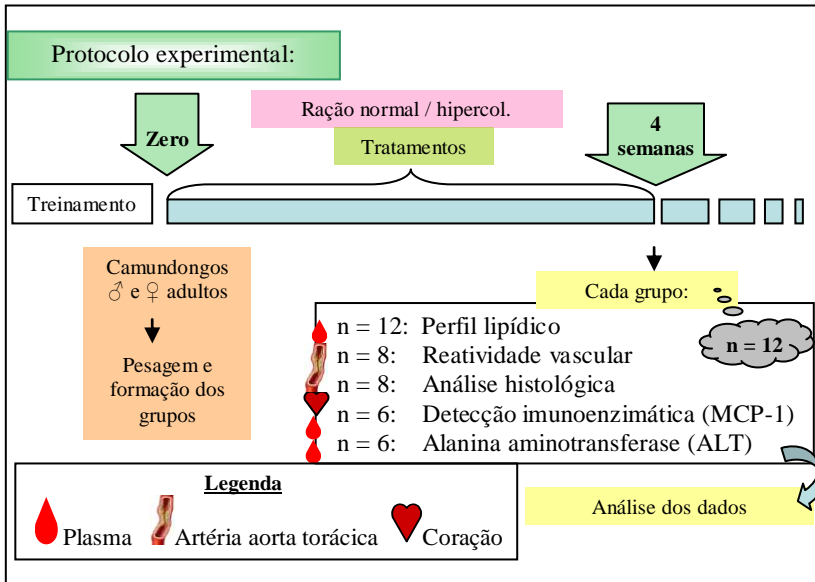


Figura 4: Desenho do estudo.

6.4.4 Coleta de sangue e obtenção de plasma

Após 4 semanas de experimentação, e em jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina (FERNANDES *et al.*, 2006; CARVALHO & LOPES, 2006), 90 e 15 mg/kg respectivamente, via intra-peritoneal (I.P.), para a coleta de sangue por via retro-orbital. O sangue foi coletado com capilares heparinizados, transferido para *ependorfs* e centrifugado a 3000 rpm por 15 min. O plasma obtido foi armazenado a -18° C para as posteriores análises.

6.4.5 Determinações bioquímicas de lipídios

As determinações do colesterol total, lipoproteínas de alta densidade e triglicerídeos no plasma dos camundongos foram realizadas utilizando-se reagentes comerciais LABTEST S.A.® (Lagoa Santa/MG, Brasil). Amostras obtidas de animais alimentados com ração hipercolesterolêmica foram diluídas em solução salina na proporção de 1:3 em função da sensibilidade dos reagentes. Todas as determinações

foram feitas em duplicatas e, havendo diferença maior que 5 %, a análise foi repetida.

O método para determinação do colesterol total baseia-se na hidrólise de seus ésteres pela colesterol-esterase para produzir colesterol livre que, juntamente com o colesterol livre pré-existente, é oxidado em uma reação catalisada pela enzima colesterol oxidase para formar o colest-4-en-ona e o peróxido de hidrogênio.

Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados e complexados, formando a antipirilquinonimina que tem absorvância máxima em 500 nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração de colesterol total na amostra.

Para a determinação do colesterol da fração HDL no plasma dos camundongos, as lipoproteínas contendo apo B-100 (VLDL e LDL) foram seletiva e quantitativamente precipitadas através do ácido fosfotúngstico (0,4 mmol/L) e cloreto de magnésio (20 mmol/L). Após centrifugação (15 min, 1200 x g), o colesterol na HDL foi determinado no sobrenadante por um sistema enzimático idêntico ao descrito, anteriormente, para o colesterol total.

O método para a determinação dos triglicerídeos no plasma dos camundongos baseia-se na ação da enzima lipase que hidrolisa os triglicerídeos, formando glicerol e ácidos graxos. O glicerol reage com o trifosfato de adenosina por ação da glicerolquinase, formando glicerol-3-fosfato, que por ação da enzima glicerol-3-fosfato oxidase forma dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio reage com a 4-aminoantipirina e o clorofenol, numa reação catalisada pela peroxidase, produzindo a quinoneimina, com absorvância máxima em 540 nm. A intensidade da cor vermelha é diretamente proporcional à concentração de triglicerídeos na amostra.

A determinação do colesterol não-HDL foi realizada indiretamente, por meio da diferença entre colesterol total e fração HDL, pela equação de Friedwald: $[\text{Colesterol VLDL} + \text{IDL} + \text{LDL} = \text{Colesterol Total} - \text{Fração HDL}]$ (FRIEDWALD *et al.*, 1972).

6.4.6 Ensaio *ex vivo* de reatividade vascular em aorta isolada de camundongos LDLr^{-/-} KO

Após a coleta de sangue, 8 animais de cada grupo foram analisados quanto à reatividade vascular. A artéria aorta torácica foi retirada (FERNANDES *et al.*, 2006; CARVALHO & LOPES, 2006) e transferida para uma placa de Petri contendo solução fisiológica a 37° C.

Os tecidos adiposos e conectivos adjacentes foram removidos cuidadosamente e a artéria foi seccionada em anéis de 3 - 4 mm de comprimento (ISOBE *et al.*, 2006), os quais foram transferidos para cubas de vidro com volume total de 5 mL de solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição (mM): NaCl 118; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 0,9; NaHCO₃ 25; glicose 11 (KIM *et al.*, 2007). Essa solução nutritiva foi mantida a 37° C, pH 7,4, aerada com uma mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂.

Duas hastas metálicas foram inseridas na luz dos anéis aórticos, sendo uma delas adaptada a um transdutor de tensão isométrica, acoplado a um sistema de aquisição de dados KitCad 8.0® (*Soft and Solutions*, SP/Brasil, 2001). Após o período de equilíbrio (60 min), os anéis de aorta foram contraídos com concentrações crescentes cumulativas do agonista α -adrenérgico fenilefrina (1 nM a 3 μ M). Em seguida, com uma contração submáxima (70 - 80 % da contração máxima) da aorta à fenilefrina, foi verificada a capacidade de relaxamento a partir de concentrações crescentes cumulativas de acetilcolina (1 nM a 3 μ M) – **Figura 5**.

Dos mesmos animais, após a retirada das artérias aorta torácica, coletaram-se os corações para a análise histológica da extensão das lesões ateroscleróticas em aortas ascendentes proximais.

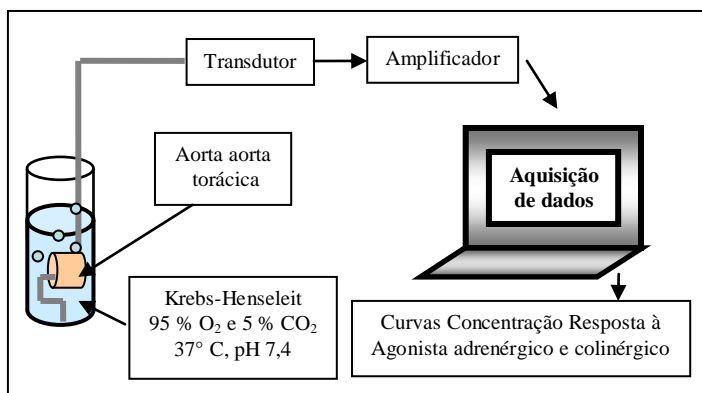


Figura 5: Desenho esquemático do ensaio de reatividade vascular.

6.4.7 Ensaio *in vivo* de histologia de aorta ascendente próxima de camundongos LDLr -/- KO

Após a retirada das aortas torácicas, os corações foram perfundidos através do ventrículo direito com salina tamponada (PBS), seguido de formalina 10 %. Após, foram removidos e fixados por 24 horas em formalina 10 % e, então, embebidos em gelatina 5, 10 e 25 %. O processamento histológico e coloração dos cortes foram realizados como descrito por Paigen e colaboradores (1987). Resumidamente, após a aplicação de *Tissue Freezing Medium* nos blocos de gelatina contendo os corações, estes foram cortados transversalmente em criostato a - 25° C com uma espessura de 20 µm cada corte, a partir do início da aorta, utilizando-se para a localização desta área a visualização microscópica das válvulas semilunares. Posteriormente, os cortes foram corados com *Oil Red* e contracorados com *Light Green* e Hematoxilina de Harris. As lesões na aorta ascendente proximal foram quantificadas utilizando-se o programa *ImageJ Launcher 1.4*® (*Broken Symmetry Software, USA, 2006*) (RUBIN *et al.*, 1991). As áreas de lesões são expressas como a somatória das lesões em 6 cortes de 20 µm de espessura, com 80 µm de distância entre eles, em uma área total de 480 µm (medidas expressas em área x 10³ µm²) – **Figura 6**.

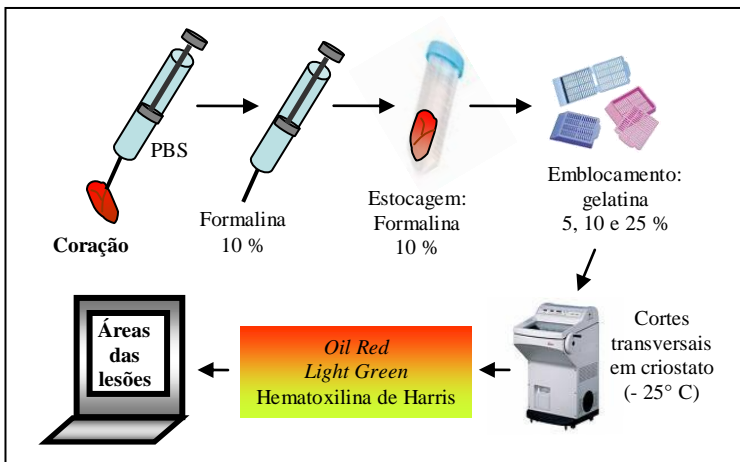


Figura 6: Esquema com as principais etapas do ensaio histológico.

6.4.8 Ensaio imunoenzimático (ELISA) de detecção da proteína quimiotática para monócitos 1 (*Monocyte Chemotactic Protein 1*, MCP-1) no plasma de camundongos LDLr *-/-* KO

A MCP-1 foi quantificada no plasma de 6 camundongos por grupo. Utilizaram-se os reagentes específicos do *kit* imunoenzimático (*R&D systems*, Minneapolis, MN, USA) de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, a microplaca (*Greiner*, Alemanha) para ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) foi incubada com anticorpo de captura *overnigh* à temperatura ambiente, foi lavada com *wash buffer* (tampão de lavagem) e o líquido removido completamente (esgotamento da placa). Adicionou-se 300 µL do reagente diluente a cada poço da placa e, após, incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Novamente a placa foi lavada com *wash buffer* e, em seguida, acrescentou-se 100 µL de cada amostra de plasma, ficando incubado por 2 horas à temperatura ambiente. Repetiu-se a lavagem da placa com *wash buffer* e, então, foi adicionado 100 µL do anticorpo anti-MCP-1 em cada poço. Depois de incubado por mais 2 horas à temperatura ambiente, novamente lavou-se a placa, adicionou-se solução de estreptavidina, após 20 min adicionou-se a solução substrato (tetrametilbenzidina, TMB) e a reação foi finalizada com 50 µL de H₂SO₄ 2 N. Imediatamente após a finalização da reação, a absorbância foi analisada em leitor de microplacas (Espectrofotômetro *TP- Reader*, *Thermo Plate*, China, 2007) a 450 nm, possibilitando a determinação da proteína com limite de detecção de 5 pg/mL.

6.4.9 Determinação de alanina aminotransferase (ALT) no plasma de camundongos LDLr *-/-* KO

Verificou-se os níveis de ALT no plasma de 6 animais por grupo, utilizando-se o *kit* Bioclin® (Belo Horizonte/MG, Brasil) com o método cinético automatizado do equipamento Cobas Mira Plus (Roche & Co., Basle, Switzerland) para as análises.

6.4.10 Análises estatísticas

Fez-se uso dos programas estatísticos *InStat 3.0* e *Prism 4.0 for Windows* (*GraphPad Software, Inc., San Diego, USA*, www.graphpad.com, 1998 e 2003, respectivamente). A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para os dados de peso dos animais, consumo de ração, valores de perfil lipídico, histologia das

lesões ateroscleróticas, MCP-1 e ALT, utilizou-se ANOVA seguida pelo *post-hoc* Tukey-Kramer. Nos dados referentes aos ensaios de reatividade vascular, utilizou-se ANOVA seguida pelo teste de Dunnett, para comparações com o grupo controle hipercolesterolêmico. Os valores das concentrações de fenilefrina (Phe) e acetilcolina (ACh) foram convertidos em logaritmos negativos para a melhor visualização dos resultados em curvas sigmóides. As diferenças entre os valores obtidos nos diferentes grupos que apresentaram valores de *P* menor que 0,05 foram consideradas estatisticamente significantes.

