

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**EFEITO PROTETOR DO VINHO RUBY CABERNET EM UM MODELO DE
HIPERCOLESTEROLEMIA EM CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Etiára de Mattos Moraes

Uruguaiana, RS, Brasil.

2018

**EFEITO PROTETOR DO VINHO RUBY CABERNET EM UM MODELO DE
HIPERCOLESTEROLEMIA EM CAMUNDONGOS**

Por

Etiára de Mattos Moraes

Dissertação apresentada como exigência parcial para obtenção de **grau de Mestre em Bioquímica**, pelo programa de pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Cattelan Souza

Uruguaiana, RS, Brasil.

2018

M827e Moraes, Etiara de Mattos
Efeito Protetor do Vinho Ruby Cabernet em um Modelo de
Hipercolesterolemia em Camundongos / Etiara de Mattos Moraes.
83 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2018.

"Orientação: Cristiano Ricardo Jesse".

1. Vinho Tinto. 2. Dislipidemia. 3. Colesterol. 4.
Resveratrol. 5. Aterosclerose. I. Título.

Universidade Federal do Pampa
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado,

**EFEITO PROTETOR DO VINHO RUBY CABERNET EM UM MODELO DE
HIPERCOLESTEROLEMIA EM CAMUNDONGOS**

Por

Etiára de Mattos Moraes

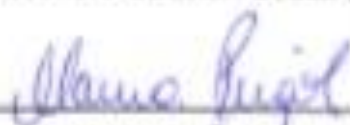
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse (Orientador)

Prof. Dr. Leandro Cattelan Souza (Presidente/Coorientador)



Prof. Dra. Marina Prigol (UNIPAMPA)



Prof. Dr. Carlos Borges Filho (UNIPAMPA)

Uruguaiana, RS, Brasil.

2018

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; Porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir”.

(Cora Coralina)

DEDICATÓRIA

Agradeço a Deus pela força, coragem e determinação em meus estudos, a minha mãe Jane Ribeiro de Mattos pelo apoio e o incentivo, ao meu filho Kauan Moraes Corrêa por ser meu apoio em momentos difíceis e de alegrias, meu Muito Obrigada pela paciência, amor e dedicação!

Agradeço a Dr^a. Silvana Peterini Boeira por ser a minha maior incentivadora e por acreditar na minha capacidade.

Agradeço ao meu orientador Dr. Cristiano Ricardo Jesse pelo apoio e incentivo e por acreditar no meu trabalho.

Ao meu coorientador Dr. Leandro Cattelan Souza pelos seus ensinamentos, paciência e ajuda para a realização desse trabalho.

Agradeço a Dr^a. Marina Prigol pela sua ajuda para a realização de defesa deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus professores da pós-graduação pelos ensinamentos e a Universidade Federal do Pampa pela oportunidade oferecida em realizar o mestrado.

Ao professor Dr. Cristiano Ricardo Jesse (diretor campus Itaqui) com seus ensinamentos, paciência e pelo incentivo na realização desse trabalho.

Ao LaftamBio Pampa e as minhas colegas que colaboraram para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

E agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para este estudo. Ao PPG Bioquímica e Unipampa pela oportunidade na realização deste trabalho, e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

PARTE I

Resumo	1
Abstract.....	3
Lista de Figuras.....	5
Lista de Tabelas	7
Lista de Abreviaturas.....	8
Introdução.....	11
Revisão Bibliográfica.....	13
Fisiopatologias das Dislipidemias primárias, Aterosclerose e Estresse oxidativo	13
Estresse Oxidativo	15
Mecanismos de Defesa Antioxidante	17
Camundongos com ausência do receptor para lipoproteínas de baixa densidade (LDLr)	19
Consumo moderado de vinho e sua composição.....	20
Objetivos.....	27

PARTE II

MANUSCRITO CIENTÍFICO

Protective effect of Ruby Cabernet wine in a model of hypercholesterolemia in mice.....	29
1.Introduction	31
2. Methods.....	33
2.1 Wine	33
2.2 Animals	33

2.3 Experimental Protocol	33
2.4. Antioxidant Capacity (<i>in vitro</i>)	34
2.4.1 Biochemical Parameters	34
2.4.2 Determination of Thiobarbituric acid (TBARS)	35
2.4.3 Determination of plasma protein carbonyls	35
2.4.4 Reactive Species (ROS) Levels	35
2.4.5 Reduced glutathione (GSH) levels	36
2.4.6 Catalase (CAT), Superoxide Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and Glutathione S-Transferase (GST) activities	36
2.4.7 Cytokine levels	38
3. Statistical analysis	38
4. Results	38
4.1 <i>In vitro</i> antioxidant activity assay	38
4.2 Effect of RCR wine on biochemical parameters of hypercholesterolemic mice	39
4.3 Malondialdehyde (MDA), Carbonylated protein (PC), Oxigen-reactive species (ROS) and Glutathione (GSH) levels	41
4.4 Antioxidant enzymes activities	42
4.5 Effect of RCR wine on markers of inflammation in the blood of hypercholesterolemic mice	43
5. Discussion	45
6. Conclusion	51
References	52
 PARTE III	
Conclusão	63
Perspectivas	64
Referências	65

PARTE I

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Universidade Federal do Pampa

EFEITO PROTETOR DO VINHO RUBY CABERNET EM UM MODELO DE HIPERCOLESTEROLEMIA EM CAMUNDONGOS

Autor: Etiára de Mattos Moraes

Orientador: Cristiano Ricardo Jesse

Coorientador: Leandro Cattelan Souza

Data e Local da Defesa: Itaqui, 11 de abril de 2018

O colesterol é um componente lipídico importante de todas as membranas celulares e da bainha de mielina, desempenhando um importante papel na integridade sináptica e atividade neural. O colesterol também atua como substrato para a síntese de ácidos biliares no fígado e precursor de hormônios esteroidais. No entanto, tem sido apontada uma ligação entre os níveis plasmáticos elevados de colesterol e o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial, que acomete a camada íntima de artérias de médio e grande calibres. A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular devido a diversos fatores de risco como dislipidemia, hipertensão arterial ou tabagismo. A uva, o vinho e produtos derivados da uva contém grande quantidade de compostos fenólicos que agem como antioxidantes. O consumo desses flavonoides está associado ao risco reduzido de eventos coronários, e a ingestão moderada de vinho tinto inibe a agregação plaquetária. O dano ao receptor de lipoproteína de baixa intensidade aumenta os níveis plasmáticos de LDL-C, resultando em deficiência na depuração do sangue desta lipoproteína. Em vista disso, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos protetores do vinho tinto Ruby Cabernet (RCR) produzido na cidade de Itaqui-RS contra a dislipidemia, estresse oxidativo e inflamação sistêmica em camundongos hipercolesterolêmicos. Foram utilizados camundongos C57BJ6 do tipo selvagem (90 dias de idade) e com deleção gênica

LDLr^{-/-} que foram tratados com o vinho RCR (dose diária de 400 µL por gavagem) durante 90 dias. Após o tratamento com o vinho RCR, os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado para ensaios bioquímicos. Os resultados do presente estudo demonstraram que o vinho RCR tem uma capacidade antioxidante significativa, como revelado por ensaios *in vitro*. Além disso, o vinho RCR atenuou os seguintes parâmetros bioquímicos alterados nos animais LDLR^{-/-}: níveis aumentados de colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de baixa densidade, lipoproteína de baixa densidade oxidada e níveis diminuídos de HDL no sangue. O vinho RCR também aliviou o estresse oxidativo no sangue dos animais LDLr^{-/-}, como revelado pela redução dos níveis de malondialdeído, proteína carbonilada, espécies reativas de oxigênio e aumento dos níveis de glutathione. Os animais LDLr^{-/-} exibiram um aumento acentuado nos níveis do fator nuclear Kappa-B e das citocinas inflamatórias IL-6, IL-1β e TNF-α, e uma redução da citocina anti-inflamatória IL-10. O vinho RCR atenuou essas alterações no plasma sanguíneo. Concluímos que o vinho RCR possui um importante potencial antioxidante *in vitro*. Além disso, o vinho RCR tem efeitos hipolipemiantes, antioxidantes e anti-inflamatórios em animais LDLr^{-/-}.

Palavras-chave: Vinho tinto, Dislipidemia, Colesterol, Resveratrol, Aterosclerose

ABSTRACT

Dissertation of Master
Program of Post-Graduation in Biochemistry
Federal University of Pampa

PROTECTIVE EFFECT OF RUBY CABERNET WINE IN A MODEL OF HYPERCHOLESTEROLEMIA IN MICE

Author: Etiára de Mattos Moraes

Advisor: Cristiano Ricardo Jesse

Co-advisor: Leandro Cattelan Souza

Date and Location of Defense: Itaqui, april 11, 2018

Cholesterol is an important lipid component of all cell membranes and the myelin sheath, playing an important role in synaptic integrity and neural activity. Cholesterol also acts as a substrate for the synthesis of bile acids in the liver and precursor of steroidal hormones. However, a link has been identified between elevated plasma cholesterol levels and the development of atherosclerotic lesions. Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of multifactorial origin, which affects the intimate layer of arteries of medium and large calibers. The formation of atherosclerotic plaques begins with aggression to the vascular endothelium due to several risk factors such as dyslipidemia, arterial hypertension or smoking. Grapes, wine and grape products contain large amounts of phenolic compounds that act as antioxidants. Consumption of these flavonoids is associated with reduced risk of coronary events, and moderate red wine intake inhibits platelet aggregation. Low-intensity lipoprotein receptor damage increases plasma LDL-C levels, resulting in deficiency in blood clearance of this lipoprotein. In view of this, the objective of the present study was to investigate the protective effects of Ruby Cabernet red wine (RCR) produced in the city of Itaqui-RS against dyslipidemia, oxidative stress and systemic inflammation in hypercholesterolemic mice. Wild type C57BJ6 mice (90 days old) with a deletion $LDLr^{-/-}$ mice that were treated with RCR wine (daily dose of 400 μ L per gavage) for 90 days. After treatment with the RCR wine, the animals were euthanized and blood was collected for biochemical assays. The results of the

present study demonstrated that RCR wine has a significant antioxidant capacity as revealed by *in vitro* assays. In addition, RCR wine attenuated the following altered biochemical parameters in LDLR animals^{-/-} increased levels of total cholesterol, triglycerides, low density lipoprotein, oxidized low density lipoprotein and decreased levels of HDL in the blood. RCR wine also alleviated the oxidative stress in the blood of LDLR^{-/-} animals, as revealed by the reduction of levels of malondialdehyde, carbonylated protein, reactive oxygen species and increased levels of glutathione. The LDLR^{-/-} animals exhibited a marked increase in nuclear Kappa-B factor and inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β and TNF- α , and a reduction of the anti-inflammatory cytokine IL-10. RCR wine attenuated these changes in blood plasma. We conclude that RCR wine has an important antioxidant potential *in vitro*. In addition, RCR wine has lipid-lowering, antioxidant and anti-inflammatory effects in LDLR^{-/-} animals.

Key words: Red wine, Dyslipidemia, Cholesterol, Resveratrol, Atherosclerosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de formação da aterogênese. Passagem dos leucócitos do sangue para o tecido conjuntivo, absorção de lípidos modificados LDL-oxidada e transformação em células espumosas	15
Figura 2. Espectro de algumas doenças que podem ser desencadeadas pelo excesso de espécies reativas de oxigênio	16
Figura 3. Sistema de defesa antioxidante enzimático	19
Figura 4. Esquema do mecanismo dos receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL) no fígado controlando a produção e o catabolismo de LDL. (A) pessoas normais, (B) pessoas com hipercolesterolemia familiar, (C) pessoas que consomem alimentos ricos em gorduras saturadas e colesterol. VLDL; lipoproteína de muito baixa densidade; IDL; lipoproteína de densidade intermediária; LP; lipase, lipase lipoproteíca; FFA; ácidos graxos livres	20
Figura 5. Ácidos hidroxinâmicos encontrados na uva	22
Figura 6. Estrutura do trans-resveratrol.....	23
Figura 7. Estrutura dos Flavonóis.....	24
Figura 8. Estrutura dos Flavonóis.....	24
Figura 9. Estrutura das Antocianinas.....	25

PARTE II

Figura 1. Procedimentos Experimentais..... 59

Figura 2. Efeitos do vinho RCR nos níveis de Malondialdeído (A), Proteína Carbonilada (B), Espécies Reativas do Oxigênio (C), Glutathiona Reduzida (D) em camundongos selvagens e LDLr^{-/-}..... 60

Figura 3. Efeitos do vinho RCR nas atividades de Glutathiona Reductase (A), Glutathiona Peroxidase (B), Glutathiona-s-transferase (C), Catalase (D), Superoxide Dismutase (E) em camundongos selvagens e LDLr^{-/-} 61

Figura 4. Efeitos do vinho RCR nos níveis de interleucina IL-1 β (A), Interleucina IL-6 (B), Fator de Necrose Tumoral Alfa (C), Interleucina IL-10 (D), Fator Nuclear Kappa-B (E) em camundongos selvagens LDLr^{-/-} 62

LISTA DE TABELAS

PARTE II

Tabela 1. Efeito do vinho no perfil plasmático de camundongos hipercolesterolêmicos LDLr ^{-/-}	58
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- HF-** Hipercolesterolemia Familiar
- LDL-** *Low Density Lipoprotein* = Lipoproteína de Baixa Densidade
- CT-** Colesterol Total
- TG-** Triglicerídeos
- HDL-** *High Density Lipoprotein* = Lipoproteína de Alta Densidade
- AI-** Índice Aterogênico
- AST-** Aspartato Aminotransferase
- ALT-** Alanina Aminotransferase
- LDLr^{-/-}-** Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade
- Apo E^{-/-}-** Apolipoproteína E
- MDA-** Malondialdeído
- PC-** Proteína Carbonilada
- ROS-** *Oxygen-reactive species* = Espécies Reativas de Oxigênio
- GSH-** Glutathiona Reduzida
- GPx-** Glutathiona Peroxidas
- GST-** Glutathiona-S-Transferase
- GR-** Glutathiona Reduzida
- G6PDH-** Glicose-6-Fosfato Desidrogenase
- CAT-** Catalase
- SOD-** Superóxido Dismutase
- HO.-** Hidroxila
- O₂.-** - Ânion Superóxido
- ROO.-** Radical Peroxila
- HO₂-** Hidroperoxila
- RO.-** Alcoxila
- LOO.-** Radical Peroxila
- LOOH-** Hidroperóxidos
- L.-** Radical Acil
- CuZn-** Superóxido Dismutase
- ECSOD-** Superóxido Dismutase Extracelular
- SH-** Tíol
- COX1 e COX 2-** Ciclo-oxigenases

RCR- *Ruby Cabernet wine*= Vinho Ruby Cabernet

IL-6- Interleucina 6

IL-1 β - Interleucina 1 Beta

TNF- α - *tumor necrosis factor-alpha* = Fator Necrose Tumoral alfa

IL-10- Interleucina 10

NF- κ B- Fator de Transcrição Kappa-B

DPPH- 2,2-difenil-picril-hidrazina

ABTS- 2,2-azino-bis-3 etilbenzotiazolin 6-ácido Sulfônico

ORAC- Capacidade de Absorbância do Radical Oxigênio

TRAP- Capacidade Antioxidante Total

TAR- Reatividade Antioxidante Total

NAFLD- *Non-alcoholic fatty liver disease* = Doença do Fígado Gorduroso não alcoólico

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi dividida em três partes principais. Na **parte I** encontram-se a **INTRODUÇÃO** e **OBJETIVOS**. Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra no item **MANUSCRITO**, **parte II** deste trabalho. As seções materiais e métodos, resultados, discussão dos resultados e referências bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo. O item **CONCLUSÃO**, encontra-se na **parte III** desta dissertação, apresentando as conclusões gerais sobre os resultados apresentados no manuscrito neste trabalho. O item **REFERÊNCIAS** refere-se somente às citações que aparecem nos itens introdução, discussão e conclusão desta dissertação. No item **PERSPECTIVAS**, estão expostos os possíveis estudos para dar continuidade a este trabalho.

