

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU
MESTRADO EM NEUROLOGIA

**Efeitos da suplementação de Decilubiquinona em ratos
espontaneamente hipertensos com propensão à
isquemia cerebral (SHRSP)**

LEONARDO BORGES MURAD

PROF.DR.LUCIA MARQUES ALVES VIANNA

Orientadora

Rio de Janeiro, RJ-Brasil

Dezembro/2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU
MESTRADO EM NEUROLOGIA

**Efeitos da suplementação de Decilubiquinona em ratos
espontaneamente hipertensos com propensão à
isquemia cerebral (SHRSP)**

LEONARDO BORGES MURAD

*Dissertação apresentada ao término do
Curso de Pós-Graduação Stricto-sensu
em Neurologia, Área de Concentração
Neurociências, do Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde da Universidade
Federal do Estado do Rio de Janeiro -
UNIRIO, como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre.*

PROF.DR.LUCIA MARQUES ALVES VIANNA

Orientadora

Rio de Janeiro, RJ-Brasil

Dezembro/2007

FICHA CATALOGRÁFICA

616.8 Murad, Leonardo Borges,
M972e Efeitos da suplementação de Decilubiquinona em ratos espontaneamente hipertensos com propensão à isquemia cerebral (SHRSP). Rio de Janeiro, 2007.

XIV, 45f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucia Marques Alves Vianna.

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Mestrado em Neurologia, 2007.

1. Decilubiquinona. 2. AVE. 3. Hipertensão. I. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. II. Vianna, Lucia Marques Alves.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU
MESTRADO EM NEUROLOGIA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE DECILUBIQUINONA EM RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS COM PROPENSÃO À ISQUEMIA
CEREBRAL (SHRSP)**

LEONARDO BORGES MURAD

Dissertação de Mestrado

Dissertação defendida e aprovada em _____ de _____ de 2007, pela
comissão julgadora:

Professora Dra. Lucia Marques Alves Vianna
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Professora Dra. Regina Papais Alvarenga
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Professor Dr. Gilson Telles Boaventura
Universidade Federal Fluminense - UFF

Conceito:.....

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os acadêmicos e pesquisadores do país que superam as dificuldades impostas pelas condições sócio-econômicas da nação com brilhantismo e astúcia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter me permitido atingir minhas metas acadêmicas e pessoais. Aos meus pais, ao meu irmão, e a minha namorada, Isabele Bringhenti, pelo suporte, dedicação, amor e compreensão em momentos difíceis. Aos meus amigos, que me ajudaram a superar grandes obstáculos e sempre estiveram ao meu lado.

Agradeço também a todos os amigos do laboratório, em especial à Marcela Guimarães e à Rafael Braune de Castro pelo apoio técnico-científico na confecção desta dissertação e companheirismo no cotidiano laboratorial.

À Professora Regina Papais Alvarenga, por todo seu idealismo e perseverança na construção de um curso de mestrado de tão alta qualidade.

E finalizando meus agradecimentos, dirijo minha imensa gratidão, apreço, respeito e carinho à minha orientadora, Prof. Dr. Lucia Marques Vianna, que iluminou meu caminho científico com sua sabedoria e conhecimento.

À todos o meu sincero Obrigado.

“Pelos erros dos outros, o homem sensato corrige os seus.”

Oswaldo Cruz

RESUMO

Estudos recentes têm descrito que os fatores de risco para o desenvolvimento do acidente vascular encefálico (AVE) estão intimamente ligados ao estresse oxidativo. A decilubiquinona, uma análoga da coenzima Q10 com propriedades antioxidantes, pode ser um efetivo agente neuroprotetor, porém estudos in vivo que comprovem suas ações ainda são escassos. Assim, 12 ratos machos, espontaneamente propensos ao AVE (SHRSP), com 8 semanas de idade, pesando entre 195-220g, foram divididos em tratados e controles (n=6, cada). O grupo tratado recebeu 10mg/Kg/peso de decilubiquinona e o grupo controle recebeu apenas o veículo de diluição. Foram avaliados: parâmetros biológicos gerais (peso corpóreo, diurese, ingestão de água e ração) pressão arterial sistólica, glicemia, condições neurológicas (através de testes de memória, equilíbrio, força e sensório-motores), perfil lipídico e níveis de malondialdeído. Na análise dos dados, utilizou-se o teste ANOVA two-way e o teste t de Student. Para ambos $p < 0,05$ foi considerado significativo. Os resultados deste estudo indicaram um decréscimo significativo na pressão arterial no grupo tratado, a partir da 1ª semana de tratamento ($218,95 \pm 1,0$ vs. $224 \pm 1,41$), seguindo a redução até a última semana. Houve redução também nos níveis de malondialdeído do grupo tratado em relação aos controles ($2,83 \pm 0,64$ nmol vs. $4,55 \pm 0,12$ nmol). No perfil lipídico, ocorreu redução nos níveis de colesterol total e LDL-colesterol e aumento do HDL-colesterol. Contudo, os níveis de triglicerídeo, a glicemia e os parâmetros biológicos e neurológicos não sofreram alterações. Estes achados apontam a decilubiquinona como um novo agente antihipertensivo, hipolipidêmico e antioxidante que pode ser útil na modulação dos fatores de risco do acidente vascular encefálico.

ABSTRACT

Recent studies had described that risk factors to stroke development are intimately linked to oxidative stress. Decylubiquinone, a coenzyme Q10 analog with antioxidants proprieties, can be a neuroprotector effective agent, however, *in vivo* studies that proves the beneficial actions still are scarce. Thus, 12 male rats, spontaneously propense to stroke (SHRSP), with 8 weeks of age, weighting between 195-220g, were divided in: treated and control (n=6, each). Treated group received 10mg/Kg/body weight of decylubiquinone and the control group received just the dilution vehicle. We evaluated: biological parameters (body weight, diuresis, food and water intake), systolic blood pressure, glucose blood levels, neurological conditions (memory, equilibrium, strength and motor-sensory test), lipidic profile and malondialdehyde levels. On the data analysis, we utilized the ANOVA two-way test and Student t test. For both $p < 0.05$ was considered significative. The results of this study leaded a blood pressure significative decrease, starting in 1^a week of treatment (218.95 ± 1.0 vs. 224 ± 1.41 mmHg), following this reduction until the last week. There was also reduction on the malondialdehyde levels in the treated groups in relation to control group (2.83 ± 0.64 nmol vs. 4.55 ± 0.12 nmol). On the lipidic profile, we observed a reduction of total cholesterol and LDL-cholesterol and an increased of HDL-cholesterol levels. Although, triglycerides levels, blood glucose levels, biological and neurological parameters did not suffered alteration. These findings leaded the decylubiquinone like a new antihypertensive, hypolipidemic and antioxidant which can be useful on the control of risk factors of stroke.

LISTA DE ABREVIATURAS

AVE – Acidente vascular encefálico

CT- Colesterol Total

dUb- Decilubiquinona

ERO- Espécies reativas de oxigênio

HDL- High Density Lipoprotein

LCAT - lecitina-colesterol acil transferase

LDL- Low Density Lipoprotein

MDA - Malondialdeído

PPTM - permeabilidade dos poros de transição mitocondrial

SHRSP – stroke-prone spontaneously hypertensive rat

TG - Triglicerídeo

VLDL – Very Low Density Lipoprotein

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	página
Figura 1. Rato SHRSP.....	7
Figura 2. Reação de Haber-Weiss.....	8
Figura 3. Fórmula estrutural da Decilubiquinona.....	12
Figura 4. Fórmula estrutural da Coenzima Q10.....	12
Esquema 1. Representação da distribuição dos grupos tratados e controle...	14
Figura 5. Gavagem do Rato SHRSP.....	14
Figura 6. Aferição da pressão arterial por pletismografia.....	16
Figura 7. Teste cognitivo.....	17
Figura 8. Plano Inclinado.....	18
Figura 9. Barra de equilíbrio.....	18
Figura 10. Viga de equilíbrio.....	19
Figura 11. Termo-sensório-motor.....	20
Figura 12. Representa a média \pm DP da pressão arterial sistólica de ratos SHRSP tratados (n=6) com decilubiquinona (10mg/Kg/peso corpóreo) comparados aos ratos controle (n=6). *p<0,05 quando comparado ao grupo controle.....	26
Figura. 13 Representa a média \pm DP dos níveis de malondialdeído de ratos SHRSP tratados (n=6) com decilubiquinona (10mg/Kg/peso corpóreo) comparados aos ratos controle (n=6) após 4 semanas de experimentação. *p<0,05 quando comparado ao grupo controle.....	27

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 1. Representa a média \pm DP do peso corporal, diurese e ingestão de água e ração de ratos SHRSP tratados (n=6) com decilubiquinona (10mg/Kg/peso corpóreo) comparados aos ratos controle (n=6).....	23
Tabela 2. Representa a média \pm DP da glicemia de ratos SHRSP tratados (n=6) com decilubiquinona (10mg/Kg/peso corpóreo) comparados aos ratos controle (n=6).....	23
Tabela 3. Representa a média \pm DP dos exames neurológicos de ratos SHRSP tratados (n=6) com decilubiquinona (10mg/Kg/peso corpóreo) comparados aos ratos controle (n=6).....	24
Tabela 4. Representa a média \pm DP do perfil lipídico de ratos SHRSP tratados (n=6) com decilubiquinona (10mg/Kg/peso corpóreo) comparados aos ratos controle (n=6), após 4 semanas de experimentação. *p<0,05 quando comparado ao grupo controle.....	27

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral	3
2.2	Objetivo Específico	3
3.	REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1	Acidente vascular encefálico e Fatores de Risco	4
3.2	Modelo SHRSP	5
3.3	Estresse Oxidativo	7
3.4	Estresse Oxidativo, Antioxidantes e AVE	9
3.5	Decilubiquinona	11
4	METODOLOGIA	13
4.1	Animais	13
4.2	Condições Ambientais	13
4.3	Suplementação	13
4.4	Parâmetros Avaliados	15
4.4.1	Análise parâmetros biológicos gerais.....	15
4.4.2	Pressão Arterial Sistólica.....	15
4.4.3	Glicemia.....	16
4.4.4	Testes Neurológicos.....	16
	<u>Comportamento</u>	17
	<u>Teste cognitivo (teste de memória – labirinto)</u>	17
	<u>Plano Inclinado</u>	17
	<u>Barra de equilíbrio (tempo de agarre das patas)</u>	18

<u>Viga de equilíbrio</u>	19
<u>Teste Sensório-motor</u>	20
4.4.5 Sacrifício e coleta de material.....	20
4.4.6 Marcador de Estresse Oxidativo.....	21
4.4.7 Perfil lipídico.....	21
4.5 Análise Estatística	22
5. RESULTADOS	23
6. DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

O acidente vascular encefálico (AVE) é um dos maiores problemas de saúde pública nos países da América Latina e do Caribe (LAVADOS et al, 2007). A Organização Mundial de Saúde (OMS), tem estimado que entre 1990 a 2020 haverá no mundo um aumento na mortalidade pelo acidente vascular encefálico de 78% em mulheres e 106% em homens (HUANG, 2007).

Contudo, apesar das perspectivas mundiais, estudos apontaram que no Brasil houve um declínio da mortalidade por AVE nas regiões sul, sudeste e centro-oeste. No entanto, na região nordeste do país foi relatado um aumento da mortalidade por esta enfermidade (DE SOUZA et al, 2006). Independentemente dos casos fatais, o AVE é uma doença prevalente no país e os sobreviventes requerem uma reabilitação prolongada e cuidados crônicos, sendo os tratamentos efetivos limitados (LEE et al, 2003).

Dentro deste quadro, é importante o entendimento etiopatológico da doença e a prevenção dos fatores de risco. De acordo com GOLDMANN e AUSIELLO (2005) a hipertensão é o fator de risco mais importante do AVE podendo aumentar em quatro vezes a ocorrência da enfermidade. Outros achados ainda indicam o diabetes, a obesidade e a hipercolesterolemia como importantes fatores influenciadores do processo do AVE (NOVÁK et al, 2003).

Adicionalmente, estudos recentes indicaram que o estresse oxidativo pode estar envolvido com o acidente vascular encefálico e com seus fatores de risco (VAZIRI, 2004). Na realidade, o cérebro é um grande consumidor de oxigênio do corpo e a atividade das enzimas antioxidantes parece ser

relativamente baixa. Isso contribui para que o cérebro seja alvo do dano oxidativo e explica como o estresse oxidativo poderia estar envolvido na gênese de doenças neurológicas agudas ou crônicas (VIANNA, 2005).

Em adição, Nanetti et al (2007), descreveram que a atividade antioxidante do plasma poderia ser um importante fator de proteção cerebral. Interessantemente, algumas evidências têm indicado os efeitos benéficos dos nutrientes antioxidantes em isquemias cerebrais (IKEDA et al, 2003), com possibilidades de combinar terapias incluindo estas substâncias, nas fases aguda e convalescente do AVE (ALEXANDROVA e BOCHEV, 2005), sendo até mesmo utilizados no tratamento dos fatores de risco ligados a doença (DE CHAMPLAIN et al, 2004).

Em relação a isso, tem sido demonstrado que a decilubiquinona (dUb), ubiquinona análoga da coenzima Q10, apresenta, *in vitro*, resultados favoráveis com relação à inibição do estresse oxidativo. Estudos ainda afirmaram, que a decilubiquinona poderia ser usada futuramente para o tratamento de várias doenças relacionadas aos danos oxidativo (ARMSTRONG et al, 2003). Entretanto, apesar de resultados prósperos em estudos prévios, é escasso o estudo desta substância *in vivo* e de suas possibilidades terapêuticas nos fatores de risco do AVE.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos da administração de decilubiquinona, na modulação dos fatores de risco do AVE em ratos SHRSP.

2.2 Objetivo Específico

Investigar a ação da decilubiquinona sobre:

- Parâmetros biológicos gerais (peso, diurese, ingestão de água e ração);
- Pressão arterial sistólica;
- Indicadores de estresse oxidativo;
- Perfil lipídico sérico;
- Parâmetros de função neurológica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Acidente vascular encefálico e Fatores de Risco

O termo acidente vascular encefálico é geralmente preferido para designar um grupo de doenças que apresentam início abrupto e provocam danos neurológicos. Aproximadamente 85% dos acidentes vasculares encefálicos são causados pelo início súbito de inadequação de fluxo sanguíneo em alguma parte ou em todo o cérebro, e são denominados acidentes vasculares isquêmicos. Os acidentes vasculares encefálicos restantes são divididos em hemorragia no tecido cerebral (hemorragia parenquimatosa) e hemorragia nos espaços que circundam o cérebro, mais freqüentemente o espaço subaracnóideo (GOLDMAN E AUSIELLO, 2005).

Adicionalmente, a inadequada oferta de oxigênio ou de glicose para o cérebro inicia uma cascata de eventos que finalmente resulta em infarto. A gravidade do insulto, definida pelo grau e pela duração do fluxo sanguíneo reduzido, hipóxia ou hipoglicemia, determina se o cérebro apresenta apenas uma disfunção temporária, como um ataque isquêmico transitório; lesão irreversível de apenas alguns poucos neurônios mais vulneráveis (necrose seletiva); ou infarto cerebral, no qual o dano ocorre em áreas extensas envolvendo todos os tipos de células (GOLDMAN E AUSIELLO, 2005).

No que se refere aos fatores de risco para a ocorrência do acidente vascular encefálico destacam-se: a hipertensão arterial sistêmica, a dislipidemia, o diabetes mellitus, a coronariopatia, a fibrilação atrial e a estenose de carótidas (NOVÁK et al, 2003). Outros fatores de risco potenciais

incluem a inatividade física, a obesidade, a intolerância à glicose, dietas e utilização de altas doses de contraceptivos (BRONNER et al, 1995).

Estudos ainda apontaram que o excesso de produção de radicais livres após o AVE isquêmico e hemorrágico contribui para o dano cerebral (MARGAILL et al, 2005; CHERUBINI et al, 2005). Evidências recentes indicaram que a isquemia cerebral desencadeia uma complexa cascata de eventos metabólicos que envolvem a geração de radicais livres de oxigênio e nitrogênio. Estes radicais podem mediar uma série de danos que ocorrem após os ataques isquêmicos transitórios, e na região de penumbra infartada causada por isquemias permanentes (LOVE, 1999).

Interessantemente, os fatores de risco responsáveis pela ocorrência do AVE são ocasionados com grande frequência pelo estresse oxidativo. Corroborando com esta afirmativa, Vaziri (2004), relatou que estresse oxidativo, hipertensão e inflamação estão intimamente relacionados com o progressivo dano de um órgão-alvo. Em outro estudo, Singh & Mehta (2003), apontaram que o aumento do estresse oxidativo é conhecido como um importante aspecto da aterosclerose hipercolesterolêmica, cujo processo está interligado com o AVE.

3.2 Modelo SHRSP

Os ratos SHRSP (stroke-prone spontaneously hypertensive rat), são animais espontaneamente hipertensos com propensão ao acidente vascular encefálico e são normalmente utilizados como modelos animais para estudo de disfunção endotelial, hipertensão e acidente vascular encefálico (MC BRIDE et

al., 1995; MICHIHARA et al, 2002). Segundo Yamori et al (1976), o uso destes animais como modelos de AVE, mimetizando a enfermidade em humanos é plausível pela semelhança nos locais de infarto cerebral entre as espécies no córtex e nos gânglio basais.

O surgimento desta linhagem remonta ao final da década de 50 (1959), quando os ratos da linhagem normotensa, Wistar Kyoto (WKY), que começavam a apresentar pressão arterial elevada, eram isolados de sua linhagem e reproduzidos com ratos que apresentavam esta mesma característica. Então, a partir de 1971, uma nova linhagem foi estabelecida e utilizada para estudos de hipertensão arterial: a linhagem SHR (Spontaneously Hypertensive Rats). Assim, através de cruzamentos não seletivos de SHR originou-se em 1974, a linhagem espontaneamente propensa ao AVE: os ratos SHRSP (OKAMOTO et al, 1974).

A linhagem SHRSP apresenta uma sensibilidade aumentada à isquemia e ao volume de infarto cerebral quando comparados com ratos normotensos (Wistar). Segundo Carswell et al (1999), a reduzida circulação colateral cerebral entre a artéria cerebral média e anterior e as artérias posteriores, se deve ao reduzido diâmetro das mesmas e a falta de capacidade de dilatação, promovendo assim, a suscetibilidade ao AVE. Outras evidências ainda demonstraram os altos valores de glutamato encontrados nos SHRSP quando comparados aos ratos normotensos, reforçando assim, a maior sensibilidade ao AVE por essa linhagem.

Em adição, os ratos SHRSP apresentam valores pressóricos próximos a 250 ± 15 mmHg na 8ª semana de vida e 300 ± 15 mmHg na 18ª semana. Em

contraste, a linhagem SHR apresenta 180 ± 10 mmHg na 12ª semana e os ratos da linhagem Wistar apresentam 140 ± 5 mmHg desde a 6ª até a 30ª semana de vida (VIANNA LM, 1992; FUKUDA et al, 2004). Alguns autores ainda relataram que os SHRSP machos têm uma vida curta (entre 33 e 41 semanas), apresentando consideráveis acidentes vasculares cerebrais plurifocais (ZS-NAGY I et al, 1989).

Estes animais também apresentam geração aumentada de ânions superóxidos e radicais hidroxilas (KISHI et al, 2004), sendo esta produção excessiva de radicais livres associada à manutenção da hipertensão (MCINTRE et al, 1997).



Figura 1. Rato SHRSP

3.3 Estresse Oxidativo

A oxidação é um processo bioquímico de perda de elétrons associado com outro de recepção chamado redução. Este processo é importante, pois, está diretamente envolvido na produção de energia celular (ELEJALDE, J.I. 2001). Contudo, a ação de agentes oxidativos em moléculas biológicas é

conhecida como estresse oxidativo, sendo este, um distúrbio no estado de equilíbrio dos sistemas pró-oxidantes/antioxidantes em células intactas (SHILS et al, 2003).

Os radicais livres, agentes oxidativos, são espécies químicas reativas que diferem de outros componentes por terem elétrons desemparelhados nos seus orbitais externos (SOUTHORN & POWIS, 1988), podendo ocorrer em formas orgânicas e inorgânicas (FREEMAN & CRAPO, 1982). Os radicais de oxigênio (ânion superóxido, radical hidroxila e radicais peróxi), as espécies reativas de oxigênio não-radical, como o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete, bem como os radicais de carbono, nitrogênio e enxofre compreendem esta variedade de moléculas que pode constituir um estresse oxidativo em células (CARDENAS,1989; SLATER, 1984).

A reação em cadeia de processos produtivos de espécies reativas de oxigênio foi primeiramente mencionada por Haber e Willstatter em 1931. Em 1949, Weiss aceitou a reação proposta, desde então conhecida como reação de Haber-Weiss (Figura 1) (KOPPENOL, 2001).

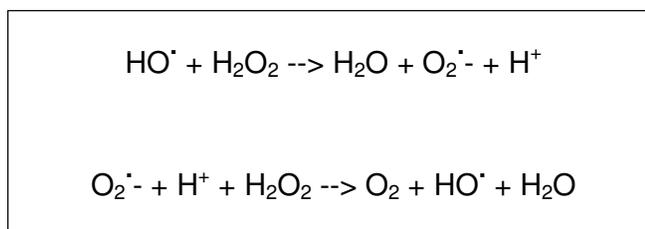


Figura 2. Reação de Haber-Weiss

Em 1968, Mc Cord e Fridovich demonstraram que a xantina-oxidase é uma enzima essencial para catalisar a produção de espécies reativas de oxigênio (MC CORD E FRIDOVICH, 1968). Em seguida, no ano de 1969, estes

autores apresentaram, a superóxido dismutase, como inativadora de oxirradicais e indicaram que esta enzima é largamente distribuída entre organismos mamíferos (MC CORD E FRIDOVICH, 1969).

Evidências ainda afirmaram que nas células animais, os radicais livres promovem alterações estruturais importantes. As hidroxilas (OH⁻) podem reagir com carboidratos abstraindo aleatoriamente um átomo de hidrogênio a partir de um dos átomos de carbono, produzindo um radical centrado no carbono (SHILS et al, 2003). Esta reação resulta em quebras de cadeias de importantes moléculas. O mesmo acontece às proteínas que apresentam muitos sítios reativos e podem ser danificadas durante o estresse oxidativo. Radicais livres muito agressivos como hidroxila (OH⁻) podem fragmentar também proteínas no plasma. (WOLFF & DEAN, 1986). Outra molécula afetada é o ácido nucléico, cuja estimativa prevê que o dano oxidativo ao DNA, em humanos, corresponda a 104 impactos por célula ao dia (FRAGA et al, 1990).

Os lipídios por sua vez, ao serem oxidados caracterizam a peroxidação lipídica, processo em que os lipídios poliinsaturados, constituintes importantes de membranas celulares, são oxidados (GARDNER, 1989). Este processo constitui uma reação em cadeia iniciada por radical e que se autopropaga em membranas celulares. Conseqüentemente, eventos oxidativos isolados podem apresentar efeitos profundos na função da membrana (WITZ, 1989).

3.4 Estresse Oxidativo, Antioxidantes e AVE

O estresse oxidativo, promovido pela reação entre moléculas biológicas e radicais livres, é capaz de provocar danos a componentes celulares e

produzir evidências que sugerem a possível contribuição deste processo em várias doenças (SOUTHORN & POWIS, 1988). Estudos recentes demonstraram que a intolerância à glicose, a resistência à insulina e o diabetes têm sido correlacionados com processos oxidativos (DE CHAMPLAIN; WU, 2004).

De acordo com Singh & Mehta (2003), os antioxidantes têm demonstrado reduzir a extensão da progressão da aterosclerose em experimentos animais, e em alguns estudos em humanos. Outros autores sugerem que o tratamento crônico com apropriada terapia antioxidante poderia prevenir o desenvolvimento da hipertensão bem como suas complicações (DE CHAMPLAIN & WU, 2004). Em harmonia com esta idéia, estudos sobre terapias antioxidantes indicaram um impacto benéfico na sensibilidade à insulina (EVANS & MADDUX, 2005).

Segundo CHANG et al (2007), o AVE pode ser associado com aumentada produção de radicais livres (especificamente radicais hidroxilas e ânion superóxido), alta peroxidação lipídica e baixas defesas enzimáticas antioxidantes. Assim, antioxidantes podem desempenhar importantes papéis, tendo alguns, comprovada atuação nas células ao proteger da oxidação os ácidos graxos insaturados, as proteínas e o DNA (IKEDA et al, 2003).

Estudos ainda revelaram que após a isquemia cerebral seguida de reperfusão ocorre um rápido aumento na produção de marcadores de estresse oxidativo e as defesas antioxidantes endógenas são rapidamente depletadas permitindo o dano ao tecido cerebral (GARIBALLA et al 2002).

Em adição, os antioxidantes têm sido descritos como agentes neuroprotetores, eficazes na redução de danos cerebrais em isquemias e reperfusão (IKEDA, 2003).

3.5 Decilubiquinona

A Decilubiquinona (2,3-Dimetoxi-5-metil-6-decil-1,4-benzoquinona), é uma quinona análoga da coenzima Q10 (2,3-dimetoxi, 5-metil, 6-decaprenil benzoquinona), com peso molecular cerca de cinco vezes menor do que esta coenzima, sendo ainda hidrofóbica, lipossolúvel e localizada na superfície da membrana mitocondrial, tendo a presença de hidrocarbonetos de cadeia lateral, criticamente envolvidos em processos antioxidantes (ARMSTRONG et al, 2003).

Esta ubiquinona pode promover a inibição da permeabilidade dos poros de transição mitocondrial (PPTM) e evidências ainda demonstraram que este poro pode ser um mediador de morte celular programada, em um processo no qual a mitocôndria é envolvida através da liberação de citocromo C e de outras proteínas indutoras de apoptose celular (WALTER et al, 2000). Por sua vez, a morte celular como um resultado de necrose e apoptose é envolvida com doenças cardíacas incluindo isquemias cardíacas, cardiomiopatia, hipertensão, aterosclerose e insuficiência cardíaca congestiva (DAS & MAULIK, 2005).

Comparativamente, a coenzima Q10 (CoQ10), forma predominante de ubiquinona nos seres humanos, é uma quinona que age como um carreador de elétrons na cadeia de transporte mitocondrial (HARGREAVES, 2003; HODGSON & WATTS, 2003). Desta forma, está intimamente relacionada com

a produção de energia, desempenhando também a função de antioxidante na membrana mitocondrial interna e em outras membranas celulares (KONTUCH, 1997; MENKE, 2003). Estudos ainda relataram que concentrações adequadas de coenzima Q10 nos tecidos podem ser importantes por limitar o dano oxidativo e nitrosativo *in vivo*. Outras evidências demonstram que baixas concentrações de coenzima Q 10 no sangue e tecidos têm sido reportadas em uma série de doenças (HARGREAVES, 2003; HODGSON & WATTS, 2003). Entretanto, alguns estudos indicaram que a coenzima Q 10 falhou ao demonstrar efeitos benéficos em casos clínicos e em vários parâmetros do metabolismo oxidativo (BERBEL-GARCIA, 2004).

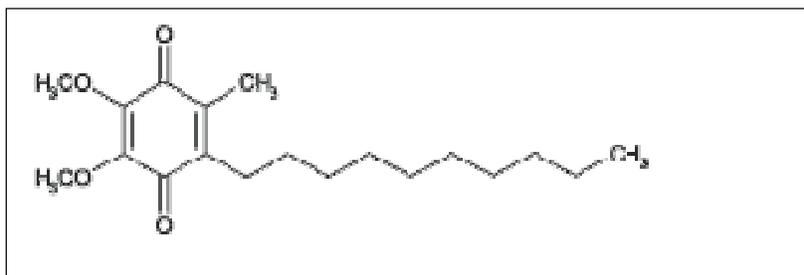


Figura 3. Fórmula estrutural da Decilubiquinona.

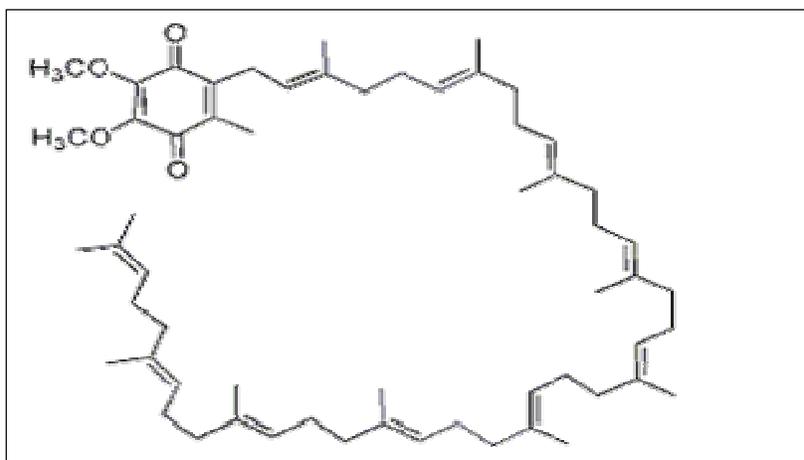


Figura 4. Fórmula estrutural da Coenzima Q10.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados doze ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem SHRSP, machos, com oito semanas de vida, pesando entre 170-220g, obtidos de colônias mantidas pelo Biotério da Escola de Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). Os procedimentos foram realizados de acordo com os guias convencionais para experimentação com animais (NIH Publication No. 85-23, revisado 1996). Todo o processo experimental foi conduzido no Laboratório de Investigação em Nutrição e Doenças Crônico-Degenerativas (LINDCD) e em seu respectivo biotério, ambos pertencentes à Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

4.2 Condições Ambientais

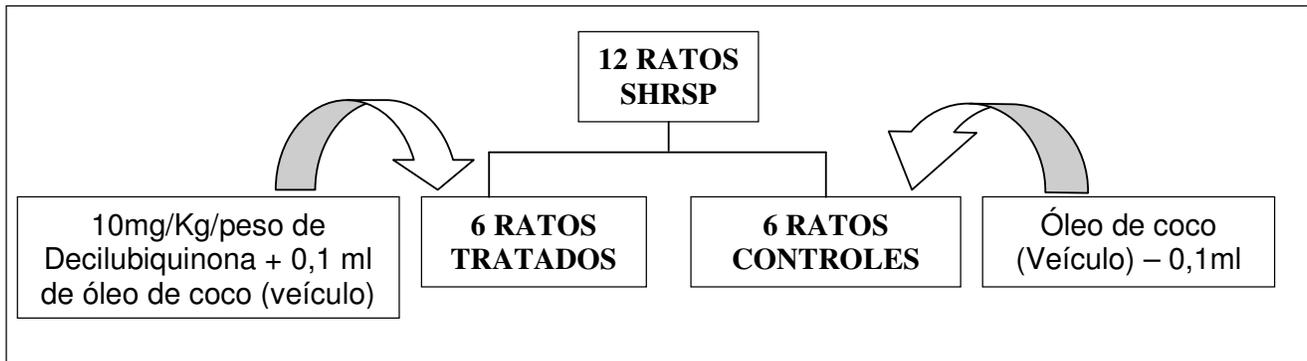
Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais em biotério com condições controladas de temperatura ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($60 \pm 10\%$), ciclo claro/escuro de 12h cada (luzes artificiais, 7:00am. – 7:00pm) e ciclo de exaustão de ar (15min/h), recebendo ração (Nuvilab from Nuvital Co) e água *ad libitum*.

4.3 Suplementação

Todos os ratos foram mantidos em período basal de 10 dias antes do início dos experimentos. Em seguida, os ratos foram separados em 2 grupos de seis animais cada: grupo tratado e grupo controle (Esquema 1).

O grupo tratado recebeu doses de 10mg/Kg/peso corpóreo de Decilubiquinona (D-7911 Sigma[®], EUA) diluído em 0,1 ml de óleo de coco, e o grupo controle recebeu apenas o veículo na mesma ordem de quantidade. A escolha da dose utilizada mimetizou a metodologia de estudos realizados com Coenzima Q10 previamente descritos por Danysz et al (1994) e Modi et al (2006).

Todos os animais foram tratados diariamente durante 4 semanas por gavagem oral através de sonda polietileno PE 190.



Esquema 1. Representação da distribuição dos grupos tratados e controle.



Figura 5. Gavagem do Rato SHRSP

4.4 Parâmetros Avaliados

4.4.1 – Análise parâmetros biológicos gerais

A partir do primeiro dia de período basal, os animais foram avaliados diariamente. Os parâmetros biológicos aferidos foram: peso corporal, diurese, ingestão de água e ração. Ainda foram observados os aspectos físicos: condições de pelagem e mucosa dos animais.

4.4.2 – Pressão Arterial Sistólica

A pressão sistólica foi aferida através de pletismógrafo (Bio-oficina[®], Brasil), mensurada duas vezes na semana, seguindo metodologia de William (1983) modificada por Vianna (1992). O modo de funcionamento do aparelho é descrito a seguir: o animal tem a cauda introduzida no pletismógrafo, então a artéria caudal posicionada no mesmo, sofre uma pressão externa, proporcionada pela água impulsionada no aparelho, que colaba suas paredes cessando o fluxo sanguíneo; ao promover a descompressão lentamente no manguito, a pressão sanguínea atinge um nível suficiente para forçar um jato de sangue que será registrado como pressão sistólica, e que será lida na coluna líquida do aparelho que se modificou mediante a alteração de volume. A mensuração da pressão sanguínea é feita três vezes em cada rato, minimizando possíveis vieses. Após a medição utiliza-se a média simples para obtenção do resultado final da pressão arterial do animal avaliado. As aferições foram realizadas mantendo-se sempre o mesmo horário para evitar alterações decorrentes do ritmo circadiano.

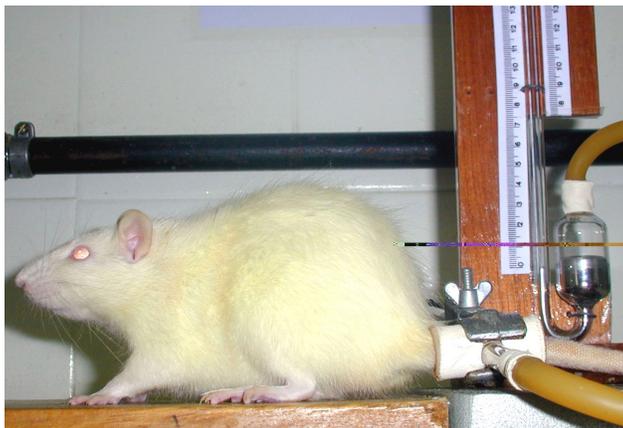


Figura 6. Aferição da pressão arterial por pletismografia

4.4.3 – Glicemia

A avaliação da glicemia teve início no período basal e terminou ao final do experimento. Os animais ficavam 4 horas em jejum, então tinham suas caudas friccionadas levemente no sentido base da cauda até a extremidade da mesma. Em seguida, comprimia-se a extremidade da cauda aplicando uma agulha perfurante estéril com vistas a puncionar o sangue caudal. Assim, uma fita própria do kit de glicemia era embebida em uma gotícula de sangue do animal e logo após introduzida no equipamento (AccuCheck, Roche®, Alemanha). O aparelho realizava a análise e a leitura dos valores era realizada. Este parâmetro era avaliado uma vez por semana.

4.4.4 - Testes Neurológicos

Todos os testes neurológicos foram realizados desde o período basal até o final do experimento e realizados no Laboratório de Investigação em Nutrição e Doenças Crônico-Degenerativas (LINDCD). Os animais foram

submetidos à avaliação neurológica através de testes de força, equilíbrio, sensório-motores e cognitivos.

Comportamento

Os animais foram observados diariamente, visando investigar mudanças na docilidade animal, característica da espécie estudada, decorrentes de ataques isquêmicos transitórios e/ou AVE.

Teste cognitivo (teste de memória – labirinto)

O teste cognitivo consiste em testar a habilidade do rato em percorrer o trajeto de um labirinto, o qual cria a necessidade de armazenamento de memória, através de um mapa cognitivo (FUJIMOTO et al, 2004). A resposta ao teste é aferida pela medição do tempo utilizado para completar todo o percurso (Figura 7).



Figura 7. Teste cognitivo

Plano Inclinado

Neste teste os animais eram colocados num plano reto na posição horizontal, com a cauda voltada para o lado oposto em que a tábua seria suspensa. Com isso, promovíamos o levantamento da tábua em posição

vertical girando sobre seu próprio eixo visando ao final uma volta de 180°, testando a força e equilíbrio do animal (Figura 8). A avaliação seguia os seguintes padrões: Grau 0: o rato não caía da rampa quando girada; Grau 1: o animal escorrega ou cai a 30°; Grau 2: o rato cai ou escorrega a 90°; Grau 3: o rato cai ou escorrega a 180° (ABOU-DONIA et al, 2002).



Figura 8. Plano Inclinado

Barra de equilíbrio (tempo de agarre das patas)

A barra de equilíbrio consiste numa estrutura de madeira com 5mm de diâmetro, cuja função era avaliar o tempo em que o animal conseguiria suportar seu próprio peso através da força da pata dianteira ao colocá-lo segurando na barra (Figura 9). O tempo em que os ratos levavam segurando a barra era cronometrado (ABOU-DONIA et al, 2002).



Figura 9. Barra de equilíbrio

Viga de equilíbrio

A função deste teste é avaliar globalmente a função vestibulomotora e cerebelar do equilíbrio. Desta forma, o animal era colocado em uma estreita viga de madeira com dimensões 1,5cm de largura e aproximadamente 1m de altura (Figura 10). De acordo com Fujimoto et al (2004), os animais com lesões cerebrais podem ser capazes de ficar na viga por mais de 60 segundos, mas podem assumir posturas que são diferentes de animais normais, como abraçar a viga ou se equilibrar com as patas dependuradas para se sustentar (FUJIMOTO et al, 2004). Assim, foi estipulado o tempo de 60 segundos para que o animal permanecesse na viga. Se os animais conseguissem a marca estipulada era anotado o valor de 60 segundos, caso ele caísse antes do tempo delimitado o valor de tempo correspondente era anotado.



Figura 10. Viga de equilíbrio

Teste sensório-motor

Este teste avalia a resposta sensório-motora do animal através da exposição da cauda do rato a uma superfície quente. Esta avaliação baseia – se na introdução da cauda do animal em água à 70°C, que segue o princípio do *Hot Plate Analgesia Meter (San Diego Instruments)*, adaptado ao Laboratório

de Investigação em Nutrição e Doenças Crônico-Degenerativas para ser utilizado diariamente sem representar danos físicos aos animais. Com a introdução da cauda na água, a medição da resposta ao calor era realizada através da aferição do tempo em que o animal promovia o movimento brusco da cauda (Figura 11).



Figura 11. Termo-sensório-motor

4.4.5 – Sacrifício e coleta de material

O sacrifício dos animais ocorreu ao final dos experimentos quando foi induzido o coma profundo, via éter sulfúrico inalatório, e administração de barbitúrico (tiopental sódico) via intraperitoneal com doses superiores a 25 mg/kg. Em seguida, os animais eram fixados através das patas em posição dorsal para a realização de uma esterno-laparotomia com ampla abertura das cavidades torácica e abdominal, permitindo a punção cardíaca retirando-se, em média, 5 ml de sangue para dosagem de malondialdeído (MDA) e perfil lipídico. Esse procedimento também permitiu a remoção do fígado para a medição de seu peso usando o método de Scherle (1970). Este método consiste na pesagem dos órgãos suspensos por um fio e imersos em um becher contendo

solução salina, evitando ainda o contato do órgão com as paredes da vidraria, a fim de se evitar erro na aferência. Assim, este sistema é montado sobre uma balança analítica calibrada (0,001g), e o volume de líquido deslocado pelo órgão é registrado sendo igual ao peso do mesmo.

4.4.6 – Marcador de Estresse Oxidativo

Para realização da dosagem dos níveis de malondialdeído utilizou-se o soro, obtido a partir da centrifugação do sangue colhido em tubo descartável sem anticoagulante durante o sacrifício do animal. O sangue foi processado em centrífuga CELM modelo Kombat (aferição e calibração Control-Lab) a 3500rpm por 15 minutos. O soro foi separado dos componentes celulares pela centrifugação e retirado do tubo primário por pipetagem com ponteiras descartáveis, sendo acondicionado em tubos secundários, identificados e estéreis. O soro foi conservado em refrigerador com temperatura controlada de 8°C. Foi utilizado o método colorimétrico para a dosagem de MDA, utilizando o equipamento Micronal B442; a concentração de malondialdeído foi calculada pela absorção a 532nm e os resultados expressos em nmol.

4.4.7 – Perfil lipídico

Foram avaliados o colesterol total, HDL-colesterol e triglicerídeos séricos através de ensaio enzimático. Os níveis de LDL-colesterol foram calculados pela fórmula de Friedewald: $LDL = CT - HDL - (TG/5)$.

4.5 Análise Estatística

Foi realizado o teste estatístico ANOVA Two-Way para avaliar a diferença dos resultados obtidos de peso corpóreo, diurese, ingestão de água e ração, pressão arterial sistólica, glicemia e testes neurológicos durante toda a experimentação entre tratados e controles. Para a análise estatística dos resultados referentes ao perfil lipídico e malondialdeído utilizou-se o teste t de Student comparando os controles e os tratados ao final do experimento. O software utilizado foi o Graph Pad Prism[®] 4.0 version for Windows[®] (Graph Pad Software, Estados Unidos) e o valor $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

Os animais tratados e controles apresentaram um aumento sucessivo do peso corpóreo desde o início até o final do experimento, contudo, esta alteração não foi significativa (Tabela 1). A avaliação dos parâmetros diurese, ingestão de água e ração também não identificou alterações significativas entre os grupos tratado e controle (Tabela 1). Em adição, a análise dos valores das medições de glicemia não apresentou diferença estatística entre grupos (Tabela 2).

Tabela 1. Representa a média \pm DP do peso corporal, diurese e ingestão de água e ração de ratos SHRSP tratados (n=6) com decilubiquinona (10mg/Kg/peso corpóreo) comparados aos ratos controle (n=6).

Período	Grupo	Peso (g)	Diurese(ml)	Água (ml)	Ração (g)
Basal	Decilubiquinona	176,33 \pm 18,42	3,96 \pm 1,25	25,38 \pm 4,12	15,33 \pm 1,28
	Controle	152,95 \pm 2,35	2,04 \pm 0,54	22,14 \pm 1,88	17,95 \pm 0,29
1ª Semana	Decilubiquinona	187,75 \pm 7,74	2,39 \pm 1,04	28,25 \pm 1,50	16,42 \pm 1,04
	Controle	165,04 \pm 6,04	1,64 \pm 0,61	22,54 \pm 1,86	15,52 \pm 0,51
2ª Semana	Decilubiquinona	194,29 \pm 9,37	3,09 \pm 1,31	30,53 \pm 1,58	19,57 \pm 0,20
	Controle	172,46 \pm 19,25	4,96 \pm 3,44	25,73 \pm 4,60	16,53 \pm 0,83
3ª Semana	Decilubiquinona	205,14 \pm 11,45	5,21 \pm 0,78	29,32 \pm 2,18	18 \pm 1,39
	Controle	194,19 \pm 19,62	5 \pm 2,57	31,71 \pm 4,08	17,71 \pm 1,33
4ª Semana	Decilubiquinona	219,39 \pm 15,17	5,02 \pm 1,47	29,86 \pm 3,43	17,03 \pm 1,21
	Controle	197,57 \pm 18,10	3,14 \pm 1,44	28,38 \pm 1,03	15,57 \pm 3,13

Tabela 2. Representa a média \pm DP da glicemia de ratos SHRSP tratados (n=6) com decilubiquinona (10mg/Kg/peso corpóreo) comparados aos ratos controle (n=6).

	Basal	1ª Semana	2ª Semana	3ª Semana	4ª Semana
Decilubiquinona	74 \pm 3,16	74 \pm 2,94	74 \pm 4,24	71,75 \pm 1,70	71,5 \pm 3,10
Controle	73,3 \pm 4,50	74,6 \pm 1,52	71,6 \pm 1,52	74,3 \pm 1,53	77,67 \pm 1,53

Na análise dos resultados dos testes neurológicos, não foram observadas mudanças no comportamento dos animais sendo mantida sua docilidade. Em relação ao teste de plano inclinado, ambos os grupos apresentaram, desde o período basal, equilíbrio e força necessários para completar o teste. Entretanto, no teste do labirinto, foi observado uma queda gradual no tempo em que os ratos tratados percorriam o trajeto, porém, na comparação com os ratos controles os animais suplementados com decilubiquinona demoraram mais tempo para realizar o percurso, mas sem significância estatística entre grupos (Tabela 3). Similarmente, os testes com a barra de equilíbrio não apresentaram diferença estatística entre os grupos tratado e controle (Tabela 3).

No teste da viga de equilíbrio, desde o período basal todos os animais alcançaram o tempo mínimo pré-determinado, portanto, não houve diferença nos valores registrados (Tabela 3). Na avaliação do teste sensório-motor, houve uma aproximação dos resultados entre grupos, ainda observando-se um decréscimo nos valores à medida que as semanas avançaram. Igualmente aos testes anteriores, não houve diferença significativa entre grupos (Tabela 3)

Tabela 3. Representa a média \pm DP dos exames neurológicos de ratos SHRSP tratados (n=6) com decilubiquinona (10mg/Kg/peso corpóreo) comparados aos ratos controle (n=6).

Período	Grupo	Memória	Barra de Equilíbrio	Viga de Equilíbrio	de Teste Sensório-motor
Basal	Decilubiquinona	0'25"20 \pm 0'09"22	0'11"65 \pm 0'03"67	1'00"00 \pm 0'00'00	0'00"65 \pm 0'00"08
	Controle	0'29"81 \pm 0'04"42	0'14"35 \pm 0'04"84	1'00"00 \pm 0'00'00	0'00"63 \pm 0'00"08

Tabela 3. Representa a média \pm DP dos exames neurológicos de ratos SHRSP tratados (n=6) com decilubiquinona (10mg/Kg/peso corpóreo) comparados aos ratos controle (n=6). CONTINUAÇÃO

Período	Grupo	Memória	Barra de Equilíbrio	Viga de Equilíbrio	Teste Sensorio-motor
1ª Semana	Decilubiquinona	0'20"86 \pm 0'04"21	0'12"91 \pm 0'04"48	1'00"00 \pm 0'00'00	0'00"60 \pm 0'00"09
	Controle	0'18"78 \pm 0'03"93	0'18"78 \pm 0'03"93	1'00"00 \pm 0'00'00	0'00"54 \pm 0'00"03
2ª Semana	Decilubiquinona	0'19"98 \pm 0'06"75	0'16"53 \pm 0'02"44	1'00"00 \pm 0'00'00	0'00"53 \pm 0'00"07
	Controle	0'11"24 \pm 0'02"96	0'11"24 \pm 0'02"95	1'00"00 \pm 0'00'00	0'00"47 \pm 0'00"03
3ª Semana	Decilubiquinona	0'18"14 \pm 0'03"92	0'14"14 \pm 0'02"76	1'00"00 \pm 0'00'00	0'00"52 \pm 0'00"03
	Controle	0'11"41 \pm 0'02"71	0'11"40 \pm 0'02"02	1'00"00 \pm 0'00'00	0'00"44 \pm 0'00"13
4ª Semana	Decilubiquinona	0'17"20 \pm 0'03"61	0'11"94 \pm 0'04"2	1'00"00 \pm 0'00'00	0'00"42 \pm 0'00"08
	Controle	0'11"41 \pm 0'02"71	0'09"20 \pm 0'02"28	1'00"00 \pm 0'00'00	0'00"56 \pm 0'00"03

Por outro lado, no que se refere à pressão arterial sistólica, a partir da primeira semana de suplementação, houve uma atenuação significativa ($p < 0,05$) nos animais tratados quando comparado aos controles ($218,95 \pm 1,0$ vs. $224 \pm 1,41$ mmHg). Esta redução significativa foi repetida na 2ª semana ($216,70 \pm 0,76$ vs. $225,94 \pm 1,64$ mmHg), 3ª semana ($214,71 \pm 0,18$ vs. $226,22 \pm 0,79$ mmHg) e ao final do experimento ($214,21 \pm 0,83$ vs. $226,22 \pm 0,47$ mmHg). Contudo, na 3ª semana podemos observar, no grupo tratado uma estabilização na redução da pressão arterial mantida até o final do experimento. Em relação aos controles, a estabilização começa a ocorrer na 2ª

semana de experimentação, porém, diferentemente do grupo tratado há um aumento significativo da pressão arterial sistólica em torno de $225,94 \pm 1,64 \text{ mmHg}$ a $226,22 \pm 0,47 \text{ mmHg}$ (Figura 12).

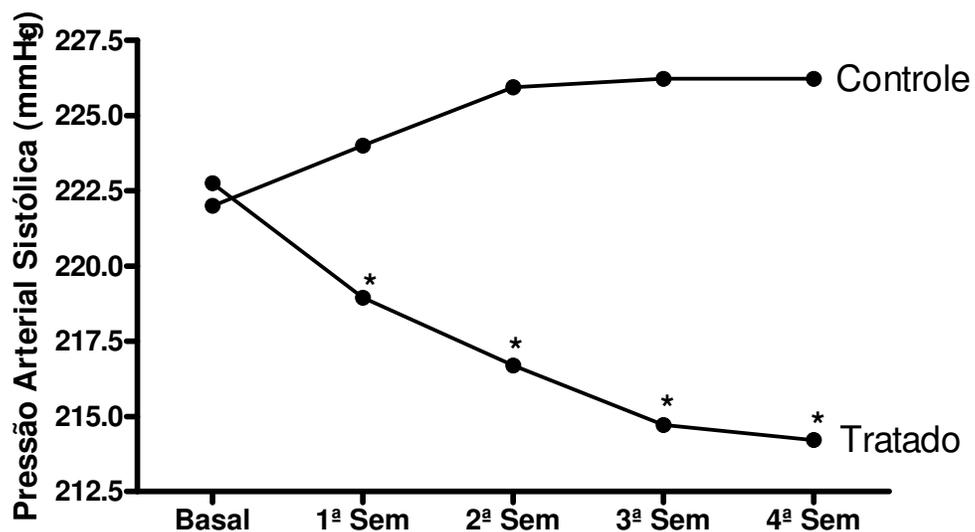


Figura 12. Representa a média \pm DP da pressão arterial sistólica de ratos SHRSP tratados ($n=6$) com decilubiquinona ($10 \text{ mg/Kg/peso corpóreo}$) comparados aos ratos controle ($n=6$) * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

No que se refere ao estresse oxidativo, a dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico revelou que os níveis de malondialdeído foram significativamente ($p < 0,05$) menores nos ratos tratados com decilubiquinona ($2,83 \pm 0,64 \text{ nmol}$) em comparação com os animais do grupo controle ($4,55 \pm 0,12 \text{ nmol}$). Este efeito pode ser facilmente visualizado na figura 13.

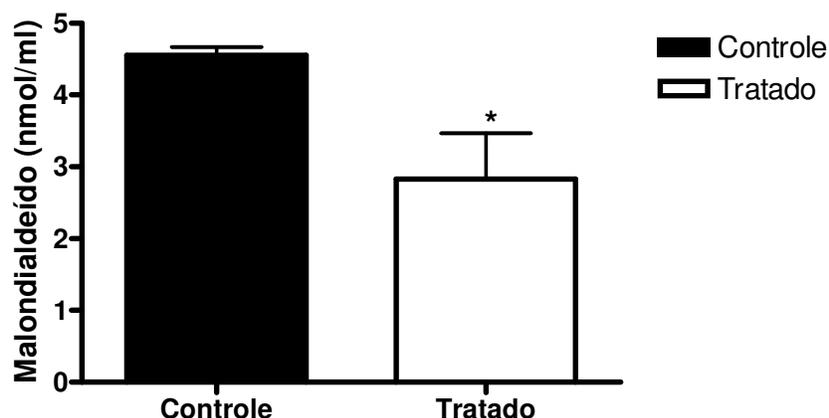


Figura 13. Representa a média \pm DP dos níveis de malondialdeído de ratos SHRSP tratados (n=6) com decilubiquinona (10mg/Kg/peso corpóreo) comparados aos ratos controle (n=6) após 4 semanas de experimentação. *p<0,05 quando comparado ao grupo controle.

Em relação ao perfil lipídico do grupo suplementado com decilubiquinona, os ensaios enzimáticos revelaram uma redução significativa (p<0,05) nos níveis de colesterol total e LDL-colesterol e um aumento nos níveis de HDL-colesterol. Entretanto, na análise dos triglicerídeos os valores não apresentaram diferença estatística (Tabela 4)

Tabela 4. Representa a média \pm DP do perfil lipídico e da glicemia de ratos SHRSP tratados (n=6) com decilubiquinona (10mg/Kg/peso corpóreo) comparados aos ratos controle (n=6), após 4 semanas de experimentação. *p<0,05 quando comparado ao grupo controle.

Perfil Lipídico e Glicemia	Controle (n=6)	Tratado (n=6)
Colesterol total (mg/dl)	74,5 \pm 1,29	51 \pm 2,94*
LDL- colesterol (mg/dl)	37,5 \pm 3,54	21,45 \pm 3,49*
HDL- colesterol (mg/dl)	27 \pm 3,07	39,75 \pm 4,27*
Triglicerídeos (mg/dl)	50 \pm 2,63	46 \pm 6,68

No que diz respeito aos aspectos físicos, não foram observados alterações nas mucosas e pelagem dos animais tratados e controles. Em

adição, a pesagem dos fígados dos animais, pelo método de Scherle, indicou que não houve diferença estatística de peso entre os animais tratados e controles, respectivamente $6,3 \pm 0,45\text{g}$ vs. $5,8 \pm 0,42\text{g}$.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho confirmou a ação antioxidante da decilubiquinona, previamente observada *in vitro* por Armstrong et al (2003). O estudo supracitado demonstrou que células pré-expostas a agentes oxidantes e incubadas com decilubiquinona tiveram menor produção de substâncias reativas ao oxigênio.

Adicionalmente, os níveis de malondialdeído apresentaram uma importante redução no grupo tratado quando comparado ao grupo controle. Segundo Prático (2005), este efeito antioxidante pode ser associado ao decréscimo de pressão arterial pela redução dos níveis de radicais livres envolvidos na disfunção endotelial e hipertensão.

No que se refere a isso, a redução do estresse oxidativo foi um achado de grande impacto sobre a atenuação da hipertensão severa e no controle dos fatores de risco do acidente vascular encefálico na linhagem SHRSP (MURAD, et al 2007).

Em ensaios prévios com a coenzima Q10, Danysz et al, 1994, demonstraram a ação hipotensora desta ubiquinona, suplementada em ratos da linhagem SHR. Além disso, Modi et al (2006), apresentaram efeitos importantes da administração de coenzima Q10, via intraperitoneal, no perfil lipídico e no aumento da atividade da catalase em ratos Sprague-Dawley submetidos ao diabetes.

Okamoto et al (1991), também apresentaram resultados interessantes, após a suplementação de coenzima Q10 em ratos SHRSP, como a atenuação

da elevação da pressão arterial e a diminuição da degradação dos fosfolípidios de membrana.

Na realidade, a decilubiquinona tem uma cadeia de carbono lateral cinco vezes menor do que a coenzima Q10, o que provavelmente favorece uma melhor absorção e utilização fisiológica, detectada com a redução da pressão a partir da primeira semana de tratamento. Embasando esta teoria, pode-se citar Naccache e Sha'Afi (1973), que indicaram três critérios para determinação da permeabilidade através das membranas das células humanas: solubilidade lipídica, tamanho da molécula e a natureza química do soluto.

De uma forma geral, substâncias com propriedades antioxidantes atuam através de reação direta com radicais, promovendo a regeneração de outros antioxidantes ou controlando a formação de espécies reativas de oxigênio. Segundo Crane (2001), a coenzima Q10 pode regenerar o tocoferol e o ascorbato, bem como controlar a produção de peróxidos de hidrogênio. Modi et al (2006), ainda afirmaram que os efeitos benéficos promovidos pela coenzima Q10 podem ser decorrentes de sua propriedade antioxidante.

Em relação à decilubiquinona, Walter et al (2000) observaram que essa quinona também tem a capacidade de inibir a permeabilidade dos poros de transição mitocondrial (PPTM). Interessantemente, outros autores confirmaram estes achados (FONTAINE et al, 1998 MARTINUCCI et al, 2000; ARMSTRONG et al, 2003). Em estudos comparativos foi demonstrado que dentre as ubiquinonas, apenas a ubiquinona 0 e decilubiquinona promoveram a inibição da PPTM (FONTAINE et al, 1998).

A permeabilidade de transição é um aumento, *in vitro*, da permeabilidade mitocondrial da membrana interna permitindo a passagem de solutos com massa de até 1500 Da. Algumas hipóteses sugerem que a PPTM são canais intimamente envolvidos com a morte celular, devido ao aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, resultando em perda do potencial transmembrânico mitocondrial, promovendo o inchaço da organela e ruptura de membrana. Este poro quando ativado pode liberar citocromo C e ativar caspases promovendo o processo de apoptose. Existe também a possibilidade de perda de energia celular durante o rompimento da mitocôndria, o que resulta em necrose (ARMSTRONG et al, 2003). Segundo Walter et al (2000), a necrose e a apoptose geradas pela abertura desses poros podem estar diretamente envolvidas com a hipertensão.

Interessantemente, evidências demonstraram que a inibição da produção de espécies reativas de oxigênio pela decilubiquinona, bloqueou a permeabilidade dos poros de transição mitocondrial e inibiu a morte celular. Este fato indica que o efeito inibitório da decilubiquinona sobre a PPTM pode ser uma consequência da sua ação antioxidante, por prevenir a formação de ERO ou seqüestrar os EROs gerados pelo citocromo bc1 (ARMSTRONG, 2003). Assim, o efeito antioxidante e a posterior inibição da permeabilidade dos poros de transição, ambos providos pela suplementação de decilubiquinona, podem evitar a morte celular e prevenir a progressão da hipertensão.

No concernente ao perfil lipídico e a glicemia, a suplementação com decilubiquinona apontou uma redução do colesterol total e LDL-colesterol,

seguida de um aumento significativo do HDL-colesterol, sem alterar os níveis de glicose sanguínea e triglicerídeos séricos.

A alteração benéfica nos níveis de HDL-colesterol pode ser explicada pela propriedade antioxidante da decilubiquinona. Segundo McCall et al (1995), aldeídos derivados da peroxidação lipídica (acetaldeído, acroleína, hexanal, 4-hidroxinonenal, e malondialdeído), são poderosos inibidores da enzima lecitina-colesterol acil transferase (LCAT), que esterifica o colesterol livre em lipoproteína de alta densidade (HDL). Assim, a decilubiquinona ao reduzir os níveis de malondialdeído pode preservar a produção de HDL-colesterol pela inibição dos aldeídos provenientes do estresse oxidativo. Entretanto, os mecanismos que definem a redução do LDL-colesterol permanecem desconhecidos.

Por outro lado, a suplementação de decilubiquinona não apresentou diferença significativa na avaliação dos parâmetros biológicos: peso corpóreo, diurese, ingestão de água e ração entre os grupos tratado e controle. Resultados similares foram encontrados na suplementação com coenzima Q10 (MODI et al, 2006). Em adição, na análise dos testes neurológicos não houve alteração importante e estatisticamente significativa nos parâmetros cognitivos, sensório-motores e posturais em ratos suplementados e ratos controles. Concomitantemente, nenhum dos animais acompanhados apresentou modificações no comportamento.

No exame físico dos animais não foram demonstradas alterações observáveis na distribuição da pelagem e condições das mucosas e com relação à análise macroscópica do fígado, os valores encontrados na aplicação

do método de Scherle não apresentaram diferença significativa entre grupos. Estes fatos associados apontam para a segurança da utilização da decilubiquinona administrada *in vivo* nos modelos animais.

7. CONCLUSÃO

A suplementação de decilubiquinona em ratos espontaneamente hipertensos com propensão ao acidente vascular encefálico (SHRSP) provocou uma atenuação nos níveis de pressão arterial sistólica, colesterol total, LDL-colesterol e malondialdeído séricos. Adicionalmente, foi constatado um aumento significativo nos níveis de HDL-colesterol. Estas alterações promovidas pela decilubiquinona são provavelmente associadas à capacidade antioxidante desta droga. Assim, estes achados apontam a decilubiquinona como um novo agente anti-hipertensivo, hipolipidêmico e antioxidante que pode ser útil na modulação dos fatores de risco do acidente vascular encefálico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-DONIA, M.B.; DECHKOVSKAIA, A.M.; GOLDSTEIN, L.B. et al. Uranyl acetate-induced sensorimotor deficit and increased nitric oxide generation in the central nervous system in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.72, p.881-890. 2002.

ALEXANDROVA, M.L.; BOCHEV, P.G. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. **Free Radic Biol Med**, v. 39, p. 297-316, 2005.

ARMSTRONG, J.S.; WHITEMAN M.; ROSE P. et al. The Coenzyme Q10 analog decylubiquinone inhibits the redox-activated mitochondrial permeability transition: role of mitochondrial Complex III. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 49079-84, 2003.

BERBEL-GARCIA, A.; BARBERA-FARRE, J.R.; ETESSAM, J.P et al. Coenzyme Q 10 improves lactic acidosis, stroke like episodes, and epilepsy in a patient with MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke like episodes). **Clin Neuropharmacol**, v.27, p.187-91, 2004.

BRONNER, L.L.; KANTER, D.S.; MANSON, J.E. Primary prevention of stroke. **New England J. Med.**, v. 333, p. 1392-1400, 1995.

CARDENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annu Rev. Biochem.** v. 58, p.79-110, 1989.

CARLSWELL, H.V.O.; ANDERSON, N.H.; CLARK, J.S. et al. Genetic and gender influences on sensitivity to focal cerebral ischemia in the Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rat. **Hypertension**, v. 33, p.681-685, 1999.

CHANG, C.K.; CHANG, C.P.; LIU, S.Y.; LIN, M.T. Oxidative stress and ischemic injuries in heat stroke. **Prog Brain Res**. v.162, p.525-46, 2007.

CHERUBINI, A.; RUGGIERO, C.; POLIDORI, M.C et al. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radic Biol Med**, v. 39, n. 7, p. 841-52, 2005.

CRANE, F.L. Biochemical functions of coenzyme Q10. **J Am Coll Nutr**, v. 20, n.6, p. 591-8, 2001.

DANYSZ, A.; OLEDZKA, K; BUKOWSKA-KILISZEK, K. Influence of coenzyme Q-10 on the hypotensive effects of enalapril and nitrendipine in spontaneously hypertensive rats. **Pol J Pharamacol**, v. 46, n. 5, p.457-61, 1994.

DAS D.K., MAULIK N. Mitochondrial function in cardiomyocytes: target for cardioprotection. **Curr Opin Anaesthesiol**, v..18, p.77-82, 2005.

DE CHAMPLAIN, J.; WU, R.; GIROUARD, H. et al. Oxidative stress in hypertension. **Clin Exp Hypertens**, v. 26, n.7-8, p.593-601,2004.

DE SOUZA, M.F.M; ALENCAR, A.P.; MALTA, D.C. et al. Análise de Séries Temporais da Mortalidade por Doenças Isquêmicas do Coração e Cerebrovasculares, nas Cinco Regiões do Brasil, no Período de 1981 a 2001. **Arq Bras Cardiol**, v. 87, n. 6, p. 735-740, 2006.

ELEJALDE GUERRA, J.I. Oxidative stress, diseases and antioxidant treatment. **An Med Interna**, v.18, n.6, p.326-335, 2001.

EVANS, J.L; MADDUX, B.A.; GOLDIFINE, I.D. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistances. **Antioxid Redox Signal**, v.7, n.7-8, p. 1040-52, 2005.

FONTAINE, E.; ICHAS, F.; BERNARDI, P. A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. **J Biol Chem**. v.273, nº40, p. 25734-25740, 1998

FRAGA, C.G.; SHIGENAGA, M.K.; PARK, J.W. et al. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 12, p.4533-7, 1990.

FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Lab Invest**. v. 47, n.5, p.412-26, 1982.

FUJIMOTO, S.T; LONGHI, L.; SAATMAN, K.E et al. Motor and function evaluation following experimental traumatic brain injury. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, p. 365-378, 2004.

FUKUDA, S; TSUCHIKURA, S; IIDA, H. Age related changes in blood pressure, hematological values, concentrations of serum biochemical constituents and weights of organs in the SHR/lzm, SHRSP/lzm and WKY/lzm. **Exp Anim**, v. 53, n.1, p. 67-72, 2004.

GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. **Free Radic Biol Med**, v.7, n.1, p. 65-86, 1989.

GARIBALLA, S.E.; HUTCHIN, T.P; SINCLAIR, A.P et al. Antioxidant capacity after acute ischaemic stroke. **QJM**, n.10, p.685-90, 2002.

GOLDMAN, L; AUSIELLO D. Abordagem das Doenças Cerebrovasculares. **Cecil: Tratado de Medicina Interna**. 2ª Edição, São Paulo: Elsevier. 2005, p.2667-2668.

HARGREAVES, I.P. Ubiquinone: cholesterol's reclusive cousin. **Ann Clin Biochem**, v. 40, n.3, p.207-18, 2003.

HODGSON, J.M.; WATTS, GF. Can coenzyme Q10 improve vascular function and blood pressure? Potential for effective therapeutic reduction in vascular oxidative stress. **Biofactors**, v. 18, n. 1-4, p. 129-36, 2003.

HUANG, C.Y. Nutrition and stroke. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 16, Suplemento, p.266-74, 2007.

IKEDA K.; NEGISHI H.; YAMORI Y. Antioxidant nutrients and hypoxia/ischemia brain injury in rodents. **Toxicology**, n. 189, p.55-61, 2003.

KISHI, T.; HIROOKA, Y.; KIMURA, Y. et al. Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats; **Circulation**, v. 109, p. 2357-2362, 2004.

KONTUSH, A; REICH, A.; BAUM, K. et al. Plasma ubiquinol-10 is decreased in patients with hyperlipidaemia. **Atherosclerosis**, n.129, p.119-126, 1997.

KOPPENOL, W.H. The Haber-Weiss cycle--70 years later. **Redox Rep**, v. 6, n. 4, p.229-34, 2001.

LAVADOS, P.M; HENNIS, A.J.; FERNANDES, J.G. et al. Stroke epidemiology, prevention, and management strategies at a regional level: Latin America and the Caribbean. **Lancet Neurol**, v. 6, n.4, p.362-72, 2007.

LEE, C.D; FOLSOM, A.R.; BLAIR, S.N. Physical Activity and Stroke Risk : A Meta-Analysis. **Stroke**, n. 34, p.2475-2482, 2003.

LOVE, S. Oxidative stress in brain ischemia. **Brain Pathol.** v.9, n.1, p.119-31, 1999.

MARGAILL, I.; PLOTKINE, M.; LEROUET, D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. **Free Radic Biol Med**, v. 39, n. 4, p.429-43, 2005.

MARTINUCCI, S.; SZABÒ, I.; TÓMBOLA, F et al. Ca²⁺ – reversible inhibition of the mitochondrial megachannel by ubiquinone analogues. **FEBS**. v. 480, p.89-94, 2000.

MCCALL, M. R.; TANG, J. Y.; BIELICKI, J.K. et al. Inhibition of lecithin-cholesterol acyltransferase and modification of HDL apolipoproteins by aldehydes. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 15, p.1599-606, 1995.

MCCBRIDE, M.W.; BROSANAN, M.J.; MATHERS, J. et al. Reduction of *Gstm1* Expression in the Stroke-Prone Spontaneously Hypertension Rat Contributes to Increased Oxidative Stress. **Hypertension**, v. 45, p.786-792, 2005.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. The Reduction of Cytochrome c by Milk Xanthine Oxidase. **J Biol Chem**, v. 243, n. 21, p. 5753-5760, 1968.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein) . **J Biol Chem**, v. 244, n. 22, p. 6049-6065, 1969.

MCINTRE, M.; HAMILTON, C.; REES, D. et al. Sex difference in the abundance of endothelial nitric oxide in a model of genetic hypertension. **Hypertension**, v. 30, p.1517-1524, 1997.

MENKE, T.; GILLE, G.; REBER, F et al. Coenzyme Q10 reduces the toxicity of rotenone in neuronal cultures by preserving the mitochondrial membrane potential. **Biofactors**, v. 18, n. 1-4, p.65-72, 2003.

MICHIHARA, A.; SAWAMURA, M.; YAMORI, Y. et al. Comparison of subcellular distribution of mevalonate pyrophosphate decarboxylase between stroke-prone spontaneously hypertensive rat and wistar kyoto rat. **Biol Pharm Bull**, v. 25, p.734-737, 2002.

MODI, K.; SANTANI, D.D; GOYAL, R.K. Effect of coenzyme q10 on catalase activity and other antioxidant parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biol Trace Elem Res**, v. 109, n.1, p.25-34, 2006.

MURAD, L.B; GUIMARÃES, M.R.M; VIANNA, L.M. Effects of decylubiquinone (coenzyme Q10 analog) supplementation on SHRSP. **BioFactors** [In Press] 2008.

NACCACHE, P.; SHA' AFI, R.I. Patterns of nonelectrolyte permeability in human red blood cell membrane. **The Journal of General Physiology**. v.62, p.714-736, 1973.

NANETTI, L.; TAFFI, R.; VIGNINI, A. et al. Reactive oxygen species plasmatic levels in ischemic stroke. **Mol Cell Biochem**. 2007 [in press].

NÓVAK, E.M.; ZÉTOLA, V.H.F.; MUZZIO, J.A. et al. Conhecimento leigo sobre doença vascular encefálica. **Arq. Neuropsiquiatr**, v. 61, n.3-B, p. 772-776, 2003

OKAMOTO, H.; KAWAGUCHI, H.; TOGASHI, H. et al. Effect of coenzyme Q10 on structural alterations in the renal membrane of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Biochem Med Metab Biol**. v.45, n.2, p.216-26, 1991.

OKAMOTO, K.; YAMORI, Y.; NAGOAKA, A. Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Circ Res**, v.34(S1), p. I143-I153, 1974.

PRATICÒ, D. Antioxidants and endothelium protection: Review, **Atherosclerosis**, v. 181, p. 215-24, 2005.

SCHERLE, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. **Mikroskopie**, v. 26, n.1, p. 57-60, 1970.

SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. et al. Estresse oxidativo e defesa contra oxidantes. Tratado de Nutrição na Saúde e na Doença. 9ª Ed. São Paulo: Editora Manole 2003, p.801-811.

SINGH, B.M.; MEHTA, J.L. Interaction between renin-angiotensin system and dyslipidemia. **Arch. Intern. Med**, n.163, p.1296-1304, 2003.

SLATER, T.F. Free-radical mechanisms in tissue injury. **Biochem J**, v. 15, n.1, p. 1-15, 1994.

SOUTHORN, P.A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. **Mayo Clin Proc**. v.63, n.4, p.381-9, 1988.

VAZIRI, N.D. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.13, n.1, p.93-9, 2004

VIANNA, L.M. Efeito da administração crônica de vitamina D3 em ratos espontaneamente hipertensos. 1992. 107p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal do Estado de São Paulo, São Paulo.

VIANNA, L.M. O estresse oxidativo nas doenças neurológicas. Cadernos do Núcleo de Estudo e Pesquisa da Escola de Nutrição (NEPEN), nº 10, p. 47-49, 2005.

VIANNA, L.M; CASTRO, R.B. Manual de Fisiologia Experimental. Ed.Difusão, Rio de Janeiro, 2007, *in press*.

WALTER, L.; NOGUEIRA V.; LEVERVE, X. et al. Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site, **J BiolChem**, v. 275, p.29521-29, 2000.

WITZ G. Biological interactions of alpha, beta-unsaturated aldehydes.

Free Radic Biol Med. v. 7, n.3, p. 333-49, 1989.

WOLFF, S.P.; DEAN, R.T. Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. **Biochem J.** v.234, n.2, p.399-403, 1986.

YAMORI, Y.; HORIE, R.; HANDA, H. et al. Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. **Stroke.** v.7, n.1, p.46-53, 1976.

ZS-NAGY, I.; ZS-NAGY, V.; CASOLI, T. et al. The lack of age-pigments and the alterations in intracellular monovalent electrolytes in spontaneously

hypertensive, stroke-prone (SHRsp) rats as revealed by electron microscopy and X-ray microanalysis. **Adv Exp Med Biol.**v. 266, p.93-106, 1989.