

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO SUL DE
MINAS GERAIS – IFSULDEMINAS**

Angela Maria Martins

SUCO DE UVA: HIPOLIPEMIANTE E PROTETOR CARDÍACO

**Machado/MG
2019**

Angela Maria Martins

SUCO DE UVA: HIPOLIPEMIANTE E PROTETOR CARDÍACO

Dissertação apresentada ao IFSULDEMINAS, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia

**Machado/MG
2019**

M341s Martins, Angela Maria
Suco de uva: hipolipemiante e protetor cardíaco / Angela Maria
Martins. -- Machado: [s.n.], 2019.
36 p.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia.

Trabalho de Conclusão de Curso (pós-graduação) – Instituto
Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais
- Campus Machado.
Inclui bibliografia

1. Alimentos funcionais. 2. Dislipidemia. 3. Resistência insulínica. I
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Mi-
nas Gerais – Campus Machado. II. Título.

CDD: 613.2

Angela Maria Martins

SUCO DE UVA: HIPOLIPEMIANTE E PROTETOR CARDÍACO

Dissertação apresentada ao IFSULDEMINAS, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em de de 2019.

Profa. Dra. Brígida Monteiro Vilas Boas
IFSULDEMINAS – *Campus* Machado

Profa. Dra. Lidiane Paula Ardisson Miranda
Universidade José do Rosário Vellano –
UNIFENAS

Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia
IFSULDEMINAS – *Campus* Machado

Ao meu pai Paulo, à minha mãe Marlene e ao meu irmão Adriano, que nunca me deixaram desistir.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nunca me desamparou.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia, pelo apoio, incentivo e pelos valiosos ensinamentos.

À minha família, pela compreensão e suporte.

À equipe de trabalho, pela parceria.

Aos amigos que fiz no IFSULDEMINAS – *Campus* Machado, pelas experiências compartilhadas.

Aos Professores e à equipe do Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos do IFSULDEMINAS – *Campus* Machado, pela oportunidade de aprendizado profissional e crescimento pessoal.

Ao CNPq e à FAPEMIG, pelo suporte financeiro.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais e à Universidade José do Rosário Vellano pelo apoio na realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas contribuições.

“Porque todos aqueles que pedem, recebem. Aquelos que procuram, acham. E a porta será aberta a quem bate”.

Mateus 7:8

RESUMO

A utilização de alimentos funcionais parece ser uma estratégia favorável à prevenção de doenças. As uvas e seus derivados, vinhos e sucos são ricos em compostos bioativos, entre eles, os compostos fenólicos e seu consumo vem sendo associado a efeitos positivos na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares (DCV). O presente estudo analisou o efeito do suco de uva, cultivar Isabel (*Vitis labrusca* L.), na dislipidemia, na resistência insulínica e na HVE, em camundongos homozigotos, para a ausência do gene do receptor de LDL (LDLr^{-/-}), alimentados com dieta hiperlipídica. Foram utilizados 30 camundongos LDLr^{-/-} machos com 3 meses de idade, pesando 22±2g. Divididos em três grupos (n=10), Grupo HL recebeu ração hiperlipídica; Grupo HLU recebeu ração hiperlipídica e 2g/kg/dia de suco de uva; Grupo HLS recebeu ração hiperlipídica e 20mg/kg/dia de sinvastatina. Água e ração foram fornecidos “*ad libitum*”. Após 60 dias, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal, e o sangue foi coletado para as análises dos níveis séricos de glicose, insulina, proteína C reativa (PCR), triglicérides (TG), colesterol total (CT) e suas frações. Após a toracotomia, o coração foi removido e o ventrículo esquerdo (VE) foi separado, para as análises da proporção do peso ventricular (mg) pelo peso corporal (g), diâmetro dos cardiomiócitos, porcentagens de depósito de colágeno e da área imunorreativa para CD40L. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). A análise de variância (ANOVA), seguida do teste Tukey, foi utilizada para a comparação das médias que foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$. O uso dos animais e o protocolo experimental foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA–IFSULDEMINAS), sob o parecer nº 03/A 2014. O grupo HL, quando comparado aos grupos HLU e HLS, apresentou aumento dos níveis séricos de CT, LDLc e TG, acompanhado da redução dos níveis de HDLc, além disso, apresentou aumento dos níveis de insulina, resistência insulínica e HVE. O suco de uva apresentou resultados similares à sinvastatina, visto que preveniu o aumento de CT, LDLc, TG, insulina e resistência insulínica e, ainda, promoveu um aumento expressivo dos níveis de HDLc. A associação do poder antioxidante dos compostos fenólicos com o aumento dos níveis do HDLc, nos camundongos do grupo HLU, preveniu o desenvolvimento da HVE, uma vez que inibiu a resposta inflamatória ventricular induzida pela via CD40 e seu ligante CD40L. Esses efeitos podem ocorrer por diferentes mecanismos, prevenindo o depósito de colágeno no tecido ventricular, a HVE e o aumento dos níveis séricos de PCR. Em conclusão, o suco de uva é um hipolipemiante e protetor cardíaco, que apresentou efeito muito próximo ao da sinvastatina, prevenindo a resistência insulínica por ação antioxidante direta dos compostos fenólicos, ou indireta, via ação antioxidante e anti-inflamatória da molécula de HDLc, demonstrando ser um alimento funcional com potencial para prevenir doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: Resistência insulínica. Compostos fenólicos. Lipídios. Dislipidemia. Alimentos funcionais. *Vitis labrusca*.

ABSTRACT

The use of functional foods seems to be a favorable strategy for disease prevention. Grapes and their derivatives, wines and juices, are rich in bioactive compounds, among them phenolic compounds, and their consumption has been associated with positive effects in the prevention and treatment of cardiovascular diseases (CVD). The present study analyzed the effect of grape juice, cultivar Isabel (*Vitis labrusca* L.), in the dyslipidemia, insulin resistance and LVH on mice homozygous for the absence of the LDL receptor gene (LDLr - / -) fed with hyperlipidic diet. Thirty male LDLr - / - mice weighing 22 ± 2 g were used. Divided into three groups (n = 10), Group HL received hyperlipidic ration; Group HLU received hyperlipid ration and 2g / kg / day of grape juice; Group HLS received hyperlipid ration and 20mg / kg / day of simvastatin. Water and feed were provided "ad libitum". After 60 days the animals were anesthetized intraperitoneally and blood was collected for the analysis of serum levels of glucose, insulin, C-reactive protein (CRP), triglycerides (TG), total cholesterol (TC) and their fractions. After thoracotomy, the heart was removed and the left ventricle (LV) was separated for analysis of the ventricular weight ratio (mg) by body weight (g), cardiomyocyte diameter, percentages of collagen deposition and CD40L immunoreactive area. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test were used to compare the means that were considered significant when the value of $p < 0.05$. The use of the animals and the experimental protocol were approved by the Ethics Committee on the use of animals (CEUA-IFSULDEMINAS), according to the opinion n° 03/A 2014. The HL group, when compared to the HLU and HLS groups, presented increased levels serum levels of TC, LDLc and TG, accompanied by the reduction of HDLc levels, also showed increased levels of insulin, insulin resistance and LVH. The grape juice presented similar results to simvastatin, since it prevented the increase of TC, LDLc, TG, insulin and insulin resistance, still promoted an expressive increase of HDLc levels. The association of the antioxidant power of phenolic compounds with the increase of HDLc levels in HLU mice prevented the development of LVH as it inhibited the inflammatory response induced by the CD40 pathway and its CD40L ligand. These effects may occur through different mechanisms, preventing the deposition of collagen in ventricular tissue, LVH and increased serum levels of CRP. In conclusion, grape juice is a hypolipidemic and cardiac protector, which has a very close effect to that of simvastatin, preventing insulin resistance by direct antioxidant action of the phenolic compounds, or indirectly, via antioxidant and anti-inflammatory action of the HDLc molecule, proving to be a functional food with potential to prevent cardiovascular diseases.

Key words: Insulin resistance. Phenolic compounds. Lipids. Dyslipidemia. Functional food. *Vitis labrusca*.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	9
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Doenças cardiovasculares (DCV)	10
2.2 Dislipidemia	10
2.3 Estresse oxidativo e marcadores inflamatórios	11
2.4 Resistência insulínica	12
2.5 Hipertrofia Ventricular Esquerda (HVE)	14
2.6 Estatinas	15
2.7 Camundongos	16
2.8 Alimentos Funcionais	17
2.8.1 Suco de uva	18
2.8.2 Compostos fenólicos	19
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 2	27
ARTIGO 1 - Grape Juice Attenuates Left Ventricular Hypertrophy in Dyslipidemic Mice	27

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, as doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no mundo. Estima-se que 17,9 milhões de pessoas morreram por DCV em 2016 (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2017). Um importante fator de risco para seu desenvolvimento é a dislipidemia (LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002), além do estresse oxidativo (MADAMANCHI; VENDROV; RUNGE, 2005), da resistência insulínica, do aumento de marcadores inflamatórios (LUSIS, 2000) e da hipertrofia ventricular esquerda (HVE) (GARCIA et al., 2008).

O risco de desenvolvimento de DCV está relacionado diretamente com os níveis plasmáticos de lipoproteínas de baixa densidade colesterol (LDLc) e inversamente com a concentração de lipoproteínas de alta densidade colesterol (HDLc) (CASTELLI et al., 1977). Os inibidores da hidroximetilglutaril-coenzima-A redutase (HMG-CoA redutase), também conhecidos como estatinas, são o grupo de fármacos mais potentes e eficazes para reduzir o colesterol total (CT) e o LDLc (KASTELEIN et al., 2008). Entretanto pelo elevado custo desses medicamentos, a perspectiva de seu uso prolongado associado ao aparecimento de efeitos colaterais, torna-se importante a descoberta de tratamentos alternativos para o controle das dislipidemias (CALDERON et al., 2011).

Os alimentos funcionais, como a uva e seus derivados, são capazes de proporcionar benefícios à saúde, além das funções nutricionais básicas, por isso, seu consumo vem sendo associado ao risco reduzido de eventos coronários (GIEHL et al., 2007), ao aumento de antioxidantes e à defesa contra o estresse oxidativo (TOALDO et al., 2016). As uvas da espécie *Vitis labrusca* L. são ricas em compostos fenólicos, especialmente as antocianinas (RAMSAY et al., 2017), que são associadas a propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, inibição da oxidação do LDLc, diminuição dos riscos de DCV e de câncer (CARDOSO; LEITE; PELUZIO, 2011).

O objetivo deste trabalho foi analisar a influência do suco de uva, cultivar Isabel (*Vitis labrusca* L.), na dislipidemia, na resistência insulínica e na HVE, em camundongos hiperlipidêmicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças cardiovasculares (DCV)

As DCV lideram as causas de morte no mundo, segundo dados da Organização Mundial da Saúde e, preocupantemente, apesar dos avanços científicos e tecnológicos para seu combate, elas continuam apresentando aumento na sua incidência (WHO, 2017). Tais doenças são responsáveis por um número expressivo de mortalidade prematura em adultos e, mesmo quando não são mortais, podem levar à invalidez parcial ou total do indivíduo, repercutindo também na família e na sociedade (SIMÃO, 2002).

De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil, 300 mil pessoas sofrem infartos todos os anos, no entanto, 80% das ocorrências poderiam ser evitadas com hábitos saudáveis (BRASIL, 2017). O tabagismo, a má alimentação, o sedentarismo e o uso nocivo do álcool podem desencadear DCV, principalmente, em indivíduos com pressão arterial elevada, hiperglicemia, sobrepeso e obesidade (WHO, 2017).

As DCV têm origem multifatorial e seus fatores de risco estão divididos em não modificáveis e modificáveis. Os não modificáveis incluem a idade, sexo e a história familiar positiva para DCV, e os modificáveis incluem a dislipidemia, o diabetes, o tabagismo, o sedentarismo, a alimentação, a hipertensão arterial e a obesidade. A prevenção é realizada pelo controle dos fatores de risco modificáveis (PREDIGER, 2009).

2.2 Dislipidemia

A dislipidemia é um importante fator de risco, para o desenvolvimento de DCV (SANTOS et al., 2017) e é caracterizada pela presença de níveis elevados ou anormais de lipídios e/ou lipoproteínas e suas frações no sangue (BAYNES; DOMINICZAK, 2007). As dislipidemias podem ser classificadas em genótípicas e fenotípicas. As genótípicas são chamadas monogênicas (quando causadas por mutações em um só gene) e poligênicas (quando causadas por múltiplas mutações). As fenotípicas consideram os valores de colesterol total (CT), LDLc, triglicerídeos (TG) e HDLc e são divididas em quatro tipos: hipercolesterolemia isolada, hipertrigliceridemia isolada, hiperlipidemia mista e HDLc baixo (SPOSITO et al., 2007).

Os lipídios são moléculas gordurosas e, por isso, insolúveis no sangue, portanto, para percorrerem a circulação, precisam ser transportados por proteínas chamadas apoproteínas

que, ao se ligarem, formam as lipoproteínas (BAYNES; DOMINICZAK, 2007). Estas são responsáveis pelo transporte de colesterol no plasma sanguíneo e podem ser classificadas em cinco diferentes classes: quilomicrons, lipoproteínas de muito baixa densidade colesterol (VLDLc), lipoproteína de densidade intermediária colesterol (IDLc), LDLc e HDLc (SICCHIERI, 2012). Os quilomicrons transportam os lipídios provenientes da dieta aos tecidos periféricos e fígado; a LDLc transporta lipídios de síntese endógena do fígado aos tecidos periféricos, sendo a maior carreadora de colesterol para as células e seu aumento está associado ao início e à aceleração de processos inflamatórios cardiovasculares (FARRET, 2005; ISOSAKI; CARDOSO, 2004; PREDIGER, 2009); a HDLc é responsável pelo transporte reverso de colesterol, dos tecidos periféricos ao fígado, para ser excretado na bile (PREDIGER, 2009).

A LDL é subdividida em subespécies maiores e menos densas e menores e mais densas, que as diferenciam na susceptibilidade a modificações oxidativas e comportamento aterogênico (PRASSL; LAGGNER, 2009). A oxidação da partícula de LDL que ocorre, principalmente, por meio da peroxidação lipídica, está altamente relacionada ao desenvolvimento de DCV (HALLIWELL, 2000). A modificação da partícula de LDL *in vivo* envolve espécies reativas de oxigênio, produzidas por células endoteliais, macrófagos e algumas enzimas como: mieloperoxidases, lipoxigenases e hemeoxigenases 1 presentes na íntima da artéria (DAUGHERTY et al., 1994). Acredita-se que a oxidação da LDL ocorra na parede arterial e não na corrente sanguínea pela alta concentração de antioxidantes ali presentes (STEINBERG, 2009).

O papel protetor cardiovascular da HDLc é atribuído às suas atividades anti-inflamatória, antitrombótica e antioxidante, além do transporte reverso de colesterol (LEANÇA et al., 2010), ela remove o excesso de colesterol dos tecidos periféricos e também age inibindo a oxidação da LDL (STEINBERG, 2009). O acompanhamento dos níveis séricos de HDLc, em indivíduos dislipidêmicos, deve ser rigoroso, uma vez que sua redução pode facilitar o desenvolvimento de processos inflamatórios e oxidantes cardiovasculares e desenvolvimento da resistência insulínica com hiperinsulinemia (GARCIA et al., 2011).

2.3 Estresse oxidativo e marcadores inflamatórios

Dentre os mecanismos propostos sobre o papel dos lipídios na gênese das DCV, destaca-se a sua associação com o estresse oxidativo, um estado em que o excesso de espécies reativas supera o efeito dos sistemas antioxidantes (ALBUQUERQUE, 2014). O estilo de

vida sedentário, as dietas ricas em gorduras e fatores genéticos contribuem para o excesso da produção ou menor defesa de espécies reativas de oxigênio (EROs), no sistema vascular, ocasionando um estresse oxidativo, que tem papel fisiopatológico fundamental em diversas DCV (SANTOS, 2015).

Os radicais livres são átomos ou moléculas reativas que apresentam elétron desemparelhado, em sua órbita mais externa, resultando em instabilidade e conferindo uma característica reativa, de modo que o átomo precisa receber ou doar elétrons para se estabilizar (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015). Em condições fisiológicas normais, as EROs são consideradas agentes reguladores fundamentais, na sinalização celular, além de desempenhar um importante papel no crescimento e diferenciação celular, nas adaptações às tensões fisiológicas e metabólicas, na resposta imune, bem como na proteção contra a invasão de patógenos (PANIERI et al., 2013). No entanto, quando a produção de espécies reativas é exacerbada, causa danos ao DNA mitocondrial, oxidação de lipídios, açúcares e proteínas resultando em alterações na estrutura e funcionalidade celular (GOMES; SILVA; OLIVEIRA, 2012).

A combinação de processo inflamatório, disfunção endotelial e estresse oxidativo, no ambiente cardiovascular, é considerada o denominador comum dentre as condições que promovem e sustentam a hipertrofia cardíaca (GARCIA; INCERPI, 2008). Neste sentido, a proteína C reativa (PCR) tem sido o marcador de inflamação mais utilizado na prática clínica e considerado como fator de risco independente de DCV (RIDKER, 2003). Além disso, a interação entre a proteína CD40L e seu receptor CD40