1. INTRODUÇÃO

O colesterol é um componente lipídico importante de todas as membranas celulares da bainha de mielina, desempenhando um importante papel na integridade sináptica e atividade neural (PFRIEZER, 2003). O colesterol também atua como substrato para a síntese de ácidos biliares no fígado e precursor de hormônios esteroidais (LISCUM, 1995). No entanto, tem sido apontada uma ligação entre níveis plasmáticos elevados de colesterol e o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (OLIVEIRA et al., 2011). A hipercolesterolemia familiar (HF) é caracterizada por níveis elevados da fração do colesterol lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), sendo um fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose e suas complicações (OLIVEIRA et al., 2011). A aterosclerose é responsável por doenças cardiovasculares que são a principal causa de morte no mundo. Pessoas morrem anualmente por essas enfermidades do que por qualquer outra causa. Estima-se que 17,5 milhões de pessoas morreram por doenças cardiovasculares em 2012, representando 31% de todas as mortes em nível global (OMS, 2016). É reconhecido que defeitos no gene LDLr que codifica o receptor de LDL (LDLr) estão envolvidos na patogenia da HF. O dano ao receptor de LDL aumenta os níveis plasmáticos de LDL-C, resultando em deficiência na depuração do sangue desta lipoproteína (STEINBERG, 2002).

Portanto, o surgimento de camundongos geneticamente modificados, esclarecem muitos problemas relacionados ao estudo experimental da aterosclerose, é destacado, os camundongos LDLr^{-/-} são um modelo de hipercolesterolemia familiar humana (OHASHI, 2004). Esses animais apresentam hipercolesterolemia, mesmo quando submetidos a uma dieta padrão, podendo desenvolver lesões ateroscleróticas a longo prazo (ISHIBASHI et al., 1993). Esses animais apresentam uma deleção genética do receptor LDL (LDLr^{-/-}), fornecendo uma ferramenta prática para o estudo da hipercolesterolemia e suas consequências (OLIVEIRA et al., 2011).

O consumo de vinho começou há cerca de 7000 anos no Mediterrâneo, com sua evidência científica e benéfica em 1992, quando foi relatado pelo paradoxo francês. Desde então, esses benefícios para a saúde despertaram o interesse da comunidade científica (PENNA e HECKTHEUER, 2004). Em estudos realizados na França, foi observado que apesar do alto consumo de gorduras saturadas, há uma menor incidência de doenças cardiovasculares em

humanos, devido ao alto consumo de vinhos (SOUZA et al., 2006). O consumo de vinho tinto associado a uma dieta equilibrada pode reduzir as taxas de doenças coronárias em até 60% (RIBEIRO e MANFROI, 2010). O resveratrol é caracterizado como o composto fenólico mais importante do vinho, está presente na casca da uva e tem atividade biológica atuando como inibidor da agregação plaquetária e coagulação, também apresentando ação anti-inflamatória (SAUTTER et al., 2005). Resveratrol bloqueia o efeito prejudicial dos radicais livres e tem atividade antiplaquetária (SOARES FILHO et al., 2011). Outros componentes benéficos são os flavonóides que atuam como anticoagulante e agem como quimiopreventivo (SAUTTER et al., 2005).

De acordo com Baur e Sinclair (2006), o vinho tinto promove maiores efeitos protetores do que o consumo de outras bebidas alcoólicas. Os polifenóis presentes no vinho tinto podem agir diretamente contra as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em macrófagos de camundongos (CIZ et al., 2008). Em um estudo em que camundongos foram suplementados com resveratrol (50 mg / L por 21 dias), causa a inibição da NADPH oxidase e diminuição da produção de superóxido na aorta dos camundongos (SOYLEMEZ et al., 2009).

Além do álcool, o vinho tinto contém uma ampla gama de derivados de polifenóis com importantes atividades biológicas (SOALES et al., 1997), sendo responsável pela resposta anti-inflamatória sistêmica e diminuição potencial no desenvolvimento da aterosclerose (SIEMANN e CREASY, 1992). Em vista disso, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos protetores do vinho tinto Ruby Cabernet produzido na cidade de Itaqui-RS (Brasil) contra a dislipidemia, estresse oxidativo e inflamação sistêmica em camundongos LDLr^{-/-}.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fisiopatologias das Dislipidemias primárias, Aterosclerose e Estresse oxidativo

O acúmulo de quilomícrons ou VLDL no compartimento plasmático em hipercolesterolemia e decorre da diminuição da hidrólise dos triglicerídeos destas lipoproteínas pela LPL ou do aumento da síntese de VLDL (BRASIL, 2017). Variações genéticas das enzimas ou Apo relacionadas a estas lipoproteínas podem causar alterações metabólicas, aumento de síntese ou redução da hidrólise. A concentração de lipoproteínas ricas em colesterol, como a LDL no compartimento plasmático (BRASIL, 2017). Esse acúmulo é devido ao defeito no gene do LDLR já foram detectadas em pessoas portadoras de HF, algumas causam redução de sua expressão na membrana, outras deformações em sua estrutura e função. Mutações no gene que codifica a APOB pode também causar a hipercolesterolemia por conta da deficiência no acoplamento da LDL ao receptor celular (BRASIL, 2017). Com isso, podendo resultar na formação de placas de ateroma.

A palavra *aterosclerose* deriva do grego *atero*, que significa caldo ou pasta, *esclerose* refere-se ao endurecimento, sendo caracterizada por lesões na túnica íntima dos vasos, denominadas ateromas, placas ateromatosas ou fibrogordurosas, que invadem e obstruem o lúmen vascular e enfraquecem a túnica média subjacente (MARTELLI, 2014).

A aterosclerose é uma doença inflamatória de etiologia multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo a camada íntima das artérias de médio e grande calibres (ROSS, 1999). O início da formação da placa aterosclerótica desencadeia-se com a agressão ao endotélio vascular devido a diferentes fatores de risco como dislipidemia, hipertensão arterial ou tabagismo (BRASIL, 2013). A consequência dessa disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da túnica íntima às lipoproteínas derivadas do plasma, facilitando a retenção das LDL no espaço subendotelial (ROSS, 1999). As partículas retidas de LDL oxidam-se, ocasionando a exposição de diversos neoepitopos e tornando-se imunogênicas. O acúmulo de lipoproteínas na parede arterial é o processo-chave para o início da aterogênese, ocorrendo de maneira proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma. Além de aumentar

a permeabilidade das lipoproteínas, outra manifestação da disfunção endotelial é o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial, processo estimulado pela presença de LDL oxidada (LDL-ox) (MITRA et al., 2011).

As moléculas de adesão são responsáveis pela afinidade de monócitos e linfócitos para a camada íntima da parede arterial (BRASIL, 2013). Os leucócitos mononucleares, após entrarem na camada íntima por diapedese entre as junções intercelulares, iniciam a captação de lípidos modificados, principalmente o LDL-oxidado pelas espécies reativas de oxigênio (ROS), produzido pelo estresse oxidativo e transformam-se em células espumosas que originam as estrias gordurosas, as quais participam na formação das placas ateroscleróticas (Figura 1) (ROCHE e SÁNCHEZ, 2013).

As transições econômicas, a urbanização e a industrialização, trouxeram mudanças nos hábitos de vida das pessoas, com isso, aumentando a incidência de doenças cardiovasculares. Os fatores de risco, como o tabagismo, sedentarismo e alimentação pouco saudável, estão diretamente relacionados com essas mudanças (SCHERR e RIBEIRO, 2009). Atualmente a ingestão de uma dieta com pouca gordura, principalmente as saturadas, combinadas com exercícios físicos regulares é eficaz no controle do peso, redução dos níveis de colesterol e conseqüentemente uma melhora nas condições de vida das pessoas (SILVA e TORRES, 2015). Essas medidas de prevenção da aterosclerose são importantes para prevenir ou reduzir os níveis de colesterol, pois a aterosclerose é a principal causa de morte no mundo (OMS, 2016).

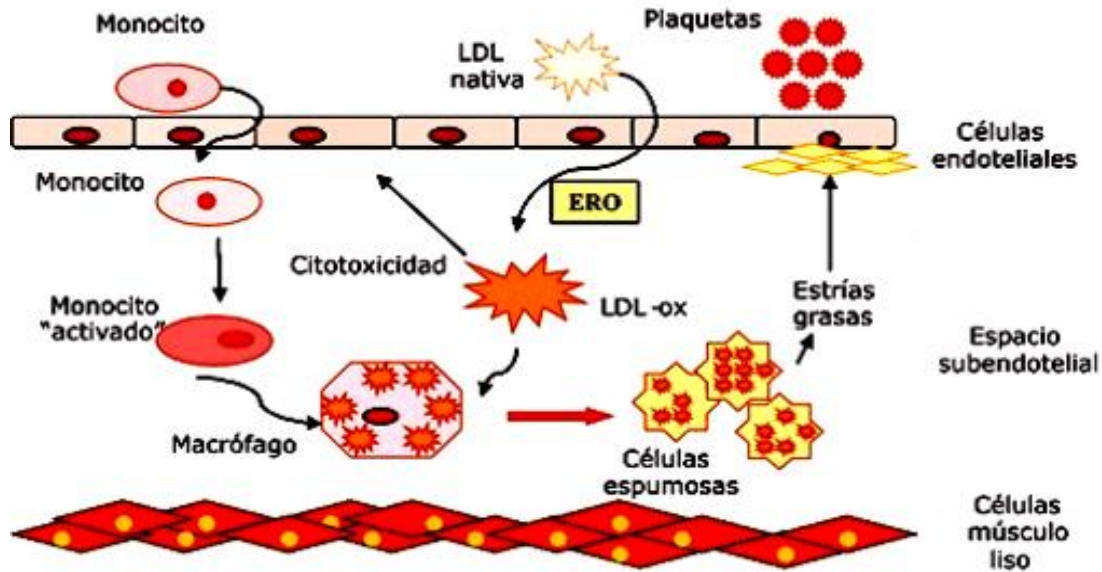


Figura 1. Processo de formação da aterosclerose. Passagem de os leucócitos do sangue para o tecido conjuntivo, absorção de lípidos modificados LDL-oxidada e transformação em células espumosas. Adaptado de ROCHE e SANCHEZ, 2013.

2.2 Estresse Oxidativo

O oxigênio é de suma importância para os organismos vivos, também podendo ser fonte de moléculas capazes de danificar tecidos biológicos essenciais. Espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio são constantemente geradas por meio da produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons microsossomal e mitocondrial. Existem fontes exógenas de formação de ROS que são representadas por tabagismo, poluição, exercício físico intenso, consumo excessivo de álcool e agrotóxicos (FRANKEL, 2005).

ROS são átomos, moléculas ou íons que contém um elétron não pareado em seu último orbital, apresentando grande instabilidade e elevada reatividade (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2000). Ligando-se ao elétron não pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação, comportam-se como receptores ou como doadores de elétrons. São exemplos de ROS hidroxila ($\text{HO}\cdot$), ânion superóxido (O_2^-), radical peroxila ($\text{ROO}\cdot$), hidroperoxila ($\text{HO}_2\cdot$) e alcóxila ($\text{RO}\cdot$) e os não radicalares: oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio (LAURINDO, 2005). Quando estão em grande quantidade, os radicais livres podem gerar alterações em moléculas de DNA, proteínas, carboidratos e lipídios. A oxidação das biomoléculas podem resultar em apoptose ou lesões de tecidos.

Existem evidências que essas alterações estão associadas ao desenvolvimento e evolução de patologias como doença de Alzheimer, artrite reumatoide, esclerose, cataratogênese, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (Figura 2) (KAUR et al., 2007; LEE e RENNAKER, 2010).

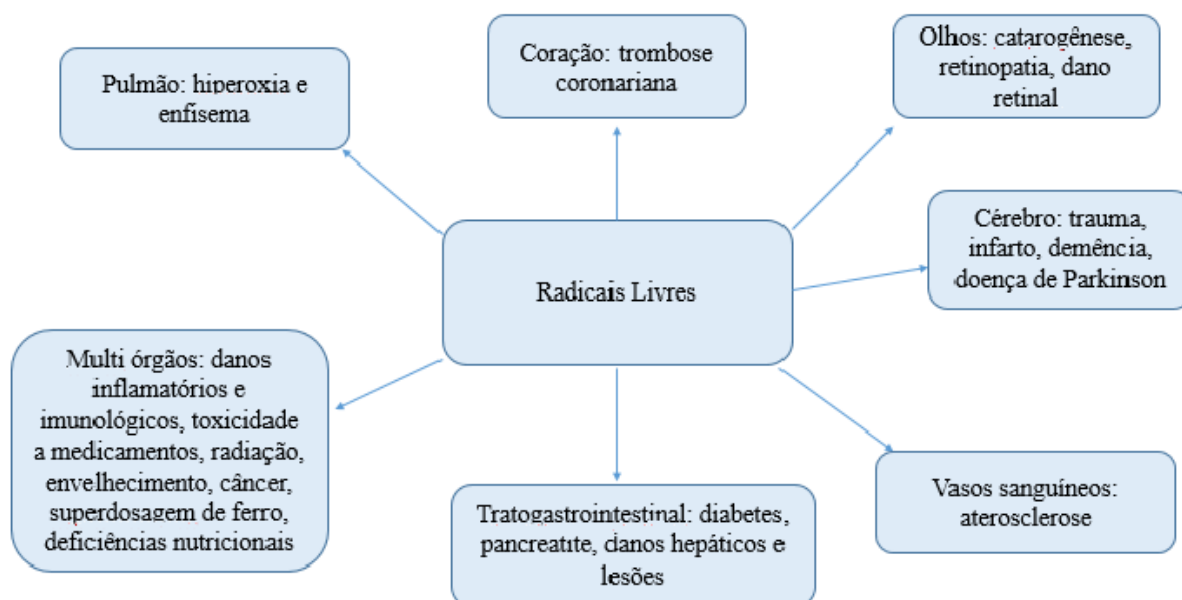


Figura 2. Espectro de algumas doenças que podem ser desencadeadas pelo excesso de espécies reativas de oxigênio. Adaptada de HALLIWELL, 1987 e HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000.

A oxidação lipídica pode ter início pelas ROS causando danos nos ácidos graxos poli-insaturados. Na iniciação, espécies reativas ou iniciadores ($In\cdot$) promovem a quebra homolítica da ligação hidrogênio-carbono na dupla ligação do ácido graxo, com a abstração de um hidrogênio alélico na extremidade carboxílica da cadeia, formando um radical acila ($L\cdot$) (MIYASHITA, 2008). O oxigênio reage diretamente com o radical acil ($L\cdot$), produzindo um radical peroxila ($LOO\cdot$), caracterizando-se a etapa de propagação da oxidação. Portanto, esses radicais reagem com as moléculas de lipídios formando os hidroperóxidos ($LOOH$) ou podendo ser neutralizados por antioxidantes, como o tocoferóis e os polifenóis. Também podem reagir com outros radicais lipídicos formando produtos não-radicalares, caracterizando a reação de terminação (FRANKEL, 2005). A lipoperoxidação é o processo induzido por radicais livres mais amplamente investigado em seus mecanismos, dinâmica e produtos da

lipoperoxidação. A presença de fosfolipídios na membrana em locais onde os radicais livres são formados, acaba por serem alvos endógenos acessíveis e rapidamente afetados pelos radicais livres (ZWART et al., 1999). Assim a lipoperoxidação favorece alterações na integridade, fluidez e permeabilidade das membranas, levando à perda de sua função (NIKI, 2009).

Os níveis de ROS aumentam devido a lipoperoxidação e outras reações químicas no organismo, ou quando os mecanismos antioxidantes não são acessíveis ou perdem a sua eficiência para tamponar o efeito de ROS, dessa forma ocorre o estresse oxidativo (LAURINDO, 2005). O estresse oxidativo modifica o balanço redox, causa dano nas moléculas biológicas e alterações da função celular ou até mesmo morte celular (GRANATO, 2011). A atividade de ROS na parede vascular pode contribuir com a formação da LDL oxidada, um importante fator para a patogênese da aterosclerose (FONSECA, 2012). De acordo com Madamanchi et al. (2005), as células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos são fontes de ROS que modificam fosfolipídeos e oxidam as LDL, além de estarem envolvidas na sinalização vascular para migração e proliferação celular durante a formação da lesão aterosclerótica.

2.3 Mecanismos de Defesa Antioxidante

Os antioxidantes são um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e, ainda, enzimas, que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres. O termo antioxidante significa que impede a oxidação de outras substâncias químicas, que ocorrem nas reações metabólicas ou por fatores exógenos, como as radiações ionizantes (ANVISA, 2008).

Os compostos enzimáticos são as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Redutase (GR), Glutathione-S-Transferase (GST), Glicose-6-fosfato-Desidrogenase (G6PDH) sendo estas enzimas endógenas (PAZZINI, 2012).

Os compostos não enzimáticos são constituídos por endógenos e exógenos. Os endógenos são: Ácido Úrico, Glutathione (GSH), Coenzima Q (PAZZINI, 2012).

E os exógenos são: α -tocoferol (Vitamina E), Vitamina C, β -caroteno, Flavonóides e Polifenóis são compostos exógenos (PAZZINI, 2012).

Os compostos enzimáticos SOD, CAT, GPx são a primeira linha de defesa endógena de neutralização de ROS. Através dessas enzimas as células tentam manter baixas as concentrações do $O_2^{\cdot-}$ e de H_2O_2 , assim impedindo a formação do HO^{\cdot} (PAZZINI, 2012).

A redução dos níveis de superóxido na célula é de responsabilidade da SOD, pois catalisa a dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 . Nos mamíferos são encontradas três principais isoformas da SOD. CuZn superóxido dismutase (CuZnSOD; SOD 1), Mn superóxido dismutase (MnSOD; SOD 2) e superóxido dismutase extracelular (ECSOD; SOD 3). Essas isoformas localizam-se em diferentes compartimentos celulares, sendo a SOD 1 encontrada no citoplasma e no espaço mitocondrial intermembranar, a SOD 2 na matriz mitocondrial e a SOD 3 nos fluídos e interstício extracelular (STYKAL et al., 2012).

A degradação de H_2O_2 é pela ação da CAT, que faz a catalise da decomposição de H_2O_2 (STYKAL et al., 2012). A GPx reduz H_2O_2 para formas menos tóxicas, como água e álcoois. Nessa redução a GPx utiliza um tripeptídeo de baixo peso molecular contendo um tiol (-SH) (GSH) como substrato. A glutationa oxidada (GSSG) é o resultado da reação catalisada pela GPx é reduzida a GSH pela enzima glutationa redutase (GR) que utiliza NADPH para catalisar a reação. A G6PDH é a enzima responsável pela reciclagem de NAP^+ a NADPH (Figura 3) (STYKAL et al., 2012). Os organismos desenvolvem sistemas de defesa antioxidantes para proteção, como também sistema de reparação, que previnem o acúmulo de moléculas alteradas por oxidação (VANNUCHI et al., 1998).

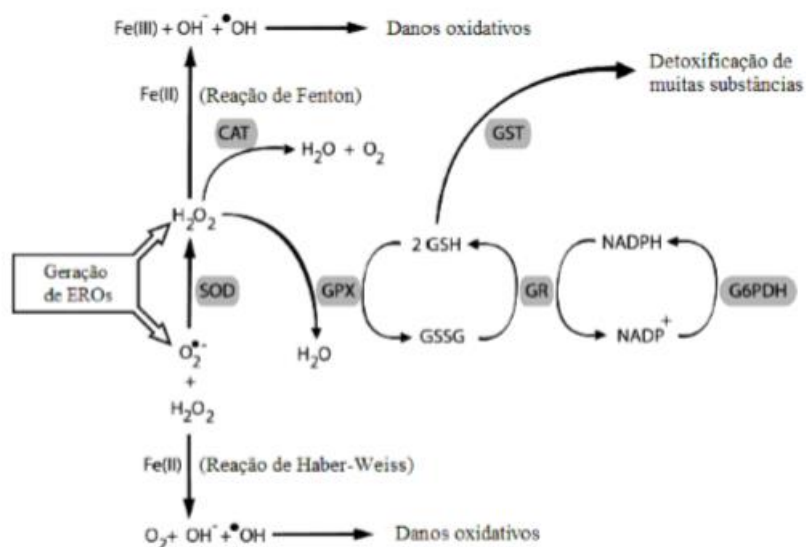


Figura 3. Sistema de defesa antioxidante enzimático. Fonte: MATTOS, 2009

2.4 Camundongos com ausência do receptor para lipoproteínas de baixa densidade (LDLr)

Os camundongos com deleção gênica de apolipoproteína E ($\text{apo E}^{-/-}$) ou do receptor de LDL ($\text{LDLr}^{-/-}$) tem sido muito empregados na atualidade, pois fornecem uma ferramenta prática para o estudo da hipercolesterolemia e suas consequências (OLIVEIRA, 2012). Os camundongos $\text{LDLr}^{-/-}$, foram desenvolvidos em 1993 por Ishibashi e colaboradores (1993), são um modelo de hipercolesterolemia familiar humana. Esses animais apresentam a hipercolesterolemia, identificada por níveis moderados de LDL-C, mesmo quando alimentados com uma dieta padrão, podendo desenvolver lesões ateroscleróticas a longo prazo. São animais predispostos, quando alimentados com dieta rica em colesterol, tornam-se hipercolesterolêmicos, com o desenvolvimento um acentuado processo de aterosclerose aórtica e xantomas subcutâneos (ISHIBASHI et al., 1993). Esses animais possuem características que trazem vantagens para a sua utilização como: (1) semelhança à condição humana de hipercolesterolemia familiar, devido a mutações no gene para o receptor LDL; (2) o perfil de lipoproteínas plasmáticas, assemelhando-se a de humanos, encontrando-se a maior parte do colesterol confinado na fração LDL; (3) na dislipidemia intermediária, desenvolvem lesões menores do que os camundongos $\text{apoE}^{-/-}$ (Figura 4) (ZADELAAR et al., 2007). Esses animais são

um modelo de estudo para estratégias nutricionais contra doenças cardiovasculares.

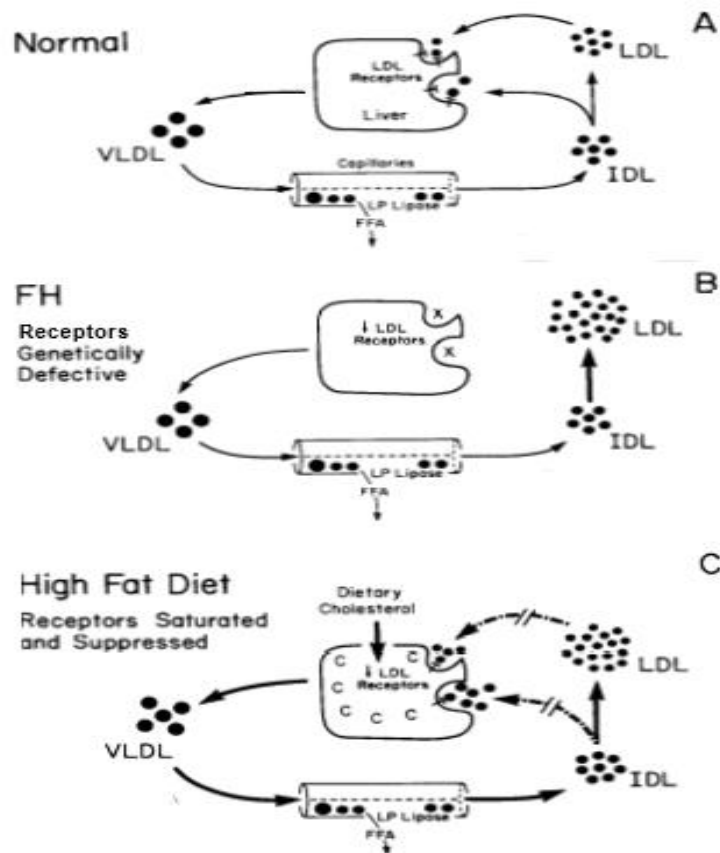


Figura 4. Esquema do mecanismo dos receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL) no fígado controlando a produção e o catabolismo de LDL. (A) pessoas normais, (B) pessoas com hipercolesterolemia familiar, (C) pessoas que consomem alimentos ricos em gorduras saturadas e colesterol. VLDL; lipoproteína de muito baixa densidade; IDL; lipoproteína de densidade intermediária; LP; lipase, lipase lipoproteica; FFA; ácidos graxos livres. (Adaptada BROWN e GOLDSTEIN, 1986).

2.5 Consumo moderado de vinho e sua composição

Nos dias atuais, a sociedade moderna tem buscado cada vez mais o consumo de alimentos que possam tratar ou prevenir doenças. Entre estes alimentos destacamos os alimentos funcionais, pois são ricos em compostos antioxidantes com comprovação benéfica à saúde, entre esses alimentos destaca-se o vinho tinto (MORAES e LOCATELLI, 2010).

O consumo de vinho teve início aproximadamente há 7000 anos no Mediterrâneo, com sua comprovação científica e benéfica à saúde, sendo

relatado pelo Paradoxo Francês em 1992. Desde então, esses benefícios à saúde vêm despertando o interesse da comunidade científica. Em estudos realizados na França observou-se que apesar do elevado consumo de gorduras saturadas, havia menor incidência de doenças cardiovasculares, devido ao consumo elevado de vinhos (SOUZA et al., 2006).

O vinho é uma bebida obtida exclusivamente a partir da fermentação alcoólica total ou parcial de uvas maduras e frescas ou de suco de uva fresco, pressionado ou não, também pode ser obtido a partir de mostos de uvas, o seu teor alcoólico deve ser pelo menos de 8,5 % do volume respectivamente (OIV, 2015). As substâncias que constituem o vinho são: açúcares, álcoois, ácidos orgânicos, sais de ácidos minerais e orgânicos, compostos fenólicos, pigmentos, substâncias nitrogenadas, pectinas, gomas e mucilagens, compostos voláteis e aromáticos (ésteres, aldeídos e cetonas), vitaminas e sais de anidrido sulfuroso (ALI et al., 2010).

O clima tem influência sobre a videira, importante para as potencialidades das regiões para a cultura. Interage com os componentes do meio natural, como o solo, técnica de cultivar da videira (MELO, 2003).

Durante o período de inverno a videira encontra-se em repouso vegetativo, quanto for menor a temperatura, melhor será a sua brotação. A videira é muito resistente a temperaturas baixas com mínimas de -10°C a -20°C (MELO, 2003). E na primavera ocorre a brotação e a floração das videiras. O período de floração da videira, as temperaturas iguais ou superiores a 18°C são favoráveis, principalmente quando associa-se a dias de insolação intensa e pouca umidade (MELO, 2003).

O verão é a estação que ocorre a maturação e colheita das uvas, A atividade fotossintética é na faixa de temperatura de 20°C a 15°C, as temperaturas superiores a 35°C são excessivas e resulta em uvas com maiores teores de açúcar e baixa acidez (MELO, 2003). A videira é uma planta que requer muita luz, insolação no período vegetativo, esse processo é muito importante para a fotossíntese e na sua composição química, com isso favorecendo a biossíntese de polifenóis. Dias ensolarados correlaciona-se com menor número de dias chuvosos (MELO, 2003).

O teor de açúcar da uva pode variar de 15 a 30%, devido a alguns fatores como a variedade, estágio de maturação e clima. Esses açúcares são

constituídos de D-glicose e D-frutose em proporções suscetíveis e iguais no momento da maturação. Contendo traços de sacarose, que na fermentação desaparecem (GÓES, 2005). O álcool, água e o glicerol são componentes importantes do vinho. O álcool e o glicerol tem proporção de 5 a 10 g/L são provenientes da fermentação alcoólica (ALI et al., 2010).

Os compostos fenólicos são de grande importância no vinho, conferem coloração, sabor, protegem a uva contra os fungos, bactérias, vírus e radiação solar (DAS et al., 2007). Os polifenóis são encontrados na casca, semente e polpa da uva (RIBEIRO e MANFROI, 2010), tem a propriedade de coagular as proteínas do vinho e intervêm na clarificação por colagem. O sabor dos vinhos tintos e brancos diferenciam-se devido a presença de compostos fenólicos, pois apresentam ação benéfica à saúde pelas propriedades antioxidantes, bactericidas e vitamínicas, auxiliando na prevenção de doenças cardiovasculares (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Os compostos fenólicos presentes em uvas e vinhos são separados em dois grandes grupos devido a semelhança de suas cadeias de átomos de carbonos: não-flavonóis e flavonoides. Os flavonoides mais comuns nos vinhos são (quercetina, caempferol e mircetina), flavan-3-óis (catequina, epicatequina e taninos) e as antocianinas. Os não-flavonóis são derivados de ácido cinâmico e benzoicos e outros fenólicos como estilbenos (resveratrol), encontrados na forma de ésteres de ácido tartárico (Figura 5) (FERNÁNDEZ-PACHÓN et al., 2006).

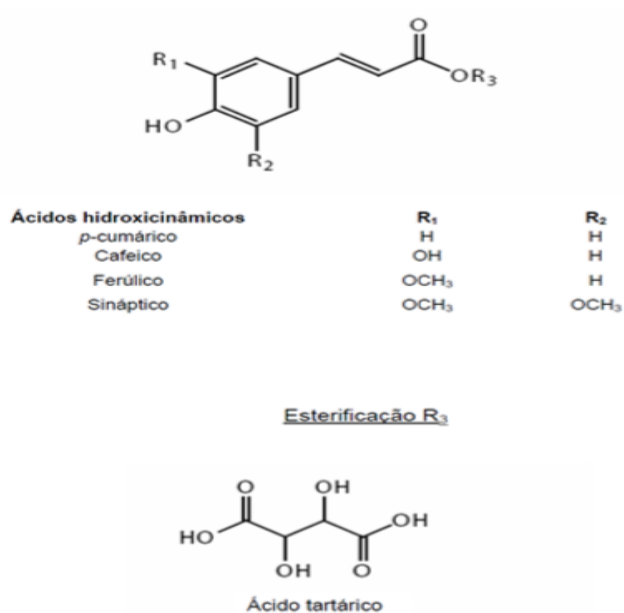


Figura 5. Ácidos hidroxinâmicos encontrados na uva. Fonte: ZOCCHÉ, 2009.

O resveratrol (Figura 6) é uma substância natural encontrada em diversas plantas, sendo a sua principal fonte as uvas e seus derivados. Essa substância é sintetizada na casca da uva em resposta ao estresse causado pelo ataque fúngico, dano mecânico ou pela irradiação ultravioleta (PAZZINI, 2012). As concentrações de resveratrol variam de acordo com a infecção fúngica, cultivo de uva, posição geográfica, clima, tipo de vinho e práticas enológicas (FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012). O resveratrol apresenta atividade biológica, agindo como inibidor da agregação plaquetária e coagulação, apresenta ação anti-inflamatória, regula o metabolismo lipoproteico e age como quimiopreventivo (SAUTTER et al., 2005). Em razão de sua capacidade de ativar mecanismos cardioprotetores, favorece o aumento na produção de HDL-Colesterol e proporciona uma redução na produção de LDL-Colesterol e também impede a oxidação do LDL-Colesterol circulante, outras atividades biológicas documentadas do resveratrol são sua atividade analgésica, devido à inibição das enzimas ciclo-oxigenases (COX¹ e COX²), tendo um efeito anti-envelhecimento, neuroprotetor e cardioprotetor (MUKHERJEE et al., 2010).

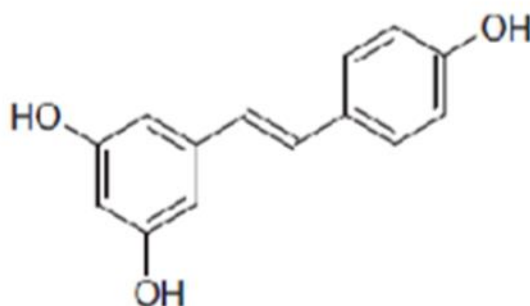


Figura 6. Estrutura do trans-resveratrol. Fonte: ZOCCHÉ, 2009

Os flavonóis fazem parte de uma das maiores subclasses de flavonoides. Estão presentes na casca da uva na forma de monoglicosídeos com um resíduo de açúcar ligado ao radical hidroxila. Compõem essa subclasse a quercetina, miricetina e o caempferol, possuem atividade antioxidante e anti-histamínica (Figura 7) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003; STECHER et al., 2001).