6.4.11 Procedimentos éticos da pesquisa

Os animais foram criados e mantidos na pesquisa de acordo com as recomendações do Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2003), sempre observando as condições que minimizassem o seu sofrimento e estresse.

Para tal, a manipulação dos camundongos foi feita somente por duas pessoas treinadas, de posse de jaleco branco, sem o uso de perfume. As gaiolas, assim como o biotério onde os animais permaneceram, foram higienizadas semanalmente com o uso de detergente neutro, sem o uso de produtos químicos de odor forte. O ambiente teve constante exaustão de ar, evitando-se o acúmulo de amônia, e o ar-condicionado foi higienizado frequentemente, a fim de não acumular partículas de poeira advindas da maravalha. Observou-se o mínimo possível de ruído no biotério e também durante a higienização de gaiolas e o tratamento dos camundongos.

A pesquisa utilizou ambos os sexos, uma vez que a progressão do processo aterosclerótico não sofre interferência do ciclo estral das fêmeas (TSUKAMOTO *et al.*, 1999; VELHO *et al.* 2006). Assim, foi necessário um número menor de ninhadas para obtenção de camundongos para o estudo.

Todos os procedimentos descritos foram submetidos, analisados e aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais em pesquisa (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o protocolo de número: PP00248, no ano de 2008.

7. RESULTADOS

7.1 Artigo científico:

“EXTRATO DE CHÁ VERDE PODE EVITAR O PROGRESSO DO PROCESSO ATEROSCLERÓTICO EM CAMUNDONGOS *KNOCKOUT* PARA RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE¹”

Jaqueline Minatti*², Elisabeth Wazlawik*, Mariana Appel Hort[#], Fernanda Longen Zaleski*, Rosa Maria Ribeiro-do-Valle[#], Edson Luiz da Silva⁺, Marcelo Maraschin[§].

Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Campus Universitário, Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC - Brasil.

*Centro de Ciências da Saúde, Depto Nutrição, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Lab. de Nutrição Clínica; [#] Centro de Ciências Biológicas, Depto Farmacologia, Lab. de Farmacologia de Produtos Naturais; ⁺ Centro de Ciências da Saúde, Depto Análises Clínicas, Lab. de Lipídeos, Radicais livres e Antioxidantes; [§] Centro de Ciências Agrárias, Depto Fitotecnica, Lab. de Morfogênese e Bioquímica Vegetal.

RESUMO: O chá verde é tradicionalmente preparado a partir das folhas maduras e secas da planta *Camellia sinensis*. Diversos estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais associam o consumo de chá verde à diminuição dos riscos de doenças crônico-degenerativas, dentre elas, as cardiovasculares (DCV). O estudo objetivou verificar a atividade do chá verde sobre o processo aterosclerótico utilizando-se camundongos C57BL6 (homozigotos com deficiência para receptores de lipoproteína de baixa densidade, LDLr -/- KO), que mimetizam lesões ateroscleróticas humanas. Os animais foram mantidos em dieta normal ou aterogênica (contendo 20% de lipídeos, 1,25% de colesterol, 0,5% de colina) e tratados com extrato de chá verde por via oral (50, 100 e 300 mg/kg) ou veículo, uma vez ao dia por 4 semanas. Resultados *in vivo* e *ex vivo* demonstraram que a dose 50 mg/kg provocou redução de aproximadamente 35% no tamanho das lesões, melhora da reatividade vascular em aorta torácica isolada, diminuição da proteína quimiotática para monócitos 1 (*Monocyte Chemotactic Protein 1*, MCP-1) no plasma, diminuição dos triglicerídeos no plasma e não interferiu no colesterol


total e nas lipoproteínas plasmáticas. O tratamento com o chá verde provocou menor ganho de peso e redução da ingestão de ração, não sendo verificado uma possível hepatotoxicidade nas doses estudadas. Concluiu-se que 50 mg/kg de chá verde diminuiu a progressão do processo aterosclerótico em camundongos LDLr *-/-* KO, propiciando efeitos favoráveis ao funcionamento endotelial.

Palavras-chave: *Camellia sinensis*. Aterosclerose. Camundongo LDLr *-/-* knockout.

ABSTRACT: Green tea is typically brewed from the mature and dried leaves of the plant *Camellia sinensis*. Epidemiological, clinical and experimental studies have associated green tea consumption with decreased risk of chronic degenerative diseases, including cardiovascular diseases. This study sought to evaluate the activity of green tea on atherosclerotic progression using C57BL/6J mice (homozygous lacking low density lipoprotein receptors, LDLr *-/-* KO), which exhibit the features observed in human atherosclerotic lesions. Animals were fed with a normal or an atherogenic diet (containing 20% lipids, 1.25% cholesterol, 0.5% choline) and were treated orally with green tea extract (50, 100 and 300 mg/kg), or vehicle, once a day for 4 weeks. *In vivo* and *ex vivo* results showed that green tea at 50 mg/kg decreased the lesion area by approximately 35%, improved the vascular reactivity in isolate thoracic aorta, reduced plasma monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and plasma triglycerides levels, but did not modify total cholesterol and plasma lipoproteins. Green tea treatment caused a decrease in body weight and reduced the chow consumption, although the dosages used possible induced no hepatic toxicity. We conclude that green tea at 50 mg/kg prevents the atherosclerotic process in LDLr *-/-* KO mice, promoting beneficial effects on endothelial function.

Key words: *Camellia sinensis*. Atherosclerosis. LDLr *-/-* KO mice.

¹ Não existem conflitos de interesse. Fonte de Financiamento: Programa de Pós-Graduação em Nutrição/UFSC - Programa de Fomento à Pós-Graduação (PROF)/ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) em 2008 e 2009.

²  (FAX+55 48 3721 9394) E-mail: wazlawik@ccs.ufsc.br, jaquelineminatti@yahoo.com.br

³ Abreviações utilizadas. ALT: alanina aminotransferase; C57BL6 ou LDLr *-/-* KO: linhagem de camundongos *knockout* (geneticamente modificados) para receptores de lipoproteínas de baixa densidade; EGCG: epigallocatequina galato; HDL: lipoproteína de alta densidade; IDL: lipoproteína de intermediária densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; MCP-1: proteína quimiotática para monócitos 1; NOSe: enzima óxido nítrico sintase endotelial; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade.

INTRODUÇÃO

O chá verde é tradicionalmente preparado a partir das folhas maduras e secas da planta *Camellia sinensis*, família *Ternstroemiaceae*, originária do sul da China e consumida há 5.000 anos (1,2). É uma bebida rica em polifenóis, principalmente em catequinas que correspondem a, aproximadamente, 70% do seu conteúdo de flavonóides (3).

A *C. sinensis* é a segunda bebida mais consumida em todo o mundo, só perdendo para a água (4-6). Diversos estudos epidemiológicos (7-10), clínicos e experimentais associam o chá verde à diminuição dos riscos de doenças crônico-degenerativas, dentre elas, as cardiovasculares (DCV) (1,5,11-15).

As DCV ocupam os primeiros lugares de causa de óbitos em todo o mundo, principalmente nos países ocidentais (15-17). Anualmente, mais de 12 milhões de pessoas morrem em decorrência de infartos; e as tendências, segundo a Organização Mundial de Saúde, apontam para a elevação dos casos (18). A causa primária das DCV é o avanço do processo aterosclerótico que leva a um quadro inflamatório crônico com disfunção endotelial, resultando em tromboembolismos, infarto agudo do miocárdio e cerebral (16,19-21). Desta forma, estudos que se prestem a desvendar mecanismos da progressão ou redução do processo aterosclerótico são de grande valia.

A dieta, por ser um meio de intervenção, é um campo amplo para estudos sobre a aterosclerose. Diversos deles mostram que o consumo de chá verde melhora a capacidade antioxidante (22-24), antiinflamatória (14,25), tem efeito antiplaquetário (antitrombogênico) (26) e antihipertensivo (vasodilatador) (7,8); sendo favorável ao funcionamento endotelial normal e contribuindo para a redução da progressão do processo aterosclerótico (7,27,28).

A presente pesquisa experimental objetiva verificar a capacidade do chá verde em reduzir a progressão da aterosclerose num modelo animal específico para o estudo desta patologia, frente a uma dieta aterogênica, utilizando-se a administração via oral em diferentes doses.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais. O extrato atomizado hidrossolúvel de *Camellia sinensis* (Sunphenon 30S® - *Standardized Green Tea Extract Powder*) foi proveniente da Taiyo *International Inc.* (China), mantido a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, protegido de umidade e luz direta. Apresentou certificação das quantidades mínimas de polifenóis (30%); do teor máximo de cafeína (8%), chumbo ($3,0 \mu\text{g/g}$) e arsênio ($2,0 \mu\text{g/g}$); e laudo atestando ausência de microrganismos. Substâncias obtidas da empresa Sigma (*Steinheim*, Alemanha ou *St. Louis*, EUA): Gelatina de pele suína tipo A, Salina Tamponada (*Phosphate Buffered Saline* – PBS), KCl, Acetilcolina, Fenilefrina. As substâncias: KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , NaCl, NaHCO_3 , provenientes da Vetec Química Fina Ltda. (Taboão da Serra/SP, Brasil). Formol e NaHCO_3 , adquiridos da Nuclear Ltda. (Diadema/SP, Brasil); hematoxilina e glicose, empresa Merck S.A (Rio de Janeiro/RJ, Brasil); os corantes *Oil red* e *Light Green*, empresa Amresco Inc. (*Solon*, EUA); o kit para detecção imunoenzimática (ELISA) da proteína quimiotática para monócito 1 (*Monocyte Chemotactic Protein 1*, CCL2/JE - MCP-1) adquirido da empresa R&D Systems, Inc. (*Minneapolis*, USA). Quetamina e xilazina foram adquiridos da Vetbrands Saúde Animal Ltda. (Paulínia/SP, Brasil). Os kits enzimáticos para análise de lipídeos sanguíneos, oriundos da Labtest Diagnóstica S.A (Lagoa Santa/MG, Brasil). Kit para detecção de alanina aminotransferase (ALT), Bioclin, obtido de Quibasa Química Básica Ltda. (Belo Horizonte/MG, Brasil).

Animais. Camundongos C57BL6 (homozigotos com deficiência para receptores de lipoproteína de baixa densidade, LDLr *-/-* KO) (29), originários do *Jackson Laboratories* (*Bar Harbor, Maine*), machos e fêmeas (30,31), adultos (12 semanas, $\sim 25 \text{ g}$), foram criados e alojados em gaiolas plásticas com maravalhas, a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12 horas, controlados automaticamente, e ambiente com exaustão de ar (32). Receberam ração normal para roedores (comercial, NUVILAB CR1®) ou ração hipercolesterolêmica (aterogênica, 20% de lipídeos, 1,25% de colesterol, 0,5% de colina), procedente da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (22,32); e água *ad libitum*.

Tratamentos. A administração dos tratamentos foi diária, via oral (gavagem), por 4 semanas. O volume dado foi proporcional ao peso de cada animal (aproximadamente $0,2 \text{ mL/dia}$) sendo corrigido semanalmente. Os animais controles receberam água destilada (veículo).

Grupos tratados receberam a solução de chá verde (extrato atomizado de *C. sinensis* reconstituído em água destilada à temperatura ambiente), preparada imediatamente antes do tratamento evitando-se a oxidação do produto. As doses foram: 50, 100 e 300 mg/kg, baseadas em protocolos semelhantes (22,33,34).

Análise cromatográfica de compostos fenólicos, metilxantinas e carotenóides do chá verde. Os compostos fenólicos e metilxantinas foram analisados em cromatógrafo Shimadzu LC-10A (Quioto, Japão), com coluna de fase reversa (C18 Shim-pack, 250 mm x 4,6 mm Ø, 5 µm) acoplada a pré-coluna (Shim-pack, 30 mm x 4,6 mm Ø, 5 µm). Para a determinação dos primeiros, alíquotas de 5 µL do extrato de chá verde foram injetadas à coluna termostatizadas a 40°C do HPLC, com detector UV-visível (Shimadzu SPD 10A, 280 nm). A fase móvel foi composta de água: ácido acético: *n*-butanol (350: 1: 10, v/v/v), fluxo de 0,8 mL/min. Os analitos foram identificados segundo o tempo de retenção e co-cromatografia de compostos padrões (Sigma-Aldrich, 10 µg/mL). Foram usadas as curvas-padrão externas de ácido gálico ($y = 9781x - r^2 = 0,99$) e galocatequina ($y = 795,09x - r^2 = 0,99$) (35).

Metilxantinas foram isoladas do extrato de chá verde pela incubação com 60 mL de diclorometano por 60 min. Alíquotas de 5 µL foram injetadas à coluna termostatizadas a 30°C do HPLC, com detecção a 272 nm. A fase móvel foi composta de acetonitrila: 0,1 % ácido fórmico (15: 85, v/v), fluxo de 1,0 mL/min. Foram identificadas segundo o tempo de retenção e co-cromatografia de compostos padrões (Sigma-Aldrich, 10 µg/mL). Foram usadas as curvas-padrão externas de cafeína ($y = 14502,02x; r^2 = 0,99$) e teofilina ($y = 34931,57x; r^2 = 0,99$) (35).

Na análise dos carotenóides no extrato de chá verde, alíquotas de 10 µL da amostra concentrada foram injetadas em cromatógrafo Shimadzu LC-10A (Quioto, Japão), equipado com coluna de fase reversa (C18 Vydac 218TP54, 250 mm x 4.6 mm Ø, 30°C) acoplada a uma pré-coluna (Vydac 218TP54, 30 mm x 4.6 mm Ø, 5 µm) e detector UV-visível (450 nm). Carotenóides foram identificados segundo o tempo de retenção e co-cromatografia de compostos padrões (10 µg/mL). A quantificação utilizou as curvas-padrão externas [0,5 - 45 µg/mL para luteína e zeaxantina ($r^2 = 0,99$) e 0,01 - 12 µg/mL para β-catoteno ($r^2 = 0,98$)] (36).

Os valores de compostos fenólicos, metilxantinas e carotenóides apresentados correspondem à média de 3 injeções por amostra, calculadas a partir das áreas dos picos de interesse (35,36).

Protocolo experimental. O experimento teve duração de 4 semanas. No tempo zero, os camundongos foram pesados e distribuídos de forma homogênea entre os grupos experimentais (**Tab. 1**). O peso foi aferido semanalmente em balança digital Marte - Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda. (AS2000C, n°série: 284449, capacidade 2.000 g/0,1 g, SP/Brasil, 2005). A ingestão alimentar também foi avaliada semanalmente, por meio da diferença entre o peso de ração oferecida menos o peso das sobras, dividido pelo número de animais (n) de cada grupo. Foram utilizados 12 camundongos por grupo experimental, 6 machos e 6 fêmeas. Este n considerou os diferentes métodos empregados para a análise da progressão aterosclerótica. Nas análises de lipídios sanguíneos foram coletadas amostras de sangue de todos os animais do experimento: 12 por grupo. Para as análises de reatividade vascular em aorta torácica e para a histologia da aorta ascendente proximal: 8 amostras de cada grupo. Para a detecção imunoenzimática da proteína MCP-1 no plasma: 6 amostras de cada grupo. Para as determinações da ALT no plasma: 6 amostras de cada grupo. Todos os procedimentos seguiram as recomendações do Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2003) (37). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais em pesquisa (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, protocolo n° PP00248, em 2008.

Tabela 1: Grupos experimentais, tipos de ração e tratamentos.

Grupos experimentais:	Ração	Tratamento via oral (V.O.)
Ração Normal (RN)	Normal	Veículo
Controle Hipercolesterolêmico (CH)	Hiperc.	Veículo
H 50	Hiperc.	Chá verde 50 mg/kg
H 100	Hiperc.	Chá verde 100 mg/kg
H 300	Hiperc.	Chá verde 300 mg/kg

Coleta de sangue e obtenção de plasma. Ao final da experimentação, e em jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina (38), 90 e 15 mg/kg respectivamente, por via

intra-peritoneal (I.P), para a coleta de sangue por via retro-orbital. O sangue foi coletado com capilares heparinizados, transferido para *ependorfs*, centrifugado a 3000 rpm por 15 min e armazenado a -18°C até o momento das análises.

Determinações bioquímicas de lipídeos. Colesterol total, lipoproteínas de alta densidade (HDL) e triglicérides foram determinados utilizando-se reagentes comerciais Labtest S.A.® (Lagoa Santa/MG, Brasil). Amostras obtidas de animais alimentados com ração hipercolesterolêmica foram diluídas em solução salina na proporção de 1:3 em função da sensibilidade dos reagentes. Todas as determinações foram feitas em duplicatas e, havendo diferença maior que 5%, a análise foi repetida. As frações LDL + IDL + VLDL foram obtidas indiretamente, por meio do cálculo da diferença entre colesterol total e a fração HDL, segundo Friedwald e colaboradores (1972) (39).

Ensaio ex vivo de reatividade vascular em aorta torácica isolada. Após a anestesia e coleta de sangue, 8 animais de cada grupo foram analisados quanto à reatividade vascular. A aorta torácica foi retirada e transferida para uma placa de Petri com solução fisiológica a 37°C (38). Tecidos adjacentes foram cuidadosamente removidos e a artéria foi seccionada em anéis de 3 - 4 mm de comprimento (40). Estes anéis foram transferidos para cubas de vidro com 5 mL de solução de Krebs-Henseleit (28), a 37°C, pH 7,4, aerada com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂. Duas hastas metálicas foram inseridas na luz dos anéis aórticos, sendo uma delas adaptada a um transdutor de tensão isométrica acoplado a um sistema de aquisição de dados KitCad 8.0® (*Soft and Solutions*, SP/Brasil, 2001). Após o período de equilíbrio (60 min), os anéis foram contraídos com concentrações crescentes cumulativas do agonista α -adrenérgico fenilefrina (1 nM a 3 μ M). Em seguida, com uma contração submáxima (70 - 80% da contração máxima) da aorta à fenilefrina, foi verificada a capacidade de relaxamento a partir de concentrações crescentes cumulativas de acetilcolina (1 nM a 3 μ M).

Ensaio in vivo de histologia da aorta ascendente proximal. Após a retirada das aortas torácicas, os corações foram perfundidos através do ventrículo direito com salina tamponada (PBS), seguido de formalina 10%. Em seguida, removidos e fixados por 24 horas em formalina 10% e embebidos em gelatina 5, 10 e 25%. O processamento histológico e coloração dos cortes foram realizados como descrito por Paigen e colaboradores (1987) (41). Resumidamente, após a aplicação de meio de

congelamento (*Tissue Freezing Médium*) nos blocos de gelatina contendo os corações, estes foram cortados transversalmente em criostato a -25°C com espessura de 20 μm cada corte, a partir do início da aorta, utilizando-se para a localização desta área a visualização microscópica das válvulas semilunares. Posteriormente, os cortes foram corados com *Oil Red* e contracorados com *Light Green* e Hematoxilina de Harris. As lesões ateroscleróticas foram quantificadas utilizando-se o programa *ImageJ Launcher 1.4*® (*Broken Symmetry Software*, USA, 2006) (42). Áreas de lesões foram expressas como a somatória das lesões em 6 cortes de 20 μm de espessura, com 80 μm de distância entre eles, em uma área total de 480 μm (medidas expressas em área $\times 10^3 \mu\text{m}^2$).

Ensaio imunoenzimático (ELISA) de detecção de proteína quimiotática para monócitos 1 (Monocyte Chemotactic Protein 1, MCP-1) no plasma. A MCP-1 foi quantificada no plasma de 6 camundongos por grupo. Utilizaram-se os reagentes específicos do kit imunoenzimático (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) de acordo com as especificações do fabricante; e o leitor de ELISA (Espectrofotômetro *TP- Reader*, Thermo Plate, China, 2007) para se obter a densidade óptica a 450 nm, possibilitando a determinação da proteína, com limite de detecção de 5 pg/mL.

Determinação de alanina aminotransferase (ALT) no plasma. Verificou-se os níveis de ALT no plasma de 6 animais por grupo utilizando-se o kit Bioclin® (Belo Horizonte/MG, Brasil) com o método cinético automatizado do equipamento Cobas Mira Plus (Roche & Co., Basle, Switzerland) para as análises.

Análises estatísticas. Fez-se uso dos programas estatísticos *InStat 3.0* e *Prism 4.0 for Windows* (*GraphPad Software, Inc., San Diego, USA*, www.graphpad.com, 1998 e 2003, respectivamente). A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para os dados de peso dos animais, consumo de ração, valores de perfil lipídico, histologia das lesões ateroscleróticas, MCP-1 e ALT utilizou-se ANOVA seguida pelo *post-hoc* Tukey-Kramer. Nos dados referentes aos ensaios de reatividade vascular, utilizou-se ANOVA seguida pelo teste de Dunnet, para comparações com o grupo controle hipercolesterolêmico. Os valores das concentrações de fenilefrina (Phe) e acetilcolina (ACh) foram convertidos em logaritmos negativos para a melhor visualização dos resultados em curvas sigmóides. As diferenças entre os valores

obtidos nos diferentes grupos que apresentaram valores de *P* menor que 0,05 foram consideradas estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Varição de peso e consumo das rações. Camundongos LDLr -/- KO tratados com ração hipercolesterolêmica e extrato de chá verde ganharam menos peso que os animais que receberam veículo (CH). A dose 300 mg/kg de chá verde provocou perda de peso após 4 semanas de tratamento. O chá verde também levou a um menor consumo de ração, evidenciado nas doses de 100 e 300 mg/kg (**Tab. 2**).

Tabela 2: Variação de peso e consumo de ração em camundongos LDLr -/- KO alimentados com ração normal ou ração hipercolesterolêmica, tratados por 4 semanas com o chá verde ou veículo¹.

Grupos ²	Varição de peso ³	Consumo de ração ⁴
RN	0,64 ± 0,24 **	23,93 ± 0,59 **
CH	2,50 ± 0,27	19,41 ± 0,70
H 50	0,81 ± 0,33 **	18,95 ± 0,29
H 100	0,39 ± 0,18 **	16,95 ± 0,46 *
H 300	-0,26 ± 0,22 **	15,68 ± 0,55 **

¹ Resultados expressos em média ± EPM (n = 12).

² **RN** = alimentados com ração normal; **CH** = controle com ração hipercolesterolêmica; **H 50** = ração hipercol. + chá verde 50 mg/kg; **H 100** = ração hipercol. + chá verde 100 mg/kg; **H 300** = ração hipercol. + chá verde 300 mg/kg.

³ Peso final (após 4 semanas de experimento) – inicial, (g).

⁴ Consumo médio de ração, por animal, por semana, (g).

* *P* < 0,05 e ** *P* < 0,001, comparados ao grupo **CH** (ANOVA seguido de Tukey-Kramer).

Composição do chá verde. O extrato de chá verde foi analisado por HPLC para quantificar seus compostos com potencial antioxidante (**Tab. 3**). Das catequinas analisadas, encontrou-se 2,16% e 1,85% da matéria seca, de epicatequinas e galocatequinas, respectivamente.

Tabela 3: Composição do extrato atomizado hidrossolúvel de chá verde analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC).

Compostos fenólicos	mg/g¹	Metilxantinas	mg/g¹
(-)-Epicatequina (EC)	21,57	Cafeína	3,51
(+)-Galocatequina (GC)	18,52	Teofilina	145,04
Ácido gálico	78,17	Teobromina	6,55
Ácido protocatecuico	31,87	Carotenóides	mg/g¹
Ácido clorogênico	215,46	Luteína	6,07
Ácido <i>p</i> -cumárico	12,47	Zeaxantina	traços
Ácido caféico (3,4 dihidroxicinâmico)	3,80		
Ácido ferúlico	0,39		
Ácido 4,5 dicafeoilquinico	0,84		

¹ Médias de análises em triplicata.

Lipídios plasmáticos. O chá verde nas doses estudadas foi capaz de reduzir significativamente as concentrações plasmáticas de triglicerídeos nos camundongos alimentados com dieta hipercolesterolêmica. O HDL-colesterol não foi modificado, já o colesterol total e as lipoproteínas não HDL-colesterol apresentaram elevação nos camundongos tratados com as maiores doses (100 e 300 mg/kg) de chá verde, quando comparados ao CH (**Tab. 4**). A menor dose (50 mg/kg) não alterou o colesterol total ou as lipoproteínas plasmáticas e reduziu os triglicerídeos.

Tabela 4: Perfil lipídico plasmático de camundongos LDLr ^{-/-} KO alimentados com ração normal ou ração hipercolesterolêmica, tratados por 4 semanas com o chá verde ou veículo¹.

Grupos ²	Colesterol (mg/dL)			Triglicerídeos (mg/dL)
	Total	HDL	VLDL + IDL + LDL	
RN	210,62±9,97**	65,46±5,74	145,17±6,17**	236,64±17,35**
CH	768,50±58,88	90,58±4,43	677,92±57,29	516,12±52,51
H 50	803,62±32,19	67,21±3,25	736,42±31,51	268,00±16,49**
H 100	1005,87±50,91**	80,29±6,70	925,58±51,10**	350,12±33,72*
H 300	1055,87±55,65**	66,50±5,53	989,37±54,71**	298,50±24,95**

¹ Resultados expressos em média ± EPM (n = 12).

² **RN** = alimentados com ração normal; **CH** = controle com ração hipercolesterolêmica; **H 50** = ração hipercol. + chá verde 50 mg/kg; **H 100** = ração hipercol. + chá verde 100 mg/kg; **H 300** = ração hipercol. + chá verde 300 mg/kg.

* $P < 0,05$ e ** $P < 0,001$, comparados ao grupo **CH** (ANOVA seguido de Tukey-Kramer).

Reatividade vascular ex vivo. O tratamento com o extrato de chá verde nas menores doses demonstrou a otimização do funcionamento vascular dos camundongos. Como apresentado (**Fig. 1**), a capacidade de contração dos anéis aórticos dos camundongos foi estatisticamente maior nos tratados com 50 e 100 mg/kg de chá verde, quando comparados ao **CH (A)**. As mesmas doses foram capazes de provocar um relaxamento estatisticamente maior nos anéis aórticos pré-contaídos com fenilefrina, quando comparados ao grupo **CH (B)**. O tratamento em maior dose de chá verde (300 mg/kg) não mostrou benefícios ao funcionamento vascular neste modelo. A função vascular normal pode ser verificada no grupo **RN**, tratado com ração normal para roedores e veículo.

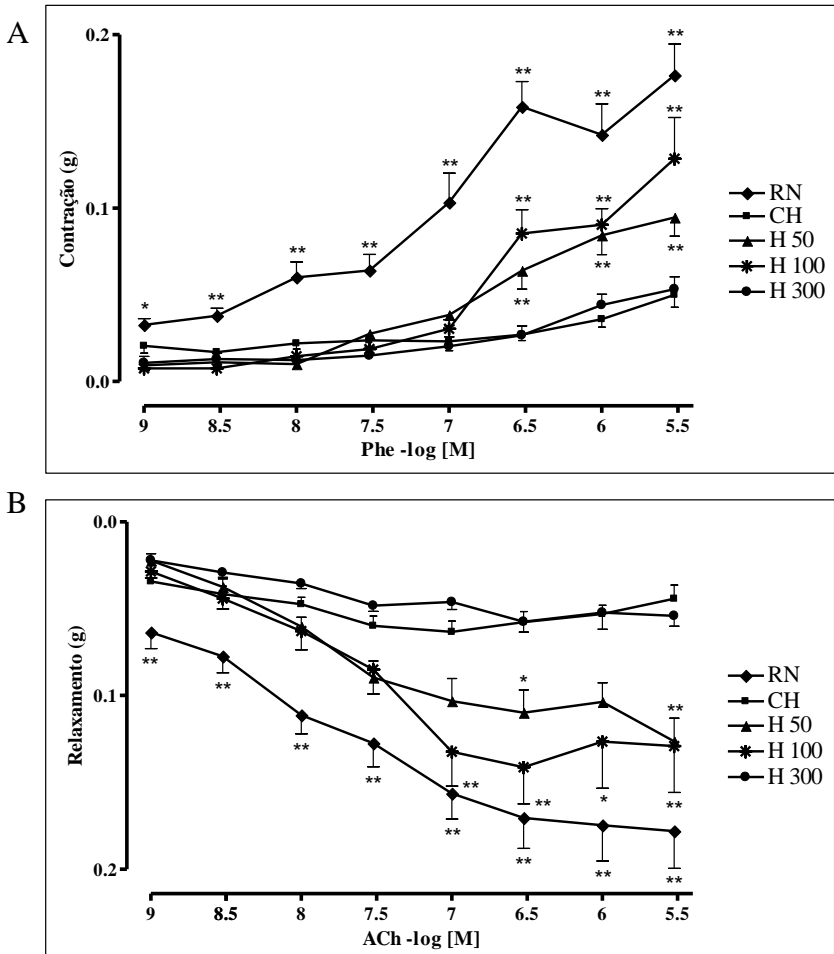
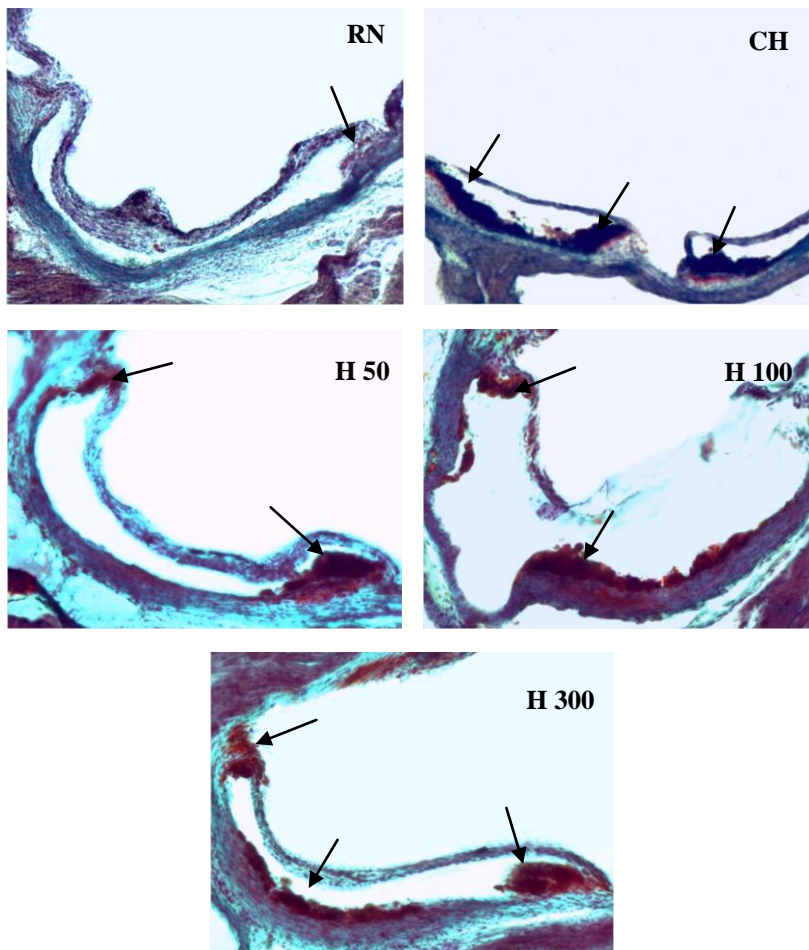


Figura 1: (A) Curvas concentração resposta cumulativas à fenilefrina (Phe, 1 nM - 3 μ M) em anéis de aorta torácica isolada, (B) Curvas concentração resposta cumulativas à acetilcolina (ACh, 1 nM - 3 μ M) em anéis de aorta torácica isolada pré-contraídos com Phe; de camundongos LDLr $-/-$ KO alimentados com ração normal ou ração hipercolesterolêmica, tratados por 4 semanas com o chá verde ou veículo. Grupos: **RN** = alimentados com ração normal; **CH** = controle com ração hipercolesterolêmica; **H 50** = ração hipercol. + chá verde 50 mg/kg; **H 100** = ração hipercol. + chá verde 100 mg/kg; **H 300** = ração hipercol. + chá verde 300 mg/kg. Cada ponto representa a média \pm EPM de 8-12 ensaios (n = 8 animais/grupo). ANOVA seguido de Dunnet, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ em relação ao CH.

Histologia de aorta ascendente proximal. A menor dose de chá verde estudada foi capaz de reduzir o tamanho das lesões ateroscleróticas em aproximadamente 35% quando comparada ao CH (**Fig. 2**). A diferença entre o grupo RN e o CH evidenciou a efetividade da ração aterogênica no desenvolvimento da aterosclerose no modelo animal em questão.

(A)



(B)

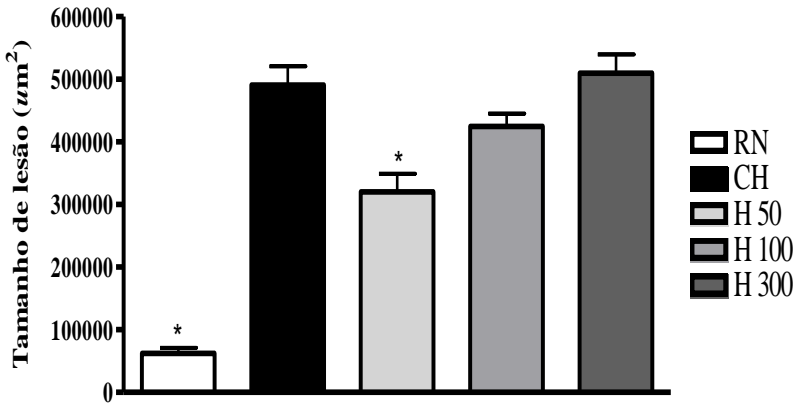


Figura 2: (A) Cortes histológicos representativos de aorta ascendente proximal indicando as lesões ateroscleróticas; (B) Extensão das lesões ateroscleróticas (μm^2) em camundongos LDLr $^{-/-}$ KO alimentados com ração normal ou ração hipercolesterolêmica, tratados por 4 semanas com o chá verde ou veículo. Grupos: **RN** = alimentados com ração normal; **CH** = controle com ração hipercolesterolêmica; **H 50** = ração hipercol. + chá verde 50 mg/kg; **H 100** = ração hipercol. + chá verde 100 mg/kg; **H 300** = ração hipercol. + chá verde 300 mg/kg. As barras representam a média \pm EPM de 6-8 animais. ANOVA seguido de Tukey-Kramer, * $P < 0,001$ em relação ao **CH**.

Monocyte Chemotactic Protein 1, MCP-1. A proteína quimiotática para monócito 1 mostrou-se reduzida com o tratamento de 50 mg/kg de chá verde, quando comparada ao CH (Fig. 3).

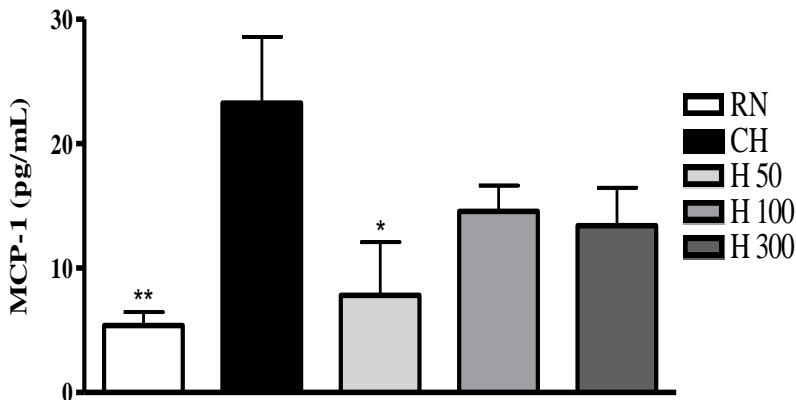


Figura 3: Determinação imunoenzimática (ELISA) de MCP-1 no plasma de camundongos LDLr $-/-$ KO alimentados com ração normal ou ração hipercolesterolêmica, tratados por 4 semanas com o chá verde ou veículo. Grupos: **RN** = alimentados com ração normal; **CH** = controle com ração hipercolesterolêmica; **H 50** = ração hipercol. + chá verde 50 mg/kg; **H 100** = ração hipercol. + chá verde 100 mg/kg; **H 300** = ração hipercol. + chá verde 300 mg/kg. As barras representam a média \pm EPM de 6 animais. ANOVA seguido de Tukey-Kramer, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ em relação ao CH.

Alanina aminotransferase. Não ocorreram alterações nos níveis plasmáticos de ALT entre os grupos experimentais (ANOVA, $P = 0,1984$), sendo as médias \pm EPM para os valores de ALT: **RN** = $9,17 \pm 2,01$; **CH** = $8,00 \pm 1,92$; **H 50** = $10,83 \pm 1,92$; **H 100** = $6,80 \pm 1,40$ e **H 300** = $4,50 \pm 0,96$

DISCUSSÃO

O presente estudo contribui com resultados *in vivo* e *ex vivo* do efeito do extrato de chá verde num modelo experimental de aterosclerose. O achado mais interessante é que o tratamento com o extrato de chá verde, nas menores doses estudadas, particularmente a de 50 mg/kg, melhorou a função endotelial, reduziu o tamanho das lesões ateroscleróticas em aproximadamente 35%, diminuiu a expressão de MCP-1 e os triglicerídeos plasmáticos em camundongos LDLr -/- KO submetidos a uma dieta aterogênica.

O chá verde melhorou a contração e o relaxamento nos anéis de aortas torácicas pré-contraídos com fenilefrina, demonstrando recuperar parte da função vascular prejudicada pela exposição à dieta hipercolesterolêmica (aterogênica). Até onde se sabe, o presente resultado sobre reatividade vascular foi um ensaio *ex vivo* pela primeira vez estudado em camundongos LDLr -/- KO, tratados com extrato de chá verde via oral por 4 semanas. Demais estudos, apesar de metodologicamente diferentes, corroboram estes resultados (7,11,15,43-47).

O efeito vasorelaxante endotélio-dependente das catequinas do chá verde foi primeiramente investigado por Huang e colaboradores, em artérias mesentéricas de ratos, *in vitro* (11,43). Em ensaios preliminares, também verificamos o relaxamento na presença de endotélio íntegro em anéis de artérias aortas torácicas de ratos *Wistar*, pré-contraídos com fenilefrina, nas concentrações de 300 µg/mL a 3000 µg/mL de extrato seco de chá verde (*resultado não apresentado*). Lorenz e colaboradores confirmaram essa evidência (44) e demonstram que a epigalocatequina-galato (EGCG) derivada do chá verde e do chá preto promoveu o relaxamento endotélio-dependente em anéis de aorta de ratos, por ativar a enzima chave na homeostase vascular, a óxido nítrico sintase endotelial (NOSe) (45). O vasorelaxamento via NO também foi observado em artérias mesentéricas de ratos, provocado por compostos fenólicos do vinho tinto brasileiro (46).

Além disso, em estudos *in vivo* e *ex vivo*, o chá verde e seus principais constituintes demonstraram efeitos benéficos ao sistema vascular em artérias mesentéricas de ratos hipertensos (7,47) e em aortas torácicas de ratos diabéticos (15). Em humanos, o chá verde e seus constituintes isolados promoveram a vasodilatação da artéria braquial, com efeito benéfico sobre o funcionamento endotelial (48,49).

As análises histológicas *in vivo* demonstraram que o tratamento com extrato de chá verde reduziu significativamente a progressão do

processo aterosclerótico, comprovado pela redução em 35% do tamanho das lesões ateroscleróticas em camundongos tratados com ração aterogênica e 50 mg/kg/dia de chá verde, por 4 semanas. Estes achados vão ao encontro dos resultados de Miura e colaboradores (2001): o extrato seco de chá verde diluído na água de bebedouro (0,8 g/L) por 14 semanas provocou a redução (23%) da área ateromatosa, diminuição do peso aórtico e da quantidade de lipídeos das placas ateroscleróticas dos camundongos deficientes em Apo-E (*Apolipoprotein E-null mice*) (22). Outro estudo, com camundongos Apo-E que receberam 10 mg/kg de EGCG, via intraperitoneal (I.P.), por 21 e 42 dias, mostrou redução do tamanho das lesões ateroscleróticas iniciais em 55% e 73%, respectivamente (13). Recentemente, um estudo utilizando ratos alimentados com dieta hipercolesterolêmica por 45 dias, tratados por 14 dias com EGCG (100 mg/kg) via I.P., demonstrou uma diminuição da espessura das artérias torácicas (25), sugerindo efeito benéfico sobre a progressão do processo aterosclerótico, convergente com o presente estudo.

Um dos eventos importantes na patogênese da aterosclerose é a presença de citocinas pró-inflamatórias que leva a adesão de monócitos no endotélio, seguido pela migração destes para a camada subendotelial. A proteína quimiotática para monócitos 1 (*Monocyte Chemotactic Protein 1*, MCP-1) é uma quimiocina que regula a infiltração de monócitos para a lesão aterosclerótica, contribuindo para os distúrbios inflamatórios, incluindo o desenvolvimento da aterosclerose e doenças cardiovasculares (DCV) (50,51). A dosagem de MCP-1 demonstrou redução estatisticamente significativa após o tratamento com o chá verde na dose 50 mg/kg. Outros estudos convergem com estes achados. Ahn e colaboradores (2008), em células endoteliais de coronárias bovinas, verificaram que a EGCG reduziu a produção de MCP-1 induzida pelo TNF- α (51). Hong e colaboradores (2007), em células endoteliais humanas (ECV304) mostraram que a EGCG apresentou um efeito antiinflamatório, reduzindo a expressão de MCP-1 (52). Bose e colaboradores (2008) utilizando camundongos LDLr -/- KO alimentados com ração hipercolesterolêmica acrescida de EGCG do chá verde por 16 semanas, verificaram a redução da MCP-1, associada à diminuição da resistência insulínica e da gordura visceral, verificando-se uma melhora da condição inflamatória (53). Além disso, com relação ao TNF- α , não foi detectável nos camundongos pelo método de ELISA (*resultado não apresentado*), similarmente ao estudo que utilizou a mesma espécie (53).

Outro ponto de interesse do estudo sobre a aterosclerose é o possível efeito hipolipidêmico do chá verde (5), podendo inibir da absorção de lipídios (53) e a síntese de colesterol (53,54). Analisou-se a influência do tratamento por 4 semanas com extrato de chá verde sobre o perfil lipídico dos camundongos LDLr -/- KO tratados com dieta aterogênica. A menor dose estudada, 50 mg/kg, influenciou beneficemente o perfil lipídico, uma vez que não alterou o colesterol total e lipoproteínas de alta e baixa densidade, enquanto que reduziu os triglicerídeos plasmáticos. As doses mais elevadas (100 e 300 mg/kg) somente contribuíram na diminuição dos triglicerídeos plasmáticos. Em humanos, foi verificado efeito semelhante: o chá verde reduziu os triglicerídeos, mas não demonstrou benefícios sobre o colesterol total, HDL e LDL-colesterol (48). Isbrucker e colaboradores (2006), num estudo em ratos e em beagles tratados com um preparado de chá verde (~ 90% de EGCG) por 13 semanas, não verificaram alterações no colesterol total, HDL e triglicerídeos entre os grupos tratados e controles (55). Outras pesquisas também não mostraram efeitos positivos sobre o colesterol total (22,13). Desta forma, apesar dos relatos indicando os benefícios do chá verde e seus constituintes sobre o perfil lipídico (56), são necessários mais estudos utilizando doses fisiológicas para um real entendimento da ação do chá verde, uma vez que há divergências a respeito (6).

O desenvolvimento do processo aterosclerótico nas DCV está associado a uma somatória de fatores, incluindo o estado antioxidante e a capacidade antiinflamatória, o perfil hiperlipidêmico, resistência insulínica e obesidade, que caracterizam um crescente distúrbio conhecido por “Síndrome Metabólica” (53). A perda de peso tem sido associada à redução dos riscos da “Síndrome Metabólica” (53) e das DCV (57), assim também como o consumo de chá verde e a diminuição do índice de massa corporal (IMC) e da massa adiposa (53,58). O chá verde levou a um menor ganho e até redução do peso dos animais, assim como provocou um menor consumo de ração nos tratados com as maiores doses de chá verde (100 e 300 mg/kg). A EGCG do chá verde levou à redução do peso corporal em ratos diabéticos (15). Em outro estudo utilizando camundongos LDLr -/- KO também houve redução do peso, principalmente do tecido adiposo visceral (53). Pesquisas futuras poderão elucidar se os resultados do presente trabalho são devido às catequinas ou a outros constituintes do chá verde.

Neste trabalho, houve menor ingestão de ração e perda de peso, sem alteração visualmente detectável nos fígados dos camundongos. A análise dos níveis de alanina aminotransferase (ALT) no plasma não

demonstrou diferença entre controles e tratados com o chá verde, sugerindo a possível não-hepatotoxicidade das doses estudadas. O tratamento por 16 semanas com a EGCG do chá verde foi capaz de reduzir estes níveis na mesma espécie animal utilizada (53), reforçando esta evidência. O chá verde nas maiores concentrações estudadas, particularmente a de 300 mg/kg, não apresentou benefícios à reatividade vascular, tamanho de lesão, MCP-1 e lipídios sanguíneos. Altas doses de chá verde e de seus constituintes isolados talvez possam apresentar alguma toxicidade por mecanismos pouco claros, como efeitos pró-oxidantes: elevação de marcadores de dano ao DNA, de espécies reativas de oxigênio, de marcadores de estresse oxidativo (59,60) e de toxicidade mitocondrial (61).

Frente aos resultados encontrados a respeito da ação do chá verde é necessária cautela à extrapolação das evidências de estudos experimentais em animais para os seres humanos, havendo critérios para a interpretação de resultados. As doses de chá verde estudadas (50, 100 e 300 mg/kg) correspondem a 1,4; 2,8 e 8,4 mg de catequinas respectivamente (22). Considerando que um adulto oriental consome, em média, 413 mg de catequinas por dia, fazendo-se a proporção pelo peso corporal (humano: 60 kg; camundongo: 25 g), um camundongo receberia 0,17 mg de catequinas/dia; o que corresponde a ~ 8 vezes, ~ 14 vezes e ~ 49 vezes mais que o consumo habitual de um oriental (22). Uma vez que camundongos possuem metabolismo mais acelerado e que a biodisponibilidade das catequinas em roedores é menor (6,7,25), a dose 50 mg/kg está mais próxima do consumo habitual em países orientais.

Concluindo, o trabalho usou um modelo animal para o estudo da aterosclerose que mimetiza os aspectos das lesões ateroscleróticas humanas (3,62), para verificar o efeito de doses menores e maiores de chá verde. A dose 50 mg/kg mostrou ser benéfica, podendo evitar a progressão do processo aterosclerótico em camundongos *knockout* para receptor de lipoproteína de baixa densidade. O mecanismo chave pelo qual o chá verde atua benéficamente sobre o desenvolvimento e progressão da aterosclerose ainda não está elucidado, mas se sabe que seus compostos podem atuar de diferentes formas e sinergicamente, propiciando efeitos favoráveis ao funcionamento endotelial. É interessante que outros estudos continuem buscando ampliar o conhecimento científico a respeito do chá verde, pois ao que tudo indica, pode ser utilizado como uma ferramenta dietética na prevenção da aterosclerose e doenças cardiovasculares associadas.

AGRADECIMENTOS

À Farmácia de manipulação Vital Farm Ltda., em especial à Larissa Frankenberger pela doação do extrato seco de chá verde. Autores J.M.; E.W.; R.M.R.V.N. e E.L.S., responsáveis pela concepção do estudo. J.M.; M.H.; F.Z. e M.M. conduziram os experimentos e analisaram os dados. J.M. e E.W. foram responsáveis pela escrita do conteúdo. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

LITERATURA CITADA

1. Hotta Y, Huang L, Muto T, Yajima M, Miyazeki K, Ishikawa N, Fukuzawa Y, Wakida Y, Tushima H, et al. Positive inotropic effect of purified green tea catechin derivative in guinea pig hearts: the measurements of cellular Ca²⁺ and nitric oxide release. *Eur J Pharmacol.* 2006;552:123-30. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.09.017. PubMed PMID: 17059816.
2. Fraser ML, Mok GS, Lee AH. Green tea and stroke prevention: emerging evidence. *Complement Ther Med.* 2007;15:46-53. doi: 10.1016/j.ctim.2006.07.002. PubMed PMID: 17352971.
3. Babu PV, Liu D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr Med Chem.* 2008;15:1840-50. PubMed PMID: 18691042.
4. Cheng TO. All teas are not created equal: the Chinese green tea and cardiovascular health. *Int J Cardiol.* 2006;108:301-8. doi: 10.1016/j.ijcard.2005.05.038. PubMed PMID: 15978686.
5. Yung LM, Leung FP, Wong WT, Tian XY, Yung LH, Chen ZY, Yao XQ, Huang Y. Tea polyphenols benefit vascular function. *Inflammopharmacology.* 2008;16:230-4. doi: 10.1007/s10787-008-8022-y. PubMed PMID: 18815738.
6. Moore RJ, Jackson KG, Minihane AM. Green tea (*Camellia sinensis*) catechins and vascular function. *Br J Nutr.* 2009;102:1790-802. doi: 10.1017/S0007114509991218. PubMed PMID: 19751534.
7. Antonello M, Montemurro D, Bolognesi M, Di Pascoli M, Piva A, Grego F, Sticchi D, Giuliani L, Garbisa S, Rossi GP. Prevention of hypertension, cardiovascular damage and endothelial dysfunction with green tea extracts. *Am J Hypertens.* 2007;20:1321-8. doi: j.amjhyper.2007.08.006. PubMed PMID: 18047924.
8. Jochmann N, Lorenz M, Krosigk A, Martus P, Böhm V, Baumann G, Stangl K, Stangl V. The efficacy of black tea in ameliorating endothelial function is equivalent to that of green tea. *Br J Nutr.* 2008;99:863-8. doi: 10.1017/S0007114507838992. PubMed PMID: 17916273.
9. Kuriyama S. The relation between green tea consumption and cardiovascular disease as evidenced by epidemiological studies. *J Nutr.* 2008;138:1548S-1553S. PubMed PMID: 18641205.

10. Grassi D, Aggio A, Onori L, Croce G, Tiberti S, Ferri C, Ferri L, Desideri G. Tea, flavonoids, and nitric oxide-mediated vascular reactivity. *J Nutr.* 2008;138:1554S-1560S. PubMed PMID: 18641206.
11. Huang Y, Zhang A, Lau CW, Chen ZY. Vasorelaxant effects of purified green tea epicatechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sci.* 1998;63:275-83. doi: 10.1016/S0024-3205(98)00273-2. PubMed PMID: 9698036.
12. Nakagawa T, Yokozawa T. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food Chem Toxicol.* 2002;40:1745-50. doi: 10.1016/S0278-6915(02)00169-2. PubMed PMID: 12419687.
13. Chyu KY, Babbidge SM, Zhao X, Dandillaya R, Rietveld AG, Yano J, Dimayuga P, Cercek B, Shah PK. Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation.* 2004;109:2448-53. doi: 10.1161/01.CIR.0000128034.70732.C2. PubMed PMID: 15136500.
14. Hou DX, Luo D, Tanigawa S, Hashimoto F, Uto T, Masuzaki S, Fujii M, Sakata Y. Prodelphinidin B-4 3'-O-gallate, a tea polyphenol, is involved in the inhibition of COX-2 and iNOS via the downregulation of TAK1-NF-kappaB pathway. *Biochem Pharmacol.* 2007;74:742-51. doi: 10.1016/j.bcp.2007.06.006. PubMed PMID: 17658484.
15. Roghani M, Baluchnejadmojarad T. Chronic epigallocatechin-gallate improves aortic reactivity of diabetic rats: underlying mechanisms. *Vascul Pharmacol.* 2009;51:84-9. doi: 10.1016/j.vph.2009.04.003. PubMed PMID: 19393342.
16. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420:868-74. doi: 10.1038/nature01323. PubMed PMID: 12490960.
17. Rahmani M, Cruz RP, Granville DJ, McManus BM. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. *Circ Res.* 2006;99:801-15. doi: 10.1161/01.RES.0000246086.93555.f3. PubMed PMID: 17038650.
18. Ivanov V, Roomi MW, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Anti-atherogenic effects of a mixture of ascorbic acid, lysine, proline, arginine, cysteine, and green tea phenolics in human aortic smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.*

- 2007;49:140-5. doi: 10.1097/FJC.0b013e3180308489. PubMed PMID: 17414225.
19. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-26. PubMed PMID: 9887164.
 20. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407:233-41. doi: 10.1038/35025203. PubMed PMID: 11001066.
 21. Libby P. The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Intern Med.* 2008;263:517-27. doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.01965.x. PubMed PMID: 18410595.
 22. Miura Y, Chiba T, Tomita I, Koizumi H, Miura S, Umegaki K, Hara Y, Ikeda M, Tomita T. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J Nutr.* 2001;131:27-32. PubMed PMID: 11208934.
 23. Erba D, Riso P, Bordoni A, Foti P, Biagi PL, Testolin G. Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. *J Nutr Biochem.* 2005;16:144-9. doi: 10.1016/j.jnutbio.2004.11.006. PubMed PMID: 15741048.
 24. Panza VS, Wazlawik E, Ricardo Schütz G, Comin L, Hecht KC, da Silva EL. Consumption of green tea favorably affects oxidative stress markers in weight-trained men. *Nutrition.* 2008;24:433-42. doi: 10.1016/j.nut.2008.01.009. PubMed PMID: 18337059.
 25. Ramesh E, Geraldine P, Thomas PA. Regulatory effect of epigallocatechin gallate on the expression of C-reactive protein and other inflammatory markers in an experimental model of atherosclerosis. *Chem Biol Interact.* 2010;183:125-32. doi: 10.1016/j.cbi.2009.09.013. PubMed PMID: 19782057.
 26. Son DJ, Cho MR, Jin YR, Kim SY, Park YH, Lee SH, Akiba S, Sato T, Yun YP. Antiplatelet effect of green tea catechins: a possible mechanism through arachidonic acid pathway. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2004;71:25-31. doi: 10.1016/j.plefa.2003.12.004. PubMed PMID: 15172681.
 27. Duffy SJ, Keaney JF Jr, Holbrook M, Gokec N, Swerdloff PL, Frei B, Vita JA. Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2001;104:151-6. PubMed PMID: 11447078.
 28. Kim JA, Formoso G, Li Y, Potenza MA, Marasciulo FL, Montagnani M, Quon MJ. Epigallocatechin gallate, a green tea

- polyphenol, mediates NO-dependent vasodilation using signaling pathways in vascular endothelium requiring reactive oxygen species and Fyn. *J Biol Chem.* 2007;282:13736-45. doi: 10.1074/jbc.M609725200. PubMed PMID: 17363366.
29. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest.* 1993;92:883-93. doi: 10.1172/JCI116663. PubMed PMID: 8349823.
 30. Tsukamoto K, Tangirala R, Chun SH, Puré E, Rader DJ. Rapid regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of ApoE in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2162-70. PubMed PMID: 10479659.
 31. Velho JA, Okanobo H, Degasperis GR, Matsumoto MY, Alberici LC, Cosso RG, Oliveira HC, Vercesi AE. Statins induce calcium-dependent mitochondrial permeability transition. *Toxicology.* 2006;219:124-32. doi: 10.1016/j.tox.2005.11.007. PubMed PMID: 16343726.
 32. Krieger MH, Santos KF, Shishido SM, Wanschel AC, Estrela HF, Santos L, De Oliveira MG, Franchini KG, Spadari-Bratfisch RC, Laurindo FR. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide.* 2006;14:12-20. doi: 10.1016/j.niox.2005.07.011. PubMed PMID: 16198610.
 33. Yamaguchi Y, Hayashi M, Yamazoe H, Kunitomo M. [Preventive effects of green tea extract on lipid abnormalities in serum, liver and aorta of mice fed a atherogenic diet]. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 1991;97:329-37. Japonês. PubMed PMID: 1874461.
 34. Babu PV, Sabitha KE, Shyamaladevi CS. Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. *Chem Biol Interact.* 2006;162:114-20. doi: 10.1016/j.cbi.2006.04.009. PubMed PMID: 16860299.
 35. Morais EC, Stefanuto A, Klein GA, Boaventura BC, de Andrade F, Wazlawik E, Di Pietro PF, Maraschin M, da Silva EL. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. *J Agric Food Chem.* 2009;57:8316-24. doi: 10.1021/jf901660g. PubMed PMID: 19694438.

36. Kuhnen S, Lemos PMM, Campestrini LH, Ogliari JB, Dias PF, Maraschin M. Antiangiogenic properties of carotenoids: A potential role of maize as functional food. *J Functional Foods*. 2009; 284-90. doi:10.1016/j.jff.2009.04.001.
37. COBEA-AAALAC.org.br [Internet]. Goiás: Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório: Manual sobre cuidado e usos de animais de laboratório. [acessado em 2003, Jun 27; citado em 2010, Jan 15]. Disponível em: <http://www.cobea.org.br>.
38. Carvalho THF, Lopes OU. [The use of genetic modified mice as a model to study cardiovascular diseases] Português. In: X Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular - Capítulo XI; Medicina, Ribeirão Preto, jan./mar. 2006; 39 (1): 110-116.
39. Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of concentrations of low density cholesterol in plasma without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem Baltimore*. 1972; p. 499-502.
40. Isobe S, Tsimikas S, Zhou J, Fujimoto S, Sarai M, Branks MJ, Fujimoto A, Hofstra L, Reutelingsperger CP, et al. Noninvasive imaging of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient and low-density-lipoprotein receptor-deficient mice with annexin A5. *J Nucl Med*. 2006;47:1497-505. PubMed PMID: 16954559.
41. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*. 1987;68:231-40. PubMed PMID: 3426656.
42. Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature*. 1991;353:265-7. doi: 10.1038/353265a0. PubMed PMID: 1910153.
43. Huang Y, Chan NW, Lau CW, Yao XQ, Chan FL, Chen ZY. Involvement of endothelium/nitric oxide in vasorelaxation induced by purified green tea (-) epicatechin. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1427:322-8. doi: 10.1016/S0304-4165(99)00034-3. PubMed PMID: 10216249.
44. Lorenz M, Wessler S, Follmann E, Michaelis W, Düsterhöft T, Baumann G, Stangl K, Stangl V. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J Biol Chem*.

- 2004;279:6190-5. doi: 10.1074/jbc.M309114200. PubMed PMID: 14645258.
45. Lorenz M, Urban J, Engelhardt U, Baumann G, Stangl K, Stangl V. Green and black tea are equally potent stimuli of NO production and vasodilation: new insights into tea ingredients involved. *Basic Res Cardiol.* 2009;104:100-10. doi: 10.1007/s00395-008-0759-3. PubMed PMID: 19101751.
 46. Schuldt EZ, Bet AC, Hort MA, Ianssen C, Maraschin M, Ckless K, Ribeiro-do-Valle RM. An ethyl acetate fraction obtained from a Southern Brazilian red wine relaxes rat mesenteric arterial bed through hyperpolarization and NO-cGMP pathway. *Vascul Pharmacol.* 2005;43:62-8. doi: 10.1016/j.vph.2005.04.002. PubMed PMID: 15935737.
 47. Potenza MA, Marasciulo FL, Tarquinio M, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Kim JA, Quon MJ, Montagnani M. EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292:E1378-87. doi: 10.1152/ajpendo.00698.2006. PubMed PMID: 17227956.
 48. Tinahones FJ, Rubio MA, Garrido-Sánchez L, Ruiz C, Gordillo E, Cabrerizo L, Cardona F. Green tea reduces LDL oxidability and improves vascular function. *J Am Coll Nutr.* 2008;27:209-13. PubMed PMID: 18689551.
 49. Alexopoulos N, Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Baou K, Vasiliadou C, Pietri P, Xaplanteris P, Stefanadi E, Stefanadis C. The acute effect of green tea consumption on endothelial function in healthy individuals. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2008;15:300-5. doi: 10.1097/HJR.0b013e3282f4832f. PubMed PMID: 18525384.
 50. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res.* 2004;95:858-66. doi: 10.1161/01.RES.0000146672.10582.17. PubMed PMID: 15514167.
 51. Ahn HY, Xu Y, Davidge ST. Epigallocatechin-3-O-gallate inhibits TNFalpha-induced monocyte chemotactic protein-1 production from vascular endothelial cells. *Life Sci.* 2008;82:964-8. doi: 10.1016/j.lfs.2008.02.018. PubMed PMID: 18397796.
 52. Hong MH, Kim MH, Chang HJ, Kim NH, Shin BA, Ahn BW, Jung YD. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits monocyte

- chemotactic protein-1 expression in endothelial cells via blocking NF-kappaB signaling. *Life Sci.* 2007;80:1957-65. doi: 10.1016/j.lfs.2007.02.024. PubMed PMID: 17379255.
53. Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, Yang CS. The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *J Nutr.* 2008;138:1677-83. PubMed PMID: 18716169.
 54. Koo SI, Noh SK. Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. *J Nutr Biochem.* 2007;18:179-83. doi: 10.1016/j.jnutbio.2006.12.005. PubMed PMID: 17296491.
 55. Bursill CA, Abbey M, Roach PD. A green tea extract lowers plasma cholesterol by inhibiting cholesterol synthesis and upregulating the LDL receptor in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis.* 2007;193:86-93. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.033. PubMed PMID: 16970948.
 56. Isbrucker RA, Edwards JA, Wolz E, Davidovich A, Bausch J. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: dermal, acute and short-term toxicity studies. *Food Chem Toxicol.* 2006;44:636-50. doi: 10.1016/j.fct.2005.11.003. PubMed PMID: 16387402.
 57. Lin JK, Lin-Shiau SY. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. *Mol Nutr Food Res.* 2006;50:211-7. doi: 10.1002/mnfr.200500138. PubMed PMID: 16404708.
 58. Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in Atherosclerosis. *Circ J.* 2010 Jan 9. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20065609.
 59. Nagao T, Hase T, Tokimitsu I. A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. *Obesity.* 2007;15:1473-83. doi: 10.1038/oby.2007.176. PubMed PMID: 17557985.
 60. Lambert JD, Sang S, Yang CS. Possible controversy over dietary polyphenols: benefits vs risks. *Chem Res Toxicol.* 2007;20:583-5. doi: 10.1021/tx7000515. PubMed PMID: 17362033.
 61. Elbling L, Weiss RM, Teufelhofer O, Uhl M, Knasmueller S, Schulte-Hermann R, Berger W, Micksche M. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert

- oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J.* 2005;19:807-9. doi: 10.1096/fj.04-2915fje. PubMed PMID: 15738004.
62. Galati G, Lin A, Sultan AM, O'Brien PJ. Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radic Biol Med.* 2006;40:570-80. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.014. PubMed PMID: 16458187.
63. Naito Y, Yoshikawa T. Green tea and heart health. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009;54:385-90. doi: 10.1097/FJC.0b013e3181b6e7a1. PubMed PMID: 19668087.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitos alimentos e bebidas de origem vegetal, como o chá, mate, vinho tinto, soja, entre outros, são empregados popularmente para tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares. A literatura científica relata importantes atividades biológicas dos compostos fenólicos na tentativa de se evitar a progressão do processo aterosclerótico, destacando-se as catequinas do chá verde.

No presente estudo, verificou-se o efeito de doses menores e maiores de chá verde num modelo animal. A menor dose, 50 mg/kg, mostrou ser benéfica, podendo diminuir a progressão do processo aterosclerótico em camundongos *knockout* para receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr *-/-* KO). O mecanismo chave pelo qual o chá verde atua benéficamente sobre o desenvolvimento e progressão da aterosclerose ainda não está elucidado, mas se sabe que seus compostos podem atuar de diferentes formas e sinergicamente, propiciando efeitos favoráveis ao funcionamento endotelial.

O uso de animais em pesquisa foi uma limitação evidente, pois requer critérios para a interpretação de resultados e extrapolação das evidências para os seres humanos. Em contrapartida, há a vantagem de se ter controle do ambiente e, principalmente, da dieta, o que é difícil e pode ser impreciso em estudos com humanos.

Para superar as dificuldades da pesquisa experimental em animais, o uso do modelo geneticamente modificado permitiu menores divergências do metabolismo e perfil lipídico quando comparado aos humanos. Isso porque estes animais desenvolvem hipercolesterolemia pelo aumento da LDL circulante, apresentando o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas de composição, localização e aspecto que mimetizam as lesões ateroscleróticas humanas, sendo conveniente o uso dos camundongos LDLr *-/-* KO no estudo da aterosclerose.

Nossos resultados foram favoráveis à continuidade das pesquisas com dosagens mais próximas àquelas consumidas pelos orientais. Salienta-se que, de forma divergente à concepção de “quanto mais melhor”, dosagens mais elevadas não foram as mais efetivas, ou seja, é preciso cautela com o consumo aleatório de chá verde, principalmente quando do uso de encapsulados em altas doses.

Reforça-se a importância dessa linha de pesquisa, contribuindo à elucidação do efeito de constituintes da dieta, em particular, do chá verde, sobre o processo aterosclerótico em estudos posteriores extensivos em humanos. Assim, é interessante a ampliação do conhecimento científico a respeito das ações do chá verde, pois, ao que

tudo indica, pode ser utilizado como uma ferramenta dietética na prevenção da aterosclerose e doenças cardiovasculares associadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, H.Y.; XU, Y.; DAVIDGE, S.T. Epigallocatechin-3-O-gallate inhibits TNF α -induced monocyte chemotactic protein-1 production from vascular endothelial cells. *Life Sci.* v. 82. p. 964-968. 2008.

ALEXOPOULOS, N.; *et al.* Xaplanteris P, Stefanadi E, Stefanadis C. The acute effect of green tea consumption on endothelial function in healthy individuals. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* v. 15 p. 300-305. 2008.

ANTONELLO, M. *et al.* Prevention of hypertension, cardiovascular damage and endothelial dysfunction with green tea extracts. *Am J Hypertens.* v. 20. p. 1321-1328. 2007.

ARAUJO, D.V.; FERRAZ, M.B. Impacto econômico do tratamento da cardiopatia isquêmica crônica no Brasil: o desafio da incorporação de novas tecnologias cardiovasculares. *Arq Bras Cardiol.* v. 85. p. 1-2. 2005.

BABU, P.V.; LIU, D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr Med Chem.* v. 15. p. 1840-1850. 2008.

BABU, P.V.A.; SABITHA, K.E.; SHYAMALADEVI, C.S. Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. *Chem-Biol Interat.* v. 162. p. 114-120. 2006.

BEHRENDT, D.; GANZ, P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol.* v. 90. p. 40L-48L. 2002.

BONOW, R.O. *et al.* World Heart Day 2002: the international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic. *Circulation.* v. 106. p. 1602-1605. 2002.

BOSE, M. *et al.* The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *J Nutr.* v.138. p.1677-83. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Indicadores de mortalidade por doenças circulatórias. 2001. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em: 29/10/2008.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann Review Biochem.* v. 52. p. 223-261. 1983.

BRUNNER, H. *et al.* Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens.* v. 23. p. 233-246. 2005.

BURSILL, C.A.; ABBEY, M.; ROACH, P.D. A green tea extract lowers plasma cholesterol by inhibiting cholesterol synthesis and upregulating the LDL receptor in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis.* v. 193. p. 86-93. 2007.

CARVALHO, T.H.F.; LOPES, O.U. O emprego de camundongo geneticamente modificado como modelo de estudo para doenças cardiovasculares. X Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular Cap. XI. *Medicina.* v. 39, n. 1. p. 110-116. 2006.

CHARO, I.F.; TAUBMAN, M.B. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res.* v. 95. p. 858-866. 2004.

CHEHAL, M.K.; GRANVILLE, D.J. Cytochrome p450 2C (CYP2C) in ischemic heart injury and vascular dysfunction. *Can J Physiol Pharmacol.* v. 84. p. 15-20. 2006.

CHENG, T.O. All teas are not created equal: the Chinese green tea and cardiovascular health. *Int J Cardiol.* v. 108, n. 3. p. 301-308. 2006.

CHYU, K.Y. *et al.* Differential Effects of Green Tea-Derived Catechin on Developing Versus Established Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Null Mice. *Circulation.* v. 109. p. 2448-2453. 2004.

CLEMENT, Y. Can green tea do that? A literature review of the clinical evidence. *Prev Med.* v. 49. p. 83-87. 2009.

COBEA / AAALAC. Manual sobre cuidado e usos de animais de laboratório. Goiás, 2003. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>>. Acesso em: 27/06/2008.

DAVIES, M.J. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis - The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation*. v. 94. p. 2013-2020. 1996.

DAVIES, M.J.; THOMAS, T. The pathological basis and microanatomy of occlusive thrombus formation in human coronary arteries. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. v. 294. p. 225-229. 1981.

DEANFIELD, J. *et al.* Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: A statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. v. 23. p. 7-17. 2005.

DIMMELER, S. *et al.* Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. v. 399. p. 601-605. 1999.

DROBNIK, J. *et al.* Response of aorta connective tissue matrix to injury caused by vasopressin - induced hypertension or hypercholesterolemia. *J Physiol Pharmacol*. v. 51. p. 521-533. 2000.

DUFFY, S.J. *et al.* Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*. v. 104. p. 151-156. 2001.

EGASHIRA, K.; *et al.* Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits vascular remodeling in rats: blockade of MCP-1 activity after intramuscular transfer of a mutant gene inhibits vascular remodeling induced by chronic blockade of NO synthesis. *FASEB J*. v. 14. p. 1974-1978. 2000.

ELBLING, L.; *et al.* Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J*. v. 19. p. 807-809. 2005.

ERBA, D.; *et al.* Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. *J Nutr Biochem.* v. 16. p. 144-149. 2005.

FAGGIOTTO, A.; ROSS, R. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis.* v. 4. p. 341-356. 1984 *apud* JAWIEN, J.; NASTALEK, P.; KORBUT, R. Mouse Models of Experimental Atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol.* v. 55, n. 3. p. 503-517. 2004.

FALK, E. Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi. *Br Heart J.* v. 50. p. 127-134. 1983.

FERNANDES, L.R. *et al.* Efeito da goma guar parcialmente hidrolisada no metabolismo de lipídeos e na aterogênese de camundongos. *Rev Nutr.* v. 19, n. 5. p. 563-571. 2006.

FIGUEROA, T.T.H.; RODRÍGUEZ, E.R.; MUNIZ, F.J.S. El té verde ¿una buena elección para la prevención de enfermedades cardiovasculares? *Arq Latinoam Nutr.* v. 54, n. 4. p. 380-394. 2004.

FRASER, M.L.; MOK, G.S.; LEE, A.H. Green tea and stroke prevention: Emerging evidence. *Com Therap Med.* v. 15. p. 46-53. 2007.

FRIEDWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of concentrations of low density cholesterol in plasma without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem Baltimore.* p. 499-502. 1972.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetate. *Nature.* v. 288, n. 5789. p. 373-376. 1980.

GALATI, G.; *et al.* Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radic Biol Med.* v. 40. p. 570-580. 2006.

GERRITY, R.G. The role of the monocyte in atherogenesis. I. Transition of blood - borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol.* v. 103. p. 181-190. 1981.

GIMBRONE, M.A.Jr.; BUCHANAN, M.R. Interactions of platelets and leukocytes with vascular endothelium: in vitro studies. *Ann NY Acad Sci.* v. 401. p. 171-183. 1982.

GLASS, C.K.; WITZTUM, J.L. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell.* v. 16. p. 104-503. 2001.

GOLDSTEIN, J.L. *et al.* Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci.* v. 76. p. 333-337. 1979.

GRAHAM, H.N. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med.* v. 21. p. 334-350. 1992.

GRASSI, D. *et al.* Tea, Flavonoids, and Nitric Oxide-Mediated Vascular Reactivity. *J Nutr.* v. 138. p. 1554S-1560S. 2008.

HANSSON, G.K. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med.* v. 352, n. 16. p. 1685-1695. 2005.

HELDT, H.W. Plant biochemistry and molecular biology. Oxford: Oxford University Press, p. 373. 1997.

HONG, M.H.; *et al.* (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits monocyte chemotactic protein-1 expression in endothelial cells via blocking NF-kappaB signaling. *Life Sci.* v. 80. p. 1957-1965. 2007.

HOTTA, Y. *et al.* Positive inotropic effect of purified green tea catechin derivative in guinea pig hearts: The measurements of cellular Ca²⁺ and nitric oxide release. *Europ J Pharmacol.* v. 552. p. 123-130. 2006.

HOU, D.X. *et al.* Prodelphinidin B-4 3-O-gallate, a tea polyphenol, is involved in the inhibition of COX-2 and iNOS via the downregulation of TAK1-NF-kB pathway. *Biochem Pharmacol.* v. 74. p. 742-775. 2007.

HUANG, Y.; *et al.* Involvement of endothelium/nitric oxide in vasorelaxation induced by purified green tea (-) epicatechin. *Biochim Biophys Acta.* v. 1427. p. 322-328. 1999.

HUANG, Y. *et al.* Vasorelaxant effects of purified green tea Epicatechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sciences*. v. 63, n. 4. p. 275-283. 1998.

HULLEY, S.B. *et al.* Delineando a pesquisa clínica: Uma abordagem epidemiológica. 2º ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

IGNATOWSKI, A. Wirkung de tierischen Nahrung auf den Kaninchenorganismus. *Ber Milit-med Akad.* v. 16. p. 154-176. 1908 *apud* TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiol Rev.* v. 86. p. 515-581. 2006.

IKEDA, I.; IMASATO, Y.; SASAKI, E. *et al.* Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim Biophys Acta.* v. 1127, n. 2. p. 141-146. 1992.

ISBRUCKER, R.A.; *et al.* Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: dermal, acute and short-term toxicity studies. *Food Chem Toxicol.* v. 44. p. 636-650. 2006.

ISHIBASHI, S. *et al.* Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus – mediated gene delivery. *J Clin Invest.* v. 92. p. 883-893. 1993.

ISHIBASHI, S. *et al.* Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest.* v. 93, n. 5. p. 1885-1893. 1994.

ISOBE, S. *et al.* Noninvasive Imaging of Atherosclerotic Lesions in Apolipoprotein E–Deficient and Low-Density-Lipoprotein Receptor–Deficient Mice with Annexin A5. *J Nucl Med.* v. 47. p. 1497-1505. 2006.

IVANOV, V.; *et al.* Anti-atherogenic effects of a mixture of ascorbic acid, lysine, proline, arginine, cysteine, and green tea phenolics in human aortic smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* v. 49. p. 140-145. 2007.

JAWIEN, J.; NASTALEK, P.; KORBUT, R. Mouse Models of Experimental Atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol.* v. 55, n. 3. p. 503-517. 2004.

JOCHMANN, N.; *et al.* The efficacy of black tea in ameliorating endothelial function is equivalent to that of green tea. *Br J Nutr.* v. 99. p. 863-868. 2008.

KADÁR, A.; GLASZ, T. Development of atherosclerosis and plaque biology. *Cardiovasc Surg.* v. 9, n. 2. p. 109-121. 2001.

KHAN, N.; MUKHTAR, H. Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences.* v. 81. p. 519-533. 2007.

KIM, J. *et al.* Epigallocatechin Gallate, a Green Tea Polyphenol, Mediates NO-dependent Vasodilation Using Signaling Pathways in Vascular Endothelium Requiring Reactive Oxygen Species and Fyn. *J Biol Chem.* v. 282, n. 18. p. 13736-13745. 2007.

KNOWLES, J.W.; MAEDA, N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* v. 20. p. 2336-2345. 2000.

KOO, S.I.; NOH, S.K. Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. *J Nutr Biochem.* v. 18. p. 179-183. 2007.

KRIEGER, M.H. *et al.* Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-Acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide.* v. 14, n. 1. p. 12-20. 2006.

KUHNEN, S. *et al.* Antiangiogenic properties of carotenoids: A potential role of maize as functional food. *J Functional Foods.* p. 284-90. 2009.

KUO, K.L. *et al.* Comparative Studies on the Hypolipidemic and Growth Suppressive Effects of Oolong, Black, Pu-erh, and Green Tea Leaves in Rats. *Agric Food Chem.* v. 53. p. 480-489. 2005.

KURIYAMA, S. The Relation between Green Tea Consumption and Cardiovascular Disease as Evidenced by Epidemiological Studies. *J Nutr.* v. 138. p. 1548S-1553S. 2008.

- LAMBERT, J.D.; SANG, S.; YANG, C.S. Possible controversy over dietary polyphenols: benefits vs risks. *Chem Res Toxicol.* v. 20. p. 583-585. 2007.
- LI, Q. *et al.* Quantitative Trait Locus Analysis of Carotid Atherosclerosis in an Intercross Between C57BL/6 and C3H Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Stroke.* v. 39. p. 166-173. 2008.
- LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* v. 420. p. 868-874. 2002.
- LIBBY, P. The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Intern Med.* v. 263. p. 517-527. 2008.
- LIBBY, P. *et al.* Inflammation in Atherosclerosis. *Circ J.* 2010 Jan 9. [Epub ahead of print].
- LIN, J.K.; LIN-SHIAU, S.Y. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. *Mol Nutr Food Res.* v. 50. p. 211-217. 2006.
- LIU, V.W.T.; HUANG, P.L. Cardiovascular roles of nitric oxide: A review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res.* v. 77. p. 19-29. 2008.
- LORENZ, M. *et al.* A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-oh-kinase-, camp-dependent protein kinase-, and akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J Biol Chem.* v. 279. p. 6190-6195. 2004.
- LORENZ, M. *et al.* Green and black tea are equally potent stimuli of NO production and vasodilation: new insights into tea ingredients involved. *Basic Res Cardiol.* v. 104. p.100-110. 2009.
- LUSIS, A.J. Atherosclerosis. *Nature.* v. 407. p. 233-41. 2000.
- MANN, G.E. *et al.* Activation of endothelial nitric oxide synthase by dietary isoflavones: Role of NO in Nrf2-mediated antioxidant gene expression. *Cardiovasc Res.* v. 75. p. 261-274. 2007.

MIURA, Y. *et al.* Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr.* v. 131. p. 27-32. 2001.

MOORE, R.J.; JACKSON, K.G.; MINIHANE, A.M. Green tea (*Camellia sinensis*) catechins and vascular function. *Br J Nutr.* v. 102. p. 1790-1802. 2009.

MORAIS, E.C. *et al.* Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. *J Agric Food Chem.* v. 57. p. 8316-24. 2009.

NAGAO, T.; HASE, T.; TOKIMITSU, I. A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. *Obesity.* v. 15. p. 1473-1483. 2007.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Green tea and heart health. *J Cardiovasc Pharmacol.* v. 54. p. 385-390. 2009.

NAKAGAWA, T.; YOKOZAWA, T. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food Chem Toxicol.* v. 40. p. 1745-1750. 2002.

NI, W.; *et al.* New anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation.* v. 103. p. 2096-2101. 2001.

NIJVELDT, R.J. *et al.* Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* v. 74, n. 4. p. 418-425. 2001.

PAIGEN, B. *et al.* Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis.* v. 68, n. 3. p. 231-240. 1987.

PANZA, V.S.; *et al.* Consumption of green tea favorably affects oxidative stress markers in weight-trained men. *Nutrition.* v. 24. p. 433-442. 2008.

PATEL, R.P. *et al.* Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* v. 47. p. 465-474. 2000.

POOLE, J.C.; FLOREY, H.W. Changes in the endothelium of the aorta and the behaviour of macrophages in experimental atheroma of rabbits. *J Pathol Bacteriol.* v. 75. p. 245-251. 1958 *apud* TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiol Rev.* v. 86. p. 515-581. 2006.

POTENZA, M.A.; *et al.* EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 292. p. E1378-1387. 2007.

RAHMANI, M. *et al.* Allograft Vasculopathy Versus Atherosclerosis. *Circ Res.* v. 99. p. 801-815. 2006.

RAMESH, E.; GERALDINE, P.; THOMAS, P.A. Regulatory effect of epigallocatechin gallate on the expression of C-reactive protein and other inflammatory markers in an experimental model of atherosclerosis. *Chem Biol Interact.* v. 183. p. 125-132. 2010.

RENAUD, S.; LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* v. 339. p. 1523-1526. 1992.

ROGHANI, M.; BALUCHNEJADMOJARAD, T. Chronic epigallocatechin-gallate improves aortic reactivity of diabetic rats: underlying mechanisms. *Vascul Pharmacol.* v. 51. p. 84-89. 2009.

ROSENFELD, M.E. *et al.* Fatty streak expansion and maturation in Watanabe heritable hyperlipidemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis.* v. 7. p. 24-34. 1987 *apud* JAWIEN, J.; NASTALEK, P.; KORBUS, R. Mouse Models of Experimental Atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol.* v. 55, n. 3. p. 503-517. 2004.

ROSS, R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med.* v. 340. p. 115-126. 1999.

RUBIN, E.M. *et al.* Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature.* v. 353, n. 6341. p. 265-267. 1991.

RUFFER, M. On arterial lesions found in Egyptian mummies (158 BC-AD 525). *J Pathol Bact.* v. 15. p. 453-462. 1911 *apud* TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiol Rev.* v. 86. p. 515-581. 2006.

SANDISON, A.T. Degenerative vascular disease in the Egyptian mummy. *Medical History.* v. 6. p. 77-81. 1962.

SCHULDT, E.Z.; *et al.* An ethyl acetate fraction obtained from a Southern Brazilian red wine relaxes rat mesenteric arterial bed through hyperpolarization and NO-cGMP pathway. *Vascul Pharmacol.* v. 43. p. 62-68. 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Supl. I. *Arq Bras Cardiol.* v. 88. 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Supl. IV. *Arq Bras Cardiol.* v. 82. 2004.

SON, D.J. *et al.* Antiplatelet effect of green tea catechins: a possible mechanism through arachidonic acid pathway. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* v. 71. p. 25-31. 2004.

STANGL, V. *et al.* Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* v. 73. p. 348-358. 2007.

STANGL, V.; LORENZ, M.; STANGL, K. The role of tea and tea flavonoids in cardiovascular health. *Mol Nutr Food Res.* v. 50. p. 1-11. 2006.

STOLL, G.; BENDSZUS, M. Inflammation and Atherosclerosis: Novel Insights Into Plaque Formation and Destabilization. *Stroke.* v. 37. p. 1923-1932. 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology.* 4 ed. 2006. Disponível em: <<http://4e.plantphys.net/>>. Acesso em: 27/01/2009.

- TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiol Rev.* v. 86. p. 515-581. 2006.
- THRIFT, A.G. *et al.* Risk factors for cerebral hemorrhage in the era of well-controlled hypertension. Melbourne Risk Factor Study (MERFS) Group. *Stroke.* v. 27. p. 2020-2025. 1996.
- TINAHONES, F.J.; *et al.* Green tea reduces LDL oxidability and improves vascular function. *J Am Coll Nutr.* v. 27. p. 209-213. 2008.
- TSUKAMOTO, K. *et al.* Rapid Regression of Atherosclerosis Induced by Liver-Directed Gene Transfer of ApoE in ApoE-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* v. 19. p. 2162-2170. 1999.
- VELHO, J.A. *et al.* Statins induce calcium-dependent mitochondrial permeability transition. *Toxicology.* v. 219. p. 124-132. 2006.
- YAMAGUCHI, Y. *et al.* Preventive effects of green tea extract on lipid abnormalities in serum, liver and aorta of mice fed a atherogenic diet. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* v. 97, n. 6. p. 329-337. 1991.
- YANG, T.T.C.; KOO, M.W.L. Inhibitory effect of Chinese green tea on endothelial cell-induced LDL oxidation. *Atherosclerosis.* v. 148. p. 67-73. 2000.
- YUNG, L.M.; *et al.* Tea polyphenols benefit vascular function. *Inflammopharmacology.* v. 16. p. 230-234. 2008.
- ZADELAAR, S. *et al.* Mouse Models for Atherosclerosis and Pharmaceutical Modifiers. *Artheroscler Thromb Vasc Biol.* v. 27. p. 1706-1721. 2007.
- ZHANG, S. H. *et al.* Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apoprotein E. *Science.* v. 258. p. 468-471. 1992.
- ZHENG, X.Y.; LIU, L. Remnant-like lipoprotein particles impair endothelial function: direct and indirect effects on nitric oxide synthase. *J lipid Res.* v. 48. p. 1673-1680. 2007.

ANEXO – Laudo técnico do chá verde

Sunphenon® 30S

Standardized Green Tea Extract Powder

Date: February 21, 2005

Page 1 of 1

Sunphenon 30S, obtained from the leaf of green tea (*Camellia sinensis*), is made of purified polyphenols rich in natural green tea catechins. These polyphenols act as natural antioxidants and antimicrobial agents.

Specifications

Appearance	Brown-yellow powder	Visual Observation
Total Polyphenols	Greater than 30%	Colorimetry
Total Catechins	Greater than 20%	HPLC
Caffeine	Less than 8.0%	HPLC
Loss on Drying	Less than 5.0%	105°C, 3 hours
Residue on Ignition	Less than 15.0%	550°C, 3 hours
Heavy Metals (as Pb)	Less than 20.0 µg/g	Colorimetry
Lead	Less than 3.0 µg/g	Atomic-photospectrometry
Arsenic (as As ₂ O ₃)	Less than 2.0 µg/g	Atomic-photospectrometry
Micro Biological Data:		
Standard plate count	Less than 1,000 cfu/g	Standard Plate Agar
Total <i>Coliforms</i>	Negative / 0.1g	BGLB method
<i>E. coli</i>	Negative / 0.1g	BGLB method
Mold / Yeast	Less than 100 cfu/g	Potato dextrose agar plate / Chloramphenicol
<i>Salmonella</i>	Negative	SMAFSRC 1 st Ed.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negative	SMAFSRC 1 st Ed.

Packaging and Storage

10 kg carton, double PE film bag.

In its original packaging, may be stored at room temperature at least 24 months from date of production. Store in a cool, dry place away from heat and direct light.



TAIYO INTERNATIONAL, INC.

5900 Golden Hills Drive, Minneapolis, MN 55416 USA 763-398-3003 Fax 763-398-3007

The information contained herein is, to the best of our knowledge, correct. It should not be construed as permission for violation of patent rights. The data outlined and the statements made are intended only as a source of information for your consideration and verification and not as a condition of sale. No warranties, expressed or implied are made. On the basis of this information, it is suggested that you evaluate the product on a laboratory scale prior to use in a finished product. Sunphenon® is a registered trademark of Taiyo Kagaku Co., Ltd. U.S. and International Patents Pending. © 2004 Taiyo International, Inc., Taiyo Kagaku Co., Ltd.