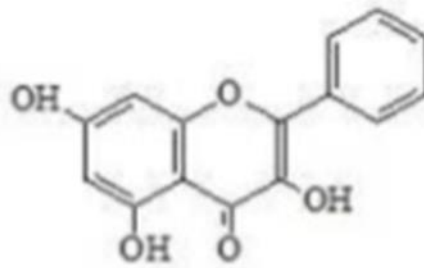


Figura 7. Estrutura dos Flavonóis. Fonte: SCALBERT e WILLIAMSON, 2000.

Os flavan-3-óis diferenciam-se por possuírem um anel heterocíclico saturado. A (+) catequina e a (-) epicatequina são os principais flavan-3-óis encontrados no vinho. Esses compostos são responsáveis pela adstringência, amargor e corpo dos vinhos (Figura 8) (KENNEDY et al., 2006).

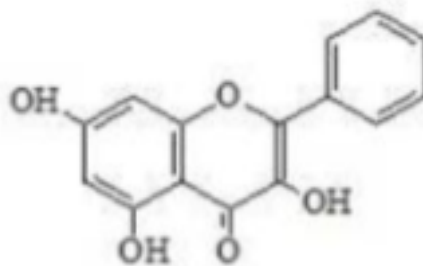


Figura 8. Estrutura dos Flavonóis. Fonte: SCALBERT e WILLIAMSON, 2000

As antocianinas são os pigmentos responsáveis pela cor das uvas, encontrando-se na casca. Presentes nas folhas e no final do ciclo vegetativo (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003). As principais antocianinas encontradas nas uvas são: malvidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo, o teor da pigmentação depende da variedade da uva, condições climáticas e agrícolas (Figura 9) (KELEBEK et al., 2006). Se tem um grande interesse nutricional nas antocianinas devido a seu potencial antioxidante, antineoplásica, anti-

inflamatória, antiviral e antibacteriana (PEDRESCHI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007).

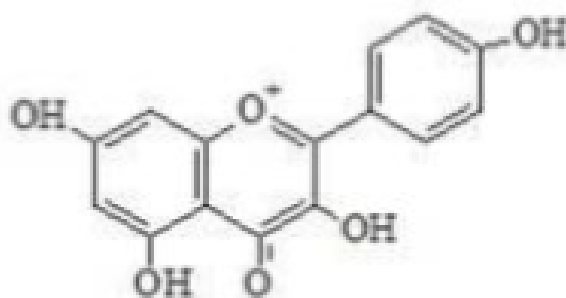


Figura 9. Estrutura das antocianinas. Fonte: SCALBERT e WILLIAMSON, 2000.

Os taninos são responsáveis pela adstringência, amargor dos vinhos, a adstringência é oriunda da combinação dos taninos com as proteínas salivares (SACCHI et al., 2005). O amargor é devido à natureza das moléculas elementares de função fenol, sendo que os taninos são divididos em hidrolisáveis e condensados (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003).

Os taninos hidrolisáveis não estão presentes nas uvas, são originárias das barricas de madeiras. Combinam-se aos ésteres dos ácidos fenólicos ou de seus derivados, que liberam ácido gálico ou ácido elágico após a hidrólise ácida, incluindo uma molécula de glicose (ROBÉREAU-GAYON et al., 2003).

Os taninos condensados da uva são polímeros de duas ou mais unidades de flavan-3-óis (+) catequina e a (-) epicatequina, estando presente em todas as partes sólidas da uva e se solubilizam durante a maceração no vinho (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003). A uva, o vinho e produtos derivados da uva contém grande quantidade de compostos fenólicos (GIEHL et al., 2007). O consumo desses compostos está associado ao menor risco de eventos coronários, a ingestão de vinho tinto ajuda na prevenção da agregação plaquetária (GIEHL et al., 2007). As propriedades antioxidantes presentes no vinho tinto são atribuídas à presença de polifenóis na casca e sementes da uva (GOLDE et al., 1999).

O vinho tinto vem recebendo atenção especial devido a seus componentes fenólicos inibirem a oxidação do colesterol LDL em estudo *in vitro*

(GIEHL et al., 2007). A oxidação de LDL, tem um importante papel no desenvolvimento da doença cardiovascular aterosclerótica (CACETA et al., 2000). Portanto, o vinho tinto exerce papel fundamental de relevância científica e social, pois as doenças cardiovasculares representam 30% de todas as causas de morte no mundo (GIEHL et al., 2007). A doença arterial coronariana representa a quinta causa de óbito em todo o mundo; Estima-se que para o ano de 2020 poderá ser a primeira causa de morte, caso não haja medidas preventivas dessa doença (OMS, 2018).

O consumo diário de vinho tinto de duas taças de 240 mL para homens e uma taça para mulheres ajuda na prevenção da agregação plaquetária, dessa forma reduzindo o risco de doença cardiovascular, sendo benéfico à saúde (RIBEIRO e MANFROI, 2010). Dessa forma se fez necessário um estudo para investigar o potencial antioxidante e hipolipemiante do vinho tinto Ruby Cabernet produzido em Itaqui, localizado na fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar o papel protetor do vinho Ruby Cabernet em um modelo de hipercolesterolemia em camundongos com deleção gênica para os receptores da lipoproteína de baixa intensidade LDL^{r/-}.

Objetivos Específicos

Analisar as propriedades antioxidantes *in vitro* do vinho Ruby Cabernet;

Avaliar o efeito do tratamento do vinho Ruby Cabernet sobre os níveis plasmáticos de colesterol total, triglicerídeos, LDL, HDL, oxLDL, AI nos camundongos hipercolesterolemicos;

Analisar a influência do vinho Ruby Cabernet sobre os níveis de malondialdeído, proteína carbonilada, espécies reativas do oxigênio e glutatona reduzida nos camundongos hipercolesterolemicos;

Avaliar o efeito do tratamento com o vinho Ruby Cabernet sobre os níveis de marcadores inflamatórios IL-6, IL-1 β , TNF- α e analisar a influência do vinho Ruby Cabernet sobre o anti-inflamatório IL-10 e fator de transcrricional NF- κ B nos camundongos hipercolesterolemicos.

PARTE II

MANUSCRITO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte dessa dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. Os itens *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão* e *Referências Bibliográficas*, encontram-se no próprio artigo. O **artigo** está disposto na forma que foi submetido na revista "*Biochemistry the Journal of Nutritional*".

Artigo:

"Protective effect of Ruby Cabernet wine in a model of hypercholesterolemia in mice".

**Protective effect of Ruby Cabernet wine in a model of
hypercholesterolemia in mice**

Etiára de Mattos Moraes^{1*}, Cristini Escobar Viana^{1*}, Franciele Romero Machado^{1*}, Silvana Peterini Boeira^{1*}, Cristiano R. Jesse^{1*}

¹Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas – LaftamBio Pampa – Universidade Federal do Pampa, Itaqui, RS, Brazil.

*Correspondence should be sent to:

Cristiano Ricardo Jesse

E-mail: cristianoricardojesse@yahoo.com.br

Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas – LaftamBio Pampa – Universidade Federal do Pampa, CEP 97650-000, Itaqui, RS, Brazil. Phone and FAX number: +55-55-34331669

Abstract

This study investigated the *in vitro* antioxidant action of Ruby Cabernet (RCR) wine, and its protective effects in the prevention of dyslipidemia in mice with gene deletion for low-density lipoprotein receptors (LDLr^{-/-}). Wild-type C57BJ6 mice (90 days old) and LDLr^{-/-} mice were treated with RCR (daily 400 uL dose, per gavage route) for 90 days. After RCR wine treatment, animals were euthanized and blood was collected for biochemical assays. The results of the present study demonstrated that RCR wine has a significant antioxidant capacity, as revealed by *in vitro* assays. Moreover, RCR wine attenuated the following biochemical parameters altered in LDLr^{-/-} mice: increased levels of total cholesterol, triglycerides, low density lipoprotein, oxidized low density lipoprotein and increased levels high density lipoprotein in the blood. Moreover, RCR wine alleviated the oxidative stress in the blood of LDLr^{-/-} mice, as revealed by the reduction in the levels of malondialdehyde, carbonylated protein and increased levels of reduced glutathione. Finally, LDLr^{-/-} mice exhibited a markedly increase in the levels of pro-inflammatory cytokines, a reduction of anti-inflammatory interleukin-10 and an increase in the levels of nuclear factor kappa-B. RCR wine attenuated these alterations. We concluded that RCR wine has a significant antioxidant *in vitro* potential. Moreover, RCR wine has lipid-lowering, antioxidant and anti-inflammatory effects in LDLr^{-/-}.

Keywords: Red Wine, Dyslipidemia, Cholesterol, Resveratrol, Atherosclerosis

1. Introduction

Cholesterol is an important lipid component for all cell membranes and myelin sheaths, playing a role in synaptic integrity and neural activity [1]. It also acts as a substrate for the synthesis of bile acids in the liver, and it is a precursor of steroid hormones [2]. However, it has been well recognized a link between elevated plasma levels of cholesterol and the development of atherosclerotic lesions. Some studies have reported the linkage of elevated plasma levels and the development of atherosclerotic lesions [3,4]. Family hypercholesterolemia (HF) is characterized by high levels of low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) that is a risk factor for the incidence of atherosclerosis and its pathological complications [3]. HF is due to defects in the LDLr gene encoding the LDL receptor (LDL-R). Damage to the LDL receptor raises plasma LDL-C levels resulting in deficiency in the blood clearance of this lipoprotein [4].

The formation of the atherosclerotic plaque begins in the aggression to the vascular endothelium due to several risk factors such as dyslipidemia, arterial hypertension or smoking. The result of this endothelial dysfunction is to increase the intima permeability to plasma lipoproteins, facilitating the accumulation of lipoproteins in the subendothelial space [5]. It has not been described that wild-type mice that develop atherosclerosis spontaneously [3]. Therefore, the emergence of genetically modified mice, which clarify many problems related to the experimental study of atherosclerosis is highlighted [6]. Mice have a genetic deletion of LDL receptor (LDLr^{-/-}) [3]. These animals present hypercholesterolemia, identified by moderate levels of LDL-cholesterol, even when submitted to a standard diet, in the long run can develop atherosclerotic lesions [7].

Wine consumption began approximately 7000 years ago in the Mediterranean, with its scientific and beneficial evidence in 1992, when it was reported by the French Paradox. Since then, these health benefits have aroused the interest of the scientific community [8]. In studies carried out in France it was observed that despite the high consumption of saturated fats, there was a lower incidence of cardiovascular diseases, due to the high consumption of wines [9]. Moderate consumption of red wine for men two 240 ml bowls and a bowl for women, coupled with a balanced diet can reduce coronary heart disease rates by up to 60% [10]. Resveratrol is characterized as the most important phenolic compound of wine, is present in the grape skin and has biological activity, acting as inhibitor of platelet aggregation and coagulation, also showing anti-inflammatory action. Resveratrol blocks the damaging effect of free radicals and has antiplatelet activity [11].

Supplementation with resveratrol (50 mg / L for 21 days) in the aorta artery of mice has been shown to attenuate the formation of atherosclerotic plaques [12]. According to Baur and Sinclair [13], red wine promotes greater protective effects than the consumption of other alcoholic beverages. The polyphenols present in the red wine can act directly against the reactive oxygen and nitrogen species in murine macrophages [14]. In addition to alcohol, red wine contains a wide range of polyphenol derivatives with important biological activities [15], being responsible for the systemic anti-inflammatory response, and potential decrease in the development of atherosclerosis [16].

In view thereof, the purpose of the present study was to investigate the protective effect of a red wine produced in the city of Itaqui-RS (Brazil) against the dyslipidemia and systemic oxidative stress and inflammation in LDLr^{-/-} mice.

For this aim, we analyzed the *in vitro* antioxidant action of Ruby Cabernet wine in addition, we verified the capacity of red wine in modulating lipid parameters, markers of oxidative damages, antioxidant systems and cytokines levels in the blood of mice with gene deletion for LDLr^{-/-} low-density lipoprotein receptors.

2. Methods

2.1 Wine

The 2009 Ruby Cabernet wine produced in the Itaqui-Rs city, Brazil, was purchased locally.

2.2 Animals

Twenty wild-type C57BJ6 mice (90 days old) and twenty C57BJ6 mice (90 days old) with gene deletion for low density lipoprotein (LDLr^{-/-}) receptors, weighing 20-30g, were used. The animals were kept in polypropylene boxes under controlled conditions, with light / dark cycle of 12 hours and temperature (22 ± 2 ° C). Mice received standard water and diet ad libitum. All procedures were conducted according to the guidelines of the Committee for the Care and Use of Experimental Animals and the research was approved by the Ethics Committee on Animal Use (034/2017) of the Federal University of Pampa (Unipampa).

2.3 Experimental Protocol

The mice were fed pure PB 22 containing crude protein 220 g / kg, ethyl acetate 40 g / kg, crude fiber 70 g / kg, calcium (min) 12 g / kg, calcium (max) phosphorus 8000 mg / kg , mineral matter 80 g / kg. For the induction of hypercholesterolemia, 12% cholesterol was sprinkled in the Pure treated ration and taken to the stove for 15 minutes at 30 ° C. And for the treatment with red wine, the mice received

400 μ L of wine through gavage, administered for 90 days. This dosage represents a moderate daily consumption of wine for a human of 70 kg and staggered for a mouse of approximately 25 g [17].

The animals were divided into 4 groups (n = 7): (1) Control group (vehicle alcohol 12%); Wine group (wine 400 μ L per gavage); (3) Hypercholesterolemia (LDLr^{-/-}) group (vehicle alcohol 12%); (4) Hypercholesterolemia (LDLr^{-/-}) group/wine group (wine 400 μ L per gavage).

The animals were submitted to these 4 treatments for 90 consecutive days. At the end of treatment, animals were euthanized with pentobarbital (180 mg / kg, intraperitoneal) and blood was collected by cardiac puncture for biochemical determinations. Blood samples were transferred to tubes containing heparin (anticoagulants), after centrifugation at 1500 rpm for 10 minutes, aliquots of supernatants (S1) were used.

2.4. Antioxidant Capacity (in vitro)

In a first experiment, we analyzed the in vitro antioxidant properties of RCR wine. The antioxidant capacity of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), method antioxidant (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin) 6-sulphonic acid (ABTS), oxygen radical absorbance capacity (ORAC), total antioxidant capacity (TRAP), total antioxidant reactivity (TAR) was determined according to the methodology proposed by [18,19,20], respectively.

2.4.1 Biochemical Parameters

The enzymatic determination of cholesterol (total and fractions), triglycerides (TG), low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL) and the activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), was performed

through Labtest® commercial kits manufactured in Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil.

Atherogenic index (AI) was determined by the calculation using the equation of proposed by Ikewuchi e Ikewuchi [21]: equation ($\text{Log} = [\text{TG}/ \text{HDL-c}]$).

2.4.2 Determination of Thiobarbituric acid (TBARS)

For this analysis, we used the protocol described by Buege and Aust [22]. This method is based on the reaction of two molecules of thiobarbituric acid with one of malondialdehyde (MDA), producing a complex of pink coloration that can be quantified by spectrophotometer reading at a wavelength of 532 nm.

2.4.3 Determination of plasma protein carbonyls

Plasma protein carbonyls (PC) content was measured according to procedure of Levine et al. [23]. Initially, 100 μL of plasma was added to 600 μL of DNPH (2,4-dinitrophenyl hydrazine), followed by incubation for 1 hour at room temperature, protected from light, with shaking every 15 min. Then, 600 μl of 20% TCA was added, with stirring and ice bath for 10 min, followed by centrifugation (5 min at 800 x g). The pellet was washed three consecutive times (centrifugation for 5 min at 800 x g), with 600 μl of ethanol-ethyl acetate. Finally, the excess ethanol-ethyl acetate was removed with the aid of a cotton swab and 500 μL of guanidine was added, followed by incubation in a water bath at 37 ° C for 60 min, and then read at 360 nm ($\epsilon = 22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). The concentration of carbonylated protein was expressed in nmol / mg-1.

2.4.4 Reactive Species (ROS) levels

To determine ROS levels, fresh S1 was diluted (1:10) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) and incubated with 10 μl of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA; 1 mM), at 37°C for 30 min. The RS levels were determined by a

spectrofluorimetric method, using DCHF-DA assay, as described by Loetchutinat et al. [24]. The DCHF-DA is enzymatically hydrolyzed by intracellular esterases to form non-fluorescent DCFH, which is then rapidly oxidized to form highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) in the presence of RS. DCF fluorescence intensity is proportional to the amount of RS that is formed. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation) 30 min after the addition of DCHF-DA to the medium. The RS levels were expressed as arbitrary unit (AU).

2.4.5 Reduced glutathione (GSH) levels

Levels of GSH were determined fluorometrically following Hissin and Hilf [25] using o-phthalaldehyde (OPA) as fluorophore. Briefly, the samples were homogenized in 0.1 M HClO₄. Homogenates were centrifuged at 3100 g for 10 min, and the supernatants were separated for the measurement of GSH. S1 (100 µL) was incubated with 100 µL of OPA (0.1% in methanol) and 1.8 mL of 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) for 15 min at room temperature in dark. Fluorescence was measured using a fluorescence spectrophotometer at excitation wavelength of 350 nm and at emission wavelength of 420 nm. GSH levels were expressed as nmol/g of tissue.

2.4.6 Catalase (CAT), Superoxide Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and Glutathione S-Transferase (GST) activities

CAT activity in S1 was assayed spectrophotometrically by the method proposed by Aebi [26], which involves monitoring the disappearance of H₂O₂ in the presence of S1 at 240 nm. Enzymatic reaction was initiated by adding S1 and the substrate H₂O₂ (0.3 mM) in a medium containing 50 mM potassium

phosphate buffer (pH 7.0). One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required for monitoring the disappearance of H₂O₂. The enzymatic activity was expressed as Units (U)/mg protein (1 U decomposes 1 μmol H₂O₂/min at pH 7 at 25°C).

SOD activity was assayed spectrophotometrically according to the method described by Misra and Fridovich [27]. This method is based on the capacity of SOD in inhibiting autoxidation of epinephrine to adrenochrome. Aliquots of S1 were added in a sodium carbonate (Na₂CO₃) buffer (50 mM; pH 10.3) and the enzymatic reaction was initiated by adding epinephrine (1 mM). The color reaction was measured at 480 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50 % at 26° C. The enzymatic activity was expressed as Units (U)/mg protein.

GPx activity in S1 was assayed spectrophotometrically by the method described by Wendel [28], through the GSH/ NADPH/glutathione reductase (GR) system, by the dismutation of H₂O₂ at 340 nm. S1 was added to the medium containing GSH/NADPH/GR system and the enzymatic reaction was initiated by adding H₂O₂ (4 mM). In this assay, the enzyme activity was indirectly measured by means of NADPH decay. H₂O₂ is reduced and generates GSSG from GSH. GSSG is regenerated back to GSH by GR present in the assay media at the expenses of NADPH. The enzymatic activity was expressed as nmol NADPH/ min/mg protein.

GR activity was determined spectrophotometrically as described by Carlberg and Mannervik [29]. In this assay, GSSG is reduced by GR at the expense of NADPH consumption, which was followed at 340 nm. GR activity is proportional to NADPH decay. An aliquot of S1 was added in the system

containing 0.15 M potassium phosphate buffer (pH 7.0), 1.5 mM EDTA, 0.15 mM NADPH. After the basal reading, the substrate (GSSG 20 mM) was added. The enzymatic activity was expressed as nmol NADPH/ min/mg protein.

GST activity was assayed through the conjugation of GSH with CDNB at 340 nm as described by Habig and Jakoby [30]. An aliquot of S1 was added in a medium containing 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4). After that, 100 mM CDNB and GSH were added to the medium. CDNB was used as substrate. The enzymatic activity was expressed as nmol CDNB conjugated/min/mg protein.

2.4.7 Cytokine levels

Blood plasma levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and NF- κ B and blood plasma were determined using ELISA DuoSet Kits assays, R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. The results were reported as pg / mg tissue.

3. Statistical analysis

Results were presented as mean \pm SEM. The data used for the statistical analysis were performed using the GraphPad Prism 6.0 program, using the two-way ANOVA variance, followed by Bonferroni post-hoc, and a significance level of $p < 0.05$.

4. Results

4.1 In vitro antioxidant activity assay

The *in vitro* antioxidant activity of Ruby Cabernet (RCR) wine demonstrated that this wine shows an important antioxidant capacity, as revealed by DPPH $82 \pm 4\%$, ORAC 22.8 ± 2.5 (uMol / 100g), ABTS 12.3 ± 2.5 (uMol/ 100g),

TRAP 31.2 ± 4 ($\mu\text{Mol} / 100\text{g}$) and TAR 16.8 ± 1.05 ($\mu\text{Mol} / 100\text{g}$) equivalent to trolox assays.

4.2 *Effect of RCR wine on biochemical parameters of hypercholesterolemic mice*

Two-way ANOVA of the TG levels demonstrated a significant wine x LDLr^{-/-} interaction ($F_{1, 24} = 22.59$, $p < 0.001$) and a significant effect of wine ($F_{1, 24} = 8.03$, $p < 0.01$) and LDLr^{-/-} ($F_{1, 24} = 95.35$, $p < 0.001$). Post hoc comparisons showed that the LDLr^{-/-}/vehicle group demonstrated a significantly increase of plasmatic TG levels compared to wild/vehicle group (control). The treatment with RCR wine significantly increased the levels of TG in LDLr^{-/-} mice; however, it was not able to maintain at the levels of control group (**Table 1**).

Statistical analysis of the CT levels revealed a significant wine x LDLr^{-/-} interaction ($F_{1, 24} = 20.22$, $p < 0.001$) wine ($F_{1, 24} = 23.26$, $p < 0.001$) and LDLr^{-/-} ($F_{1, 24} = 63.53$, $p < 0.001$). Post hoc comparisons showed that LDLr^{-/-}/vehicle group demonstrate significant high levels of plasmatic CT when compared to control group. The treatment with RCR wine significantly decreased the CT levels of LDLr^{-/-} mice when compared to LDLr^{-/-}/vehicle group (**Table 1**).

Two-way ANOVA of the HDL levels revealed a significant main effect of RCR wine ($F_{1, 24} = 16.96$, $p < 0.001$) and LDLr^{-/-} ($F_{1, 24} = 16.54$, $p < 0.001$). Post hoc comparisons demonstrated that the LDLr^{-/-}/Vehicle group showed a significant decrease of the plasma HDL levels compared to control group. The RCR wine treatment significantly increased the HDL levels of hypercholesterolemic mice. Interestingly, the treatment with RCR wine

significantly elevated the HDL levels (per se effect) when compared to control group (**Table 1**).

Statistical analysis of the LDL levels revealed a significant effect of wine x LDLr^{-/-} interaction ($F_{1,24} = 13.14$, $p < 0.003$), wine ($F_{1,24} = 14.70$, $p < 0.002$) and LDLr^{-/-} ($F_{1,24} = 67.98$, $p < 0.001$). Post hoc comparisons demonstrated that the LDLr^{-/-}/Vehicle group showed significant increase of LDLr^{-/-} levels when compared whit control group. The RCR wine treatment significantly decreased the LDL levels of hypercholesterolemic mice (**Table 1**).

Two-way ANOVA of the oxLDL revealed a significant effect of wine ($F_{1,24} = 23.95$, $p < 0.001$) and LDL ($F_{1,24} = 58.11$, $p < 0.001$). Post hoc comparisons showed that the LDLr^{-/-}/vehicle group has a significant increase of the oxLDL levels when compared whit control group. The RCR wine treatment significantly decreasead the oxLDL levels compared to control group (**Table 1**).

Statistical analysis of the AI revealed a interaction wine x LDL ($F_{1,24} = 5.53$, $p < 0.03$), wine ($F_{1,24} = 25.15$, $p < 0.001$) and LDL ($F_{1,24} = 84.07$, $p < 0.001$). Post hoc comparisons demonstrated that the LDLr^{-/-}/vehicle group showed a significant increase of the AI index compared to control group. The chronic treatment with wine significantly decreased the AI index LDLr^{-/-}/vehicle group when compared whit control group. The RCR wine treatment, (per se) attenuated the increase of AI compared to wild/wine group (**Table 1**).

Two-way ANOVA of the AST revealed a significant effect of wine ($F_{1,24} = 51.77$, $p < 0.001$). Post hoc comparisons showed that the LDLr^{-/-}/vehicle group showed significant increase the AST levels when compared whit control group. The RCR wine treatment significantly decreased the AST levels LDLr^{-/-}/wine

group compared to LDLr^{-/-}/vehicle group, but did not return to control group levels (**Table 1**).

Statistical analysis of the ALT revealed a significant effect LDLr^{-/-} ($F_{1, 24} = 31.43$, $p < 0.001$). Post hoc comparisons demonstrated that the LDLr^{-/-}/vehicle group showed a significant increase of the ALT levels when compared with control group. The treatment with RCR wine significantly decreased the ALT levels LDLr^{-/-}/wine group, compared to LDLr^{-/-}/vehicle group, not returning to level control (**Table 1**).

4.3 Malondialdehyde (MDA), Carbonylated protein (PC), Oxygen-reactive species (ROS) and Glutathione (GSH) levels

Statistical analysis of the MDA in the blood showed a significant effect of wine ($F_{1, 24} = 0.70$, $p < 0.41$), LDLr^{-/-} ($F_{1, 24} = 9.84$, $p < 0.008$) and wine x LDLr^{-/-} interaction ($F_{1, 24} = 2.80$, $p < 0.12$). Post hoc comparisons demonstrated that the LDLr^{-/-}/vehicle group showed a significant increase of MDA levels when compared with control group. The chronic treatment with RCR wine significantly decreased MDA levels compared to LDLr^{-/-}/vehicle group, but did not return to control group levels (**Fig. 1A**).

Two-way ANOVA of the PC levels in the blood demonstrated a significant effect of wine ($F_{1, 24} = 8.20$, $p < 0.01$), LDLr^{-/-} ($F_{1, 24} = 45.21$, $p < 0.001$) and wine x LDLr^{-/-} interaction ($F_{1, 24} = 17.92$, $p < 0.001$). Post hoc comparisons revealed that the LDLr^{-/-}/vehicle group showed a significant increase of the PC levels when compared with control group. The RCR wine treatment significantly decreased the PC levels compared to LDLr^{-/-}/vehicle group, not returning to control levels (**Fig. 1B**).

Two-way ANOVA of the ROS levels in the blood demonstrated a significant effect of wine ($F_{1, 24} = 4.84$, $p < 0.04$), LDLr^{-/-} ($F_{1, 24} = 27.80$, $p < 0.001$) and wine x LDLr^{-/-} interaction ($F_{1, 24} = 5.90$, $p < 0.03$). Post hoc comparisons revealed that the LDLr^{-/-}/vehicle group showed a significant increase of the ROS levels when compared whit control group. The RCR wine treatment significantly decreased the ROS levels compared to LDLr^{-/-}/vehicle group (**Fig. 1C**).

Statistical analysis of the GSH levels in the blood showed a significant effect of wine ($F_{1, 24} = 8.71$, $p < 0.01$), LDLr^{-/-} ($F_{1, 24} = 27.91$, $p < 0.001$) and wine LDLr^{-/-} interaction ($F_{1, 24} = 1.08$, $p < 0.31$). Post hoc comparisons demonstrated that the LDLr^{-/-}/vehicle group showed a significant decrease of the GSH levels when compared whit control group. RCR wine treatment partially restored the increased of GSH levels compared to LDLr^{-/-}/vehicle group (**Fig. 1D**).

4.4 Antioxidant enzymes activities

Two-way ANOVA of the GR activity in the blood demonstrated a significant effect of wine ($F_{1, 24} = 9.20$, $p < 0.01$), LDLr^{-/-} ($F_{1, 24} = 62.37$, $p < 0.001$) and Wine x LDLr^{-/-} interaction ($F_{1, 24} = 14.69$, $p < 0.002$). Post hoc comparisons revealed that the LDLr^{-/-}/vehicle group showed a significant increase of the GR activity when compared whit control group. The RCR wine treatment significantly decreased the GR activity compared to LDLr^{-/-}/vehicle group (**Fig. 2A**).

Two-way ANOVA of the GPx activity in the blood revealed a significant effect of wine ($F_{1,24} = 0.84$, $p < 0.37$), LDLr^{-/-} ($F_{1,24} = 18.75$, $p < 0.001$) and wine x LDLr^{-/-}interaction ($F_{1,24} = 4.64$, $p < 0.05$). Post hoc comparisons demonstrated that animals in the LDLr^{-/-}/wine group showed a significant increase in the GPx activity when compared whit control group. Oral daily administration of RCR wine

attenuated the increased of the GPx activity in the blood when compared whit control group **(Fig. 2B)**.

Statistical analysis of the GST activity in the blood showed a significant effect of wine ($F_{1, 24} = 2.92$, $p < 0.11$), LDLr^{-/-} ($F_{1, 24} = 32.95$, $p < 0.001$) and wine x LDLr^{-/-} interaction ($F_{1, 24} = 18.28$, $p < 0.001$). Post hoc comparisons showed that the LDLr^{-/-}/vehicle group demonstrated a significantly increase of the GST activity when compared whit control group. The treatment with RCR wine significantly decreased GST activity compared to LDL^{-/-}/vehicle group ($p < 0.05$) activity **(Fig. 2C)**.

Two-way ANOVA of the CAT activity in the blood revealed a significant effect of wine ($F_{1,24} = 1.32$, $p < 0.27$), LDLr^{-/-} ($F_{1,24} = 11.32$, $p < 0.005$) and wine x LDLr^{-/-}interaction ($F_{1, 24} = 1.64$, $p < 0.22$). Post hoc comparisons demonstrated that animals in the LDLr^{-/-}/wine group showed a significant increase in the CAT activity when compared whit control group. Oral daily administration of RCR wine partially protected of the CAT activity when compared whit control group **(Fig. 2D)**.

Statistical analysis of the SOD activity in the blood showed a significant effect of wine ($F_{1, 24} = 1.86$, $p < 0.19$), LDLr^{-/-} ($F_{1, 24} = 45.10$, $p < 0.001$) and wine x LDLr^{-/-} interaction ($F_{1, 24} = 19.93$, $p < 0.001$). Post hoc comparisons showed that the LDLr^{-/-}/vehicle group demonstrated a significantly increase of the SOD activity when compared whit control group. The treatment with RCR wine significantly decreased SOD activity compared to LDLr^{-/-}/vehicle group ($p < 0.05$) **(Fig. 2E)**.

4.5 Effect of RCR wine on markers of inflammation in the blood of hypercholesterolemic mice

Two-way ANOVA of the IL-1 β levels in the blood demonstrated a significant effect of wine ($F_{1, 24} = 11.85$, $p < 0.004$), LDLr^{-/-} ($F_{1, 24} = 68.86$, $p < 0.001$) and wine x LDLr^{-/-} interaction ($F_{1, 24} = 19.68$, $p < 0.001$). Post hoc comparisons showed that the LDLr^{-/-}/vehicle group demonstrated a significantly increase of IL-1 β levels when compared whit control group. The treatment with RCR wine significantly decreased IL-1 β levels compared to LDLr^{-/-}/vehicle group **(Fig. 3A)**.

Statistical analysis of the IL-6 levels in the blood showed a significant effect of wine ($F_{1, 24} = 2.92$, $p < 0.11$) LDLr^{-/-} ($F_{1,24} = 67.69$, $p < 0.001$) and wine x LDLr^{-/-} interaction ($F_{1,24} = 6.99$, $p < 0.02$). Post hoc comparisons demonstrated that the LDLr^{-/-}/vehicle group showed a significant increase of IL-6 levels when compared whit control group. RCR wine treatment significantly decreased IL-6 levels compared to LDLr^{-/-}/vehicle group **(Fig. 3B)**.

Two-way ANOVA of the TNF- α levels in the blood demonstrated a significant effect of wine ($F_{1, 24} = 2.04$, $p < 0.17$), LDLr^{-/-} ($F_{1, 24} = 31.64$, $p < 0.001$) and Wine x LDLr^{-/-} interaction ($F_{1, 24} = 5.71$, $p < 0.03$). Post hoc comparisons showed that the LDLr^{-/-}/vehicle group demonstrated a significant increase of TNF- α levels when compared whit control group. The treatment with RCR wine significantly decreased TNF- α levels compared to LDL^{-/-}/vehicle group **(Fig. 3C)**.

Statistical analysis of the IL-10 levels in the blood showed a significant effect of wine ($F_{1, 24} = 20.11$, $p < 0.001$), LDLr^{-/-} ($F_{1, 24} = 12.37$, $p < 0.004$) and wine x LDLr^{-/-} interaction ($F_{1, 24} = 1.11$, $p < 0.31$). Post hoc comparisons revealed that the LDLr^{-/-}/vehicle group showed a significant decrease of the IL-10 levels when compared whit control group. The RCR wine treatment significantly increased the IL-10 levels compared to LDLr^{-/-}/vehicle group. Interestingly, the

treatment with wine significantly elevated the IL-10 levels when compared to control group **(Fig. 3D)**.

Two-way ANOVA of the NF-kB levels in the blood demonstrated a significant effect of wine ($F_{1, 24} = 2.62$, $p < 0.13$), LDLr^{-/-} ($F_{1, 24} = 23.51$, $p < 0.001$) and Wine x LDLr^{-/-} interaction ($F_{1, 24} = 28.02$, $p < 0.001$). Post hoc comparisons showed that the LDLr^{-/-}/vehicle group demonstrated a significant increase of NF-kB levels when compared with control group. The treatment with RCR wine significantly decreased NF-kB levels compared to LDLr^{-/-}/vehicle group ($p < 0.05$) **(Fig. 3E)**.

5. Discussion

This study verified the antioxidant action of Ruby Cabernet wine (RCR wine) and its protective effects against dyslipidemia and systemic oxidative stress and inflammation in a mouse model of hypercholesterolemia caused by gene deletion of LDL receptor (LDLr^{-/-}).

In a first experiment, we analyzed the antioxidant properties of RCR wine using peroxidation of DPPH, ABTS, ORAC, TRAP and TAR assays. The results of these *in vitro* techniques have shown that RCR wine has a significant antioxidant capacity in all of the methods used. Corroborating our results, Lino et al. [31] have shown that red wines present greater antioxidant activity, demonstrating that the general winemaking process can actually generate greater phenolic extraction. The RCR wine produced in the Itaqui-RS city has its antioxidant capacity similar to wines produced in other traditional grape growing countries.

In a second experiment, we sought to investigate the protective role of RCR wine in the prevention of dyslipidemia in hypercholesterolemic mice. Atherosclerosis is an inflammatory disease that occurs in response to endothelial aggression, damaging the intimate layer of medium and large caliber arteries. In the current study, LDLr (-/-) animals showed a dramatic increase in triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein (LDL-C) and low density oxidized lipoprotein (oxLDL) circulating levels with substantially decreased levels of high density lipoproteins (HDL-C) in the blood. Conversely, RCR wine attenuated these changes in the biochemical parameters caused by the absence of the LDL receptor. These results demonstrated that treatment with RCR wine over a period of 90 consecutive days with a dosage of 400 μ L/gavage in LDLr^{-/-} animals is able to alleviate the lipid blood alterations in this transgenic mouse model.

Our results are in agreement with findings of Apostolidou et al. [32], which showed that red wine may contribute to the improvement of microvessel function and consequent cardioprotection [33]. In the study by Quiñones et al. [34] refers to the decrease in the incidence of cardiovascular diseases to a diet rich in polyphenols. Red wine has protective effects on cholesterol through some mechanisms like polyphenols action, exerting protection on the hepatic cholesterol and metabolism of lipoproteins. This mechanism reduces the absorption of cholesterol and decreases the delivery of cholesterol to the liver, which ends up reducing cholesterol in plasma. This affects the rate of secretion of apolipoprotein B, modifying the very low-density lipoprotein particles (VLDL), which leads to a decrease in LDL and an increase in HDL in the blood circulation [34].

The adsorption of polyphenols naturally limits the access of aqueous oxidants to the surface of the membrane and their initial attack on that surface, the polyphenols have the ability to protect oxLDL, since they are associated with lipoproteins only by ionic interactions with residues loaded on the surface of the particles [35].

Another important finding of the present study was that the levels of atherogenic index were attenuated LDLr^{-/-} mice treated with RCR wine. Red wine polyphenols are important in protecting the formation of atheroma plaques. The polyphenols are absorbed to exert biological effects, their absorption through the intestinal barrier is given by the increase of the antioxidant capacity of the plasma after consuming red wine [36]. Some studies have reported that red wine polyphenols prevent or reduce oxidative stress by scavenger activity of free radicals, complexation with oxidizing metals, association with LDL-C increasing its resistance to oxidation [34, 37].

In the current study, the enzymes aspartate transaminase (ALT) and alanine transaminase (AST) were determined to evaluate hepatocellular damage in LDLr^{-/-} hypercholesterolemic animals. Our results demonstrated that blood levels of AST and ALT were increased in the hypercholesterolemic LDLr^{-/-} animals. The RCR wine treatment, in turn, was able to attenuate these increased levels of transaminases. According to Chuang et al. [37], LDLr^{-/-} animals are not able to sustain NADPH in the reduced state, such a reduced nucleotide content in hepatocytes of LDLr^{-/-} mice is due to high lipogenesis rate because the cells are deficient in capturing exogenous cholesterol [38]. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the accumulation of liver fat (steatosis) not related to alcohol use [39]. Regarding NAFLD, it was shown that transaminases are elevated in the

plasma of patients with hepatic lesions [40]. In addition, the risk is higher for this disease, especially in obese, diabetic patients with dyslipidemia [39]. Thus, the present study suggests that RCR wine, by improving the lipid profile and by having attenuated the levels of ALT and AST can be used to prevent NAFLD.

Oxidative stress is the result of the imbalance between the production reactive species and antioxidant system [41]. The production of free radicals and oxidative stress have been identified as causing the development of atherosclerosis during hypercholesterolemia [42]. In the present study, LDLr^{-/-} animals presented increased circulating levels of reactive oxygen species (ROS), accompanied by lipid peroxidation and protein oxidation. Treatment with RCR wine mitigated the increase of these oxidative markers in plasma. The increase in MDA levels is a possible consequence of free radical mediated damage and lipid peroxidation whereas the increase in the level of carboniled proteins (PC) is related to the oxidative damage of the protein by free radicals in atherosclerosis [43, 44]. The increase of ROS causes an imbalance between the pro-oxidant and antioxidant mechanisms present in the arterial wall, thus contributing to the development of atherogenesis [45].

The antioxidant defense system (GSH) neutralizes the action of free radicals in the initiation or propagation phase of lipoperoxidation, leading to the formation of less toxic products, as they act by absorbing the energy of excitation by donating free radicals [46]. In our study, RCR wine treatment significantly mitigated the depletion of GSH blood levels found in LDLr^{-/-} animals. Moreover, the activity of antioxidant enzymes CAT, SOD, GR, GPx and GST were found increased in hypercholesterolemic LDLr^{-/-} animals. On the other hand, treatment with RCR wine mitigated these elevations in enzymatic antioxidant activities.

According to Macedo et al. [47], cells exposed to oxidative stress, increase the activity and expression of antioxidant enzymes as a compensatory mechanism to protect them from damage caused by free radicals. In regard to red wine, Di Renzo et al. [48], showed that the expressions of the antioxidant enzymes were attenuated after the administration of this wine. According to Peluso et al. [49], the activity of antioxidant enzymes were significantly higher in patients with hepatic steatosis and the administration of red wine caused a gradual decline in the expression of these enzymes. One possible antioxidant mechanism of red wine could be its capacity to donate electrons to unpaired free radicals, limiting the ROS production, thereby attenuating the increase of antioxidant enzymes activities.

The process of inflammation is induced by risk factors and immune response, with the main events leading to the atherogenesis process. Therefore, inflammation markers are also potential targets in the prevention or treatment of atherosclerosis [49]. In this study, RCR wine attenuated the increased levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α caused by gene deletion of LDL receptors. These pro-inflammatory cytokines are involved in the NAFLD process, thereby contributing to the atherogenesis acceleration [50, 51].

In this study, the anti-inflammatory IL-10 was decreased in LDLr^{-/-} animals. Treatment with RCR wine increased the levels of IL-10 exhibiting a total protection. IL-10 is a pleiotropic cytokine produced by T helper cells, T lymphocytes, B lymphocytes, monocytes and macrophages. With anti-inflammatory properties, its function is to regulate the immune system, inhibiting the expression or the production of pro-inflammatory cytokines [52]. According to Nishida et al. [53] IL-10 has multifaceted anti-inflammatory properties, including

inhibition of the activity of macrophages and T cells, exhibiting a protective effect against atherogenesis. In this study, RCR wine increased levels of the anti-inflammatory IL-10 totally protecting against the formation of atherosclerosis.

The nuclear factor kappa-B (NF- κ B) is a transcription factor of the inflammatory response, is involved in the regulation of inflammatory response genes in apoptosis, cellular proliferation and in the increase of reactive oxygen species production [53]. Some studies point to the presence of this activated factor in the atherosclerotic plaque, in smooth muscle cells, endothelial cells and macrophages [49]. In our study, the transcription factor NF- κ B was increased in the LDLr^{-/-} animals. Treatment with RCR wine partially attenuated these levels in these animals. Therefore, the treatment with red wine in LDLr^{-/-} mice was efficient in attenuating oxidative stress and inflammatory cytokines via modulation of NF- κ B, acting in the prevention of atherosclerotic plaques formation.

Overall, the results of the present study indicates that RCR wine may exert a protective effect against lipid blood alterations and consequent oxidative and inflammatory responses in transgenic hypercholesterolemic mice. The RCR wine has antioxidant action by attenuating the levels of pro-inflammatory cytokines and transcription factor NF- κ B and increased levels of the anti-inflammatory IL-10 totally protecting.

Thus, RCR wine seems to exert its antioxidant capacity and its ability to modulate the anti-inflammatory cytokine IL-10, limiting the production of reactive oxygen species and the inflammatory response, as we do not yet know exactly the mechanism of action of RCR wine.

6. Conclusion

We concluded that RCR wine has a significant antioxidant *in vitro* potential. Moreover, RCR wine has lipid-lowering, antioxidant and anti-inflammatory effects in LDLr^{-/-}. Therefore, RCR wine should have a thorough study on what mechanisms it is acting.

Conflict of Interest

The authors have no conflicts of interest to report.

Acknowledgments

The authors are grateful for financial support by FAPERGS (16/2551-0000526-5 e (PRONUPEQ) e #16/2251-0000183-9 (ARD/PPP)) and CNPq (#430841/2016-7 (Universal)) Research Grants. C.R.J. is recipient of CNPQ fellowships. E.M.M are recipients of FAPERGS, CAPES or UNIPAMPA fellowships.

7 References

- [1] Pfrieger FW. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:1158-71.
- [2] Liscum L, Underwood KW. Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *J Biol Chem* 1995; 270:15443-46.
- [3] Oliveira J, Hort MA, Moreira ELG, Glaser V, Ribeiro-do-valle RM, Prediger RD, Farina M, Latini A, De Bem AF. Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: Relevance of cortico-cerebralmitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Neuroscience* 2011; 197: 99-06.
- [4] Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* 2002; 8:1211-17.
- [5] Ross R. Atherosclerosis-na inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-26.
- [6] Ohashi R, Mu H, Yao Q, Chen C. Cellular and molecular mechanisms of atherosclerosis with mouse models. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14:187-90.
- [7] Daugherty A. Mouse models of atherosclerosis. *Am J Med Sci* 2002; 323-10.
- [8] Penna NG, Hecktheuer LHR. Vinho e Saúde: uma revisão. *Infarma* 2004; 16: 64-7.
- [9] Souza GG, Meneghin LO, Coelho SP, Maia JF, Silva AG. A uva roxa, *Vitis vinífera* L. (Vitaceae)–seus sucos e vinhos na prevenção de doenças vasculares. *Natureza on-line* 2006; 4: 80-6.
- [10] Ribeiro MEM, Manfroi V. Vinho e Saúde: uma visão química. *Rev. Brasileira de Viticultura e Enologia* 2010; 2: 91-03.

- [11] Sautter CK, Denardin S, Alves AO, Mallmann A, Penna NG, Hecktheuer LH. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2005; 25: 437-42.
- [12] Ciz M, Pavelková M, Gallová L, Králova J, Kubala L, Lojek A. The Influence of Wine Polyphenols on Reactive Oxygen and Nitrogen Species Production by Murine Macrophages RAW 264.7. *Physiol* 2008; 57: 393-02.
- [13] Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov* 2006; 5:493–06.
- [14] Soares Filho PR, Castro I, Stahlschmidt A. Efeito do vinho tinto associado ao exercício físico no sistema cardiovascular de ratos espontaneamente hipertensos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2011; 96: 277-83.
- [15] Soylemez S, Sepici A, Akar F. Resveratrol Supplementation Gender Independently Improves Endothelial Reactivity and Suppresses Superoxide Production in Healthy Rats. *Cardiovasc. Drugs Ther* 2009; 23: 449–58.
- [16] Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab* 1997; 11: 287–13.
- [17] Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal* 2008; 22: 659-61.
- [18] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Science and Technology* 1995; 28: 25-30.
- [19] Lissi E, Pascual C, Dell Castilho MD. Luminol luminescence induced by 2,2-azobis (2-amidino-propane) thermolysis. *Free Rad Res Comms* 1992; 17: 299-11.

- [20] Liesuy SF, Repetto GG. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian J of Med And Biol* 2002; 35: 523-34.
- [21] Ikewuchi CJ, Ikewuchi CC. Alteration of plasma lipid profiles and atherogenic indices by *stachytarpheta jamaicensis* L. (Vahe). *Biochemistri* 2009; 21:71-72.
- [22] Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302.
- [23] Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. *Methods enzymol* 1994; 2:186-64.
- [24] Loetchutinat C, Kothan S, Dechsupa S, Meesungnoen J, Jay-Gerin J, Mankhetkorn S. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 20,70-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiat Phys Chem* 2005; 72:323–31.
- [25] Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; 74: 214-26.
- [26] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 1984; 105:121-26.
- [27] Misra HP, Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* 1972; 247: 6960-62.
- [28] Wendel A. Glutathione peroxidase. *Meth Enzimology* 1981; 77: 325-33.
- [29] Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985; 113:484–90.
- [30] Habig WH, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 1974; 249: 7130-39.

- [31] Lino FMA, Sá LZ, Torres IMS, Rocha ML, Dinis TCP, Gbedini PC, Somerset VS, Gil ES. Voltammetric and spectrometric determination of antioxidant capacity of selected wines. *Electrochimica Acta* 2014; 128: 25-31.
- [32] Apostolidou C, Adamopoulos K, Lymperaki E, Iliadis S, Papapreponis P, Kourtidou-Papadeli C. Cardiovascular risk and benefits from antioxidant dietary intervention with red wine in asymptomatic hypercholesterolemics. *Clinical Nutrition*
- [33] Lassaletta AD, Chu LM, Elmadhum NY, Burguess TA, Robich MP, Sellke FW. Cardioprotective effects of red wine and vodka in a model of endothelial dysfunction. *J Surg Res* 2012; 178: 586-92.
- [34] Quiñones M, Miguel M, Alexandre A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological Research* 2013; 68: 125-31.
- [35] Ramón R, Miranda A, Vergara L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta* 2011; 412: 410-24.
- [36] Biagi M, Bertelli AE. Wine, alcohol and pills: what future for the french paradox? *Life Sciences* 2015; 13:19-22.
- [37] Chuang C, McIntosh MK. Potential Mechanisms by Which Polyphenol-Rich Grapes Prevent Obesity-Mediated Inflammation and Metabolic Diseases. *The Annual Review of Nutrition* 2011; 31:155–76.
- [38] Oliveira HC, Cosso RG, Alberici LC, Maciel EN, Salerno AG, Dorigheo GG, Velho JA, de Faria EC, Vercesi AE. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. *FASEB J* 2005; 19:278-80.

- [39] Lazo M, Hernaez R, Eberhardt MS, Bonekamp S, Kamel I, Guallar E, Koteish A, Brancati FL, Clark JM. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: The third national health and nutrition examination survey. *American Journal of Epidemiology* 2013; 178: 38-45.
- [40] Ji G, Wang Y, Deng Y, Li X, Jrang Z. Resveratrol ameliorates hepatic steatosis and inflammation in methionine/choline-deficiency-diet-induced steatohepatites through regulating autophagy. *Lipids in Health and Disease* 2015; 14: 130-34.
- [41] Sies H. What is oxidative stress?? In: Keaney, J.F.Jr., ed. *Oxidative stress and cardiovascular diseases*. Boston: Kluwer Academic Publisher 2000; 8:1-18.
- [42] Augusti PR, Greicy MM, Conterato SS, Sobieski R, Quatrin LM, Rocha MP, Denardin IT, Emanuelli T. Astaxanthin reduces oxidative stress but not aortic damage in atherosclerotic rabbits. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 2009; 14: 314-22.
- [43] Taulavouri E, Hellström EK, Taulavouri K, Laine K. Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal reacclimation and cold acclimation. *Journal of Experimental Botany* 2001; 52: 2375-80.
- [44] Beal DJ, Cohen RR, Burke MJ, McLendon CL. Cohesion and performance in groups: A Meta-analytic clarification of construct relations. *Journal of Applied Psychology* 2003; 88:989-04.
- [45] Podrini C, Borghesan M, Greco A, Paziienza V, Mazzoccoli G, Vinciguerra M. Redox homeostasis and epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Curr. Pharm Des* 2013;19: 2737-46.

- [46] Hübscher, G.H. Modulação da hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina através da administração de suco de uva e vinho tinto 2005. Tese-Doutorado. Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- [47] Macedo LPL, Rogero MM, Guimarães JP, Granato D, Lobato LP, Castro IA. Effects of red wines with diferente in vitro antioxidante activity on oxidative stress of high-fat diet rats. *Food Chemistry* 2013; 137:122-29.
- [48] Di Renzo L, Carraro A, Valente R, Iacopino L, Colica C, De Lorenzo A. Intake of red wine in different meals modulates oxidized LDL level, oxidative and inflammatory gene expression in health people: A randomized crossover trial. *Oxidative Medicine and cellular Longevity* 2014; 10: 9.
- [49] Peluso I, Manafikhi H, Reggi R, Palmery M. Effects of red wine on post prandial stress: potential implication in non-alcoholic fatty liver disease development. *Eur. J. Nutr* 2015; 54:497-07.
- [50] Volp AC, Alfenas RCG, Costa NMB, Minim VPR, Stringueta PC, Bressan J. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em predizer a síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008; 52:537-49.
- [51] Roxrode KM, Pradhan A, Manso JE, Buring JE, Ridker PM. Relationship of total and abdominal adiposity with CRP and IL-6 in women. *Amm Epidemiol* 2003; 13:674-82.
- [52] Francisco G, Hernández C, Simó R. Serum markers of vascular inflammation in dyslipemia. *Clin Chim Acta*, 2006; 369: 1-16.
- [53] Nishida M, Moriyama T, Sugita Y, Yamauchi-Takihara K. Interleukin-10 associates with adiponectin predominantly in subjects with metabolic syndrome. *Circ J*. 2007; 71:1234-8.

Groups		LDL^{-/-}/Vehicle	Wild/Wine	LDL^{-/-}/Wine
Parameter	Wild/Vehicle			
TG (mg/dl)	81.50±6.41	251.30±11.32 ^{***}	101.8±6.84	157.31±7.30 [#] \$
TC (mg/dl)	59.75±6.01	594.52±21.20 ^{***}	55.75±6.04	194.84±14.44 [#] \$
HDL-C (mg/dl)	28.75±3.32	17.50±3.45 ^{**}	37.54±3.47 [*]	33.44±2.87 [#]
LDL-C (mg/dl)	29.16±2.48	476.81±14.69 ^{***}	22.11±2.30 [*]	178.14±7.91 [#] \$
oxLDL (mg/dl)	1.02±0.09	1.34±0.08 ^{**}	0.80±0.08 [*]	1.14±0.09 [#] \$
Atherogenic index (A.I.)	2.47±0.19	6.84±1.85 ^{***}	1.57±0.21 [*]	3.79±0.41 [#] \$
AST (U/l)	16.84±1.14	54.84±1.69 ^{**}	19.68±1.85	32.87±2.03 [#] \$
ALT (U/l)	36.84±2.81	81.42±4.08 ^{**}	41.21±2.88	50.68±2.74 [#] \$

Table 1. Effect of wine on plasmatic profile of LDL^{-/-} mice hypercholesterolemic.

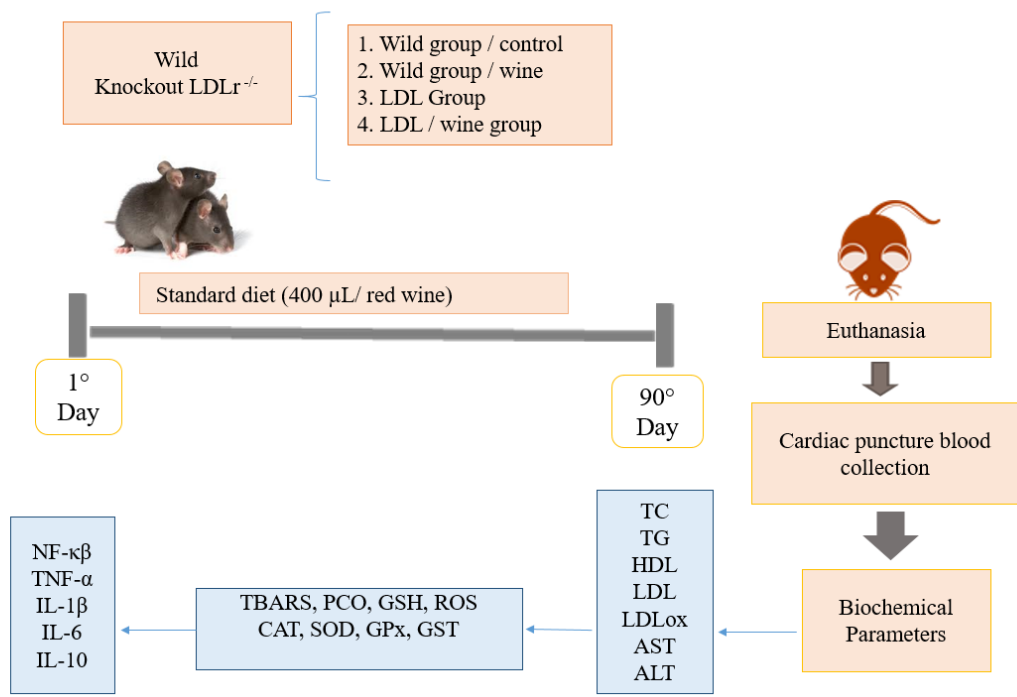


Figure 1. Experimental procedures

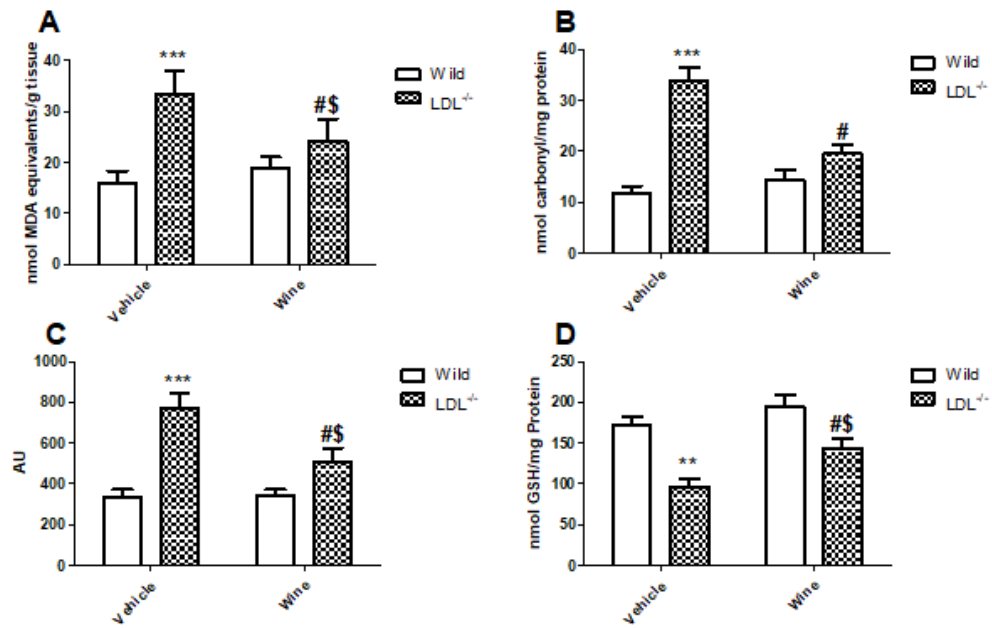


Figure 2. Effects of RCR wine on the levels of Malondialdehyde (A), Carbonylated Protein (B), Oxigen-Reactive Species (C), Reduced Glutathione (D) in wild and LDL^{-/-} mice. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. (n = 6). * P < 0.05 when compared with wild/vehicle. ** P < 0.01 when compared with Wild/Vehicle. ***P < 0.001 when compared with wild/vehicle. # P < 0.05 when compared with LDL^{-/-}/vehicle. \$ P < 0.05 when compared with Wild Wine. (Two-way ANOVA, Bonferroni post hoc test).

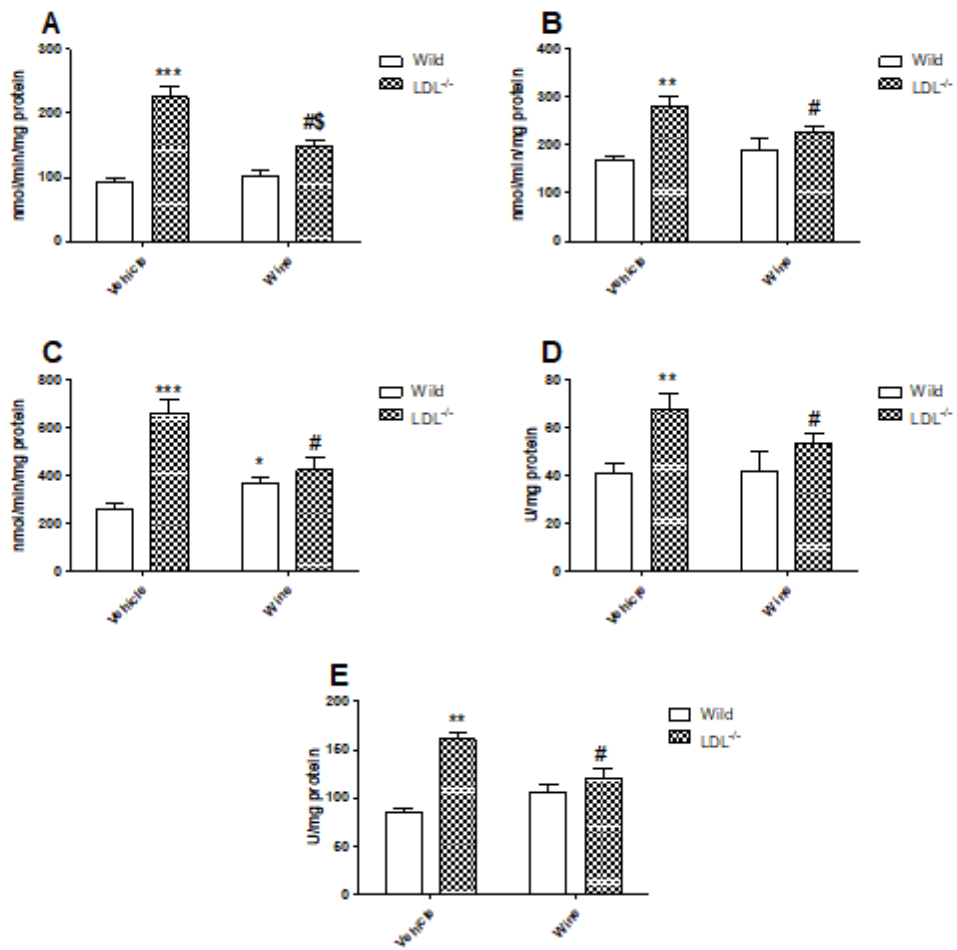


Figure 3. Effects of RCR wine on the activities of Glutathione Reductase (A), Glutathione Peroxidase (B), Glutathione-s-transferase (C), Catalase (D), Superoxide Dismutase (E) activities in wild and LDL^{-/-}. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. (n = 6). * P < 0.05 when compared with Wild/Vehicle. ** P < 0.01 when compared with Wild/Vehicle. ***P < 0.001 when compared with Wild/Vehicle. # P < 0.05 when compared with LDL^{-/-}/vehicle. \$ P < 0.05 when compared with Wild Wine. (Two-way ANOVA, Bonferroni post hoc test).

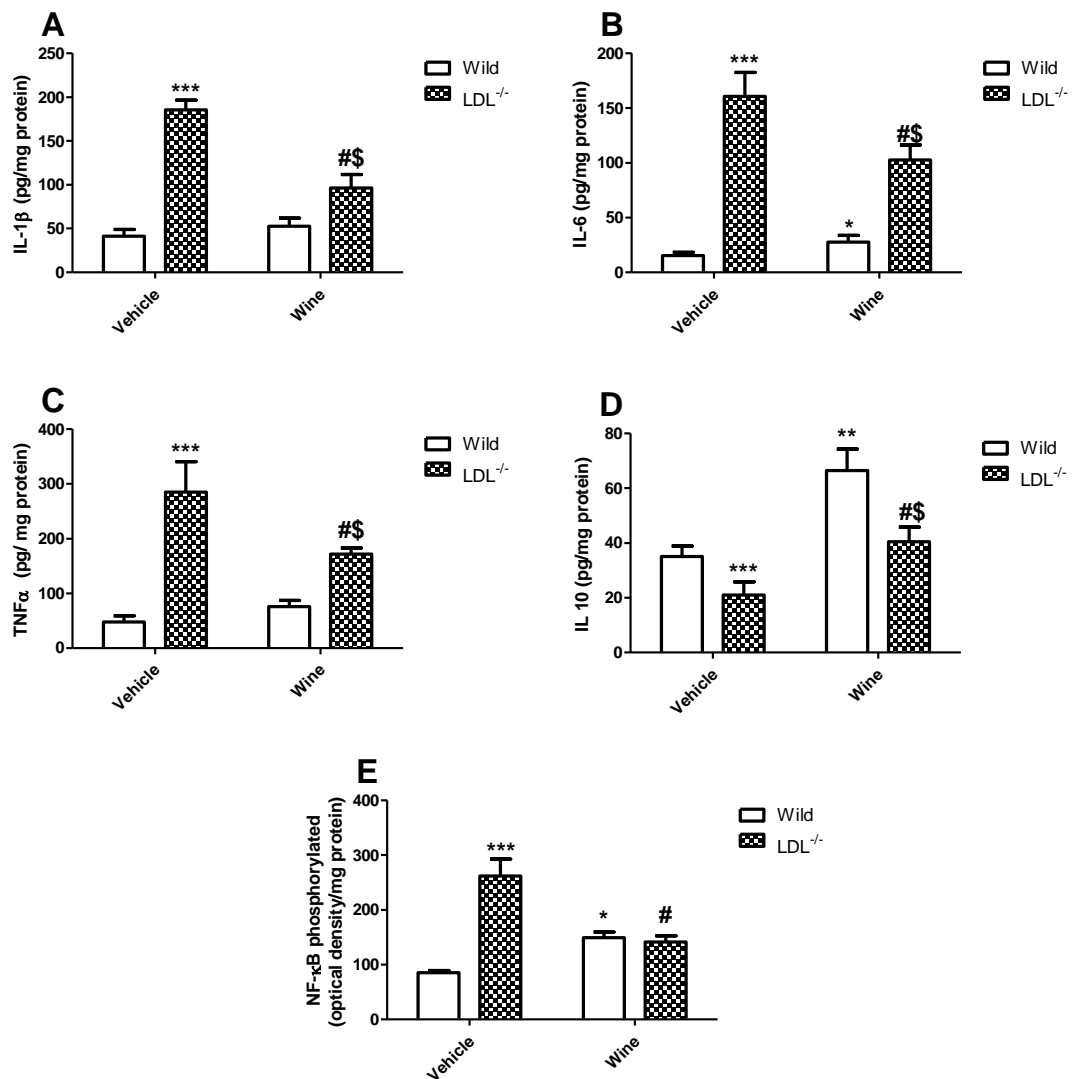


Figure 4. Effects of RCR wine on the levels of Interleukin IL-1β (A), Interleukin IL-6 (B), Tumor Necrosis Factor Alpha (C), Interleukin IL-10 (D), Nuclear Factor Kappa-B (E) in wild and LDL^{-/-} mice. Data are expressed as the mean ± S.E.M. (n= 6). * P < 0.05 when compared with wild/vehicle. ** P < 0.01 when compared with wild/vehicle. ***P < 0.001 when compared with Wild/Vehicle. # P < 0.05 when compared with LDL^{-/-}/vehicle. \$ P < 0.05 when compared with wild wine. (Two-way ANOVA, Bonferroni post hoc test).

PARTE III

6 CONCLUSÃO

Demonstrou-se que o vinho RCR possui efeito hipolipemiante em um modelo de LDLr^{-/-} de hipercolesterolemia. O tratamento com o vinho RCR foi capaz de atenuar a hipercolesterolemia nos animais LDLr^{-/-}, e aumentar o anti-inflamatório IL-10 nos animais, ainda precisamos de mais estudos para saber exatamente o mecanismos de ação do vinho RCR e seu potencial de ação.

7. PERSPECTIVAS

A fim de obter um melhor entendimento e resposta do mecanismo do vinho tinto sobre a hipercolesterolemia em animais LDLr^{-/-}, este trabalho terá continuidade no doutorado. A baixo encontram-se algumas perspectivas:

- Analisar os mecanismos do vinho Ruby Cabernet sobre as ciclooxigenase-1 (cox-1) e ciclooxigenase-2 (cox-2);
- Realizar o estudo com o vinho Ruby Cabernet em modelo de animal com doença cerebrovascular (Acidente Vascular Cerebral).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, K.; MALTESE, F.; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 357-378, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Regulamento técnico sobre atribuições de aditivos e seus limites máximos para alimentos. Resolução RDC nº64, de 16 de setembro de 2008. **Diário oficial da união**; Poder Executivo, de 17 de setembro de 2008.

BAUR, J.A.; SINCLAIR, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nat. Rev. Drug Discov**, v. 5, p. 493-506, 2006.

BRASIL. V diretriz brasileira de dyslipidemia e prevenção da aterosclerose. **Arq. Bas. Cardiol**, v. 101, p. 1-22, 2017.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v. 232, p. 34-47, 1986.

CIZ, M.; PAVELKOVÁ, M.; GALLOVÁ, L.; KRÁLOVA, J.; KUBALA, L.; LOJEK, A. The Influence of Wine Polyphenols on Reactive Oxygen and Nitrogen Species Production by Murine Macrophages RAW 264.7. **Physiol**, v. 57, p. 393-402, 2008.

DAS, S.; SANTANI, D. D.; DHALLA, N. S. Experimental evidence for the cardioprotective effects of red wine. **Experimental Clinical Cardiology**, v. 12, p. 5-10, 2007.

DAUGHERTY A. Mouse models of atherosclerosis. **Am J Med Sci**, v. 10, p. 323.

FERNÁNDEZ-MAR, M. I.; MATEOS, R.; GARCIA-PARRILLA, M.C.; PUERTAS, B.; CANTOS-VILLAR, E. Bioactive compounds in wine: resveratrol,

hydroxytyrosol and melatonin: A review. **Food Chemistry**, v. 130, p. 797-813, 2012.

FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; VILLAÑO, D.; TRONCOSO, A. M.; GARCIA-PARRILLA, M. C. Influence of enological practices on the antioxidant activity wines. **Food Chemistry**, v, 95, p. 394-404, 2006.

FÖRSTERMANN, U. Oxidative stress in vascular disease causes, defense mechanisms and potential therapies. **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**, v. 5, p. 338-349, 2008.

FONSECA, T. R. Una revision sobre atherosclerosis y ejercicio físico. **EFDeportes**, v. 17, p. 2-15, 2012.

FRANKEL, E.N. Lipid oxidation. Bridg water: **Oily Press**, v. 18, p. 391-349, 2005.

GÓES, F. J. Desenvolvimento e otimização do processo fermentativo para a produção do vinho branco a partir da uva Itália. 2005, Dissertação de Mestrado em Engenharia Química–Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

GIEHL, M.R.; DAL BOSCO, S.M.; LAFLOR, C.M.; WEBER, B. Efficacy of grape, red wine and grape juice flavonoids in the prevention and secondary treatment of atherosclerosis. **Scientia Medica**, v. 17, p. 145-155, 2007.

GRANATO, D. Associação entre atividade antioxidante *in vitro* e características químicas, sensoriais, cromáticas e comerciais de vinhos tintos Sul-Americanos. Tese de Doutorado. 2011, Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Universidade de São Paulo.

GUERRA, C.C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M.C.; CAMARGO, U.A. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos. Bento Gonçalves: **Embrapa Uva e Vinho**, p. 69, 2009.

HALLIWELL, B. Oxidants and human-disease-some new concepts. **FASEB Journal**, v. 1, p. 358-364, 1987.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press Inc.** N. Y. 3th ed, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radical in biology and medicine, 3 ed. **Oxford: Clarendon**, p. 936, 2000.

ISHIBASHI, S.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L.; GERARD, R.D.; HAMMER, R.E.; HERZ, J. 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.

KAUR, G.; ROBERTI, M.; RAUL, F.; PENDURTHI, U.R. Suppression of human monocyte tissue factor induction by red wine phenolics and synthetic derivatives of resveratrol. **Thrombosis Research**, v. 119, p. 247-256, 2007.

KELEBEK, H.; CANBAS, A.; SELLI, S.; SAUCIER, C.; JOURDES, M.; GLORIES, Y. Influence of different maceration times on the anthocyanins compositions of wines made from *Vitis vinifera* L. cvs Bogazkere and Öküzgözü. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 1012-1017, 2006.

KENNEDY, J. A.; SAUCIER, C.; GLORIES, Y. Grape and wine phenolics: history and perspectives. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, p. 239-248, 2006.

LAURINDO, F.R.M. Desequilíbrio redox, resposta vascular à lesão e aterosclerose. Endotélio e doenças cardiovasculares. **Atheneu**, cap. 9, p. 115-132, 2005.

LEE, J.; RENNAKER, C. Antioxidant capacity and stilbene contents of wines produced in the snake river valley of Idaho. **Food Chemistry**, v. 105, p. 195-203, 2007.

LISCUM, L.; UNDERWOOD, K.W. Intracellular cholesterol transport and compartmentation. **J Biol Chem**, v. 270, p. 15443-15446, 1995.

MADAMANCHI, N. R.; HAKIM, Z. S.; RUNGE, M. S. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. **J Thromb Haemost**, v.3, p. 254-267, 2005.

MARTELLI, A. Parhophysiological aspects of atherosclerosis and regular physical activity as non-pharmacological method in its control. **Rev. Saúde e Des.Hum**, v. 2, p. 41-52, 2014.

MATTOS, T. C. Mecanismo de ação antioxidante dos ácidos caféico e tânico em sistemas contendo ferro. Dissertação de Mestrado. Brasília. Universidade de Brasília, 2009.

MATTOS, T. C. Mecanismo de ação antioxidante dos ácidos caféico e tânico em sistemas contendo ferro. 2009, Dissertação de Mestrado-Universidade de Brasília.

MELO, G. W. Uvas Viníferas para o Processamento em Regiões de Clima Temperado. 2003. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/index.htm>>. Acesso em: 23/01/2018.

MITRA, S.; DESHMUKH, A.; SACHDEVA, R.; LU, J.; MEHTA, J.L. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy. **Am J Med Sci**. v.342, p.135-142, 2011.

MIYASHITA, K. Oxidation of long-chain polyunsaturated fatty acids: Lipid oxidation pathways. 2 ed. **Champaing: AOCS PRESS**, p. 55-76, 2008.

MORAES, V.; LOCATELLI, C. Vinho: uma revisão sobre a composição química e benefícios à saúde. **Evidência**, v. 10, p. 57-68, 2010.

MUKHERJEE, S.; DUDLEY, J.I.; DAS, D.K. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. **Dose Response**, v. 18, p. 478-500, 2010.

OHASHI, R.; MU, H.; YAO, Q.; CHEN, C. Cellular and molecular mechanisms of atherosclerosis with mouse models. **Trends Cardiovasc Med**, v. 14, p. 187-190.

OLIVEIRA, J. Efeito da hipercolesterolemia sobre a função cognitiva e a relação com a função mitocondrial e estresse oxidativo em cortex cerebral de camundongos deficientes para o receptor de LDL. 2012, Dissertação de Mestrado em Bioquímica-Universidade Federal de Santa Catarina.

OLIVEIRA, J.; HORT, M.A, MOREIRA, E.L.G.; GLASER, V.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M, PREDIGER, R.D.; FARINA, M.; LATINI, A.; DE BEM, A.F. Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: Relevance of cortico-cerebralmitochondrial dysfunction and oxidative stress. **Neuroscience**, v. 197, p. 99-106, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Doenças Cardiovasculares. Disponível em:

http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doençascardiovasculares&Itemid=839. Acesso em: 06/03/2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Sistema de información estadística de la OMS (WHOSIS). Disponível em: <http://www.who.int/research/es/>. Acesso em: 19/02/2018.

ORGANIZATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET DU VIU. Internationale Norm für Etikettierung von Weineu, Paris, 2015.

PAZZINI, C.E.F. Efeito antioxidante do vinho Tannat produzido em Itaqui (RS) sobre o estresse oxidativo em modelo de hiperglicemia. 2012, Dissertação de Mestrado em Bioquímica-Universidade Federal do Pampa.

PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phenolics profiles of Andean purple corn (Zeamay L.). **Food Chemistry**, v. 100, p. 956-963, 2007.

PENNA, N.G.; HECKTHEUER, L.H.R. Vinho e Saúde: uma revisão. **Infarma**, v. 16, p. 64-67, 2004.

PFRIEGER, F.W. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, p. 1158-1171, 2003.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. Vitivinicultura Brasileira: Panorama Setorial em 2010. 2011. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/livro/vitivinicultura.pdf>>. Acesso em: 12/01/2018.

RIBEIRO, M.E.M.; MANFROI, V. Vinho e Saúde: uma visão química. **Rev. Brasileira de Viticultura e Enologia**, v. 2, p. 91-93, 2010.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. 2. ed. **England: John Wiley & Sons**, v. 2, 2006.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. Tratado de enología: química del vino, estabilización y tratamientos. **Hemisferio Sur**, v. 2, 2003.

RIZZON, L. A.; ZANUZ, M. C.; MANFREDINI, S. Como elaborar vinho de qualidade na pequena propriedade. 2. ed. Bento Gonçalves: **Embrapa**, 1996.

RIZZON, L.A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Cabernet Sauvignon para a elaboração de vinho tinto. **Ciênc. Tecnol. Alim**, v. 22, p. 192-198, 2002.

ROCHE, L.D.; SÁNCHEZ, G.M. El estrés oxidativo en la enfermedad cardiovascular: evidencias para un tratamiento más integral. Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. V. 21, p. 214-222, 2013.

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

SACALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073-2085, 2000.

SACCHI, K. L.; BISSON, L. F.; ADAMS, D. O. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 56, p. 197-206, 2005.

SCHERR, C.; RIBEIRO, J. P. Cholesterol and fats in brazilian foods: Implications for prevention of atherosclerosis. **Arq Bras Cardiol**, v. 92, p. 190-195, 2009.

SANTOS, M. C. B.; VIEIRA, J. A. M.; CÉSAR, B. N.; NOVAES, M. R. C. G. Habits and socioeconomic profile of the atherosclerosis patient in Brazil. **Com Ciências Saúde**, v. 22, p. 247-256, 2011.

SILVA, P. C.; TORRES, F. Hypercolesterolemia and development atherosclerosis literature review. **FAEMA**, v. 6, p. 48-58, 2015.

SARMENTO, M.B. Diagnóstico da fertilidade de vinhedos da Campanha Gaúcha através de amostragem do solo. Disponível em: <<http://www13.unipampa.edu.br/anais-siepe/atual/art1795.html>>. Acesso em: 20/01/2018.

SAUTTER, C.K, DENARDIN, S.; ALVES, A.O.; MALLMANN, A.; PENNA, N.G.; HECKTHEUER, L.H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 437-442, 2005.

SIEMANN, E.H.; CREASY, L.L. Concentration of the Phytoalexin resveratrol in wine. **Am. J. Enol. Vitic**, v. 43, p. 49–52, 1992.

SOARES FILHO, P.R.; CASTRO, I.; STAHLSCHMIDT, A. Efeito do vinho tinto associado ao exercício físico no sistema cardiovascular de ratos espontaneamente hipertensos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 96, p. 277-283, 2011.

SOLEAS, G.J.; DIAMANDIS, E.P.; GOLDBERG, D.M. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. **J Clin Lab**, v. 11, p. 287-313.

SOUZA, G.G.; MENEGHIN, L.O.; COELHO, S.P.; MAIA, J.F.; SILVA, A.G. A uva roxa, *Vitis vinífera* L. (Vitaceae)–seus sucos e vinhos na prevenção de doenças vasculares. **Natureza on-line**, v. 4, p. 80-86, 2006.

SOYLEMEZ, S.; SEPICI, A.; AKAR, F. Resveratrol Supplementation Gender Independently Improves Endothelial Reactivity and Suppresses Superoxide Production in Healthy Rats. **Cardiovasc. Drugs Ther**, v. 23, p. 449-458, 2009.

STECHER, G.; HUCK, C. W.; POPP, H.; BONN, G. K. Determination of flavonoids and stilbines in red wine and related biological products by HPLC and HPLC-ESI-MS-ME. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 371, p. 73-80, 2001.

STEINBERG, D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. **Nat Med**, v. 8, p. 1211-1217, 2002.

STYKAL, J.; REMMEN, H. V.; RICHARDSON, A.; SALMON, A. B. Oxidative stress and diabetes: What can we learn about insulin resistance from antioxidant

mutant mouse models? **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 52, p. 46-58, 2012.

VANNUCHI, H.; MOREIRA, E. A. M.; CUNHA, D.F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M. V. M.; BERNARDES, M.M.; JORDÃO-JR, A.A. Role of nutrientes on lipid peroxidation and antioxidante defense system. **Medicina**, v. 31, p. 31-44, 1998.

ZADELAAR, S.; KLEEMANN, R.; VERSCHUREN, L.; DE VRIES-VAN DER WEIJ, J.; VAN DER HOORN, J.; PRINCEN, H.M.; KOOISTRA, T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, p. 1706-1721, 2007.

ZOCHE, R. G. S. Potencial enológico de uvas Tannat Cabernet Sauvignon e Merlot produzidas no município de Bagé-RS. 2009, Dissertação de doutorado. Universidade Federal de Pelotas.

ANEXO I


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

 **CEUA**
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
Fone: (55)9911-8200, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 034/2017 - ADENDO

Título: Investigação da via das quinureninas em um modelo de Encefalomielite autoimune experimental em camundongos.

Data da aprovação: 09/08/2017

Período de vigência do projeto: 09/08/2019

Pesquisadores(a): Cristiano Ricardo Jesse

Campus: Itaqui

Telefone: (55) 99923-8767

E-mail: cristianoricardojesse@yahoo.com.br

CEUA

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongos C57BL/6
Nº de animais	40 + 40 (acrécimo)
Peso/idade	20 - 22 g / 18 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério da Universidade Federal de Pelotas


Prof. Dr. Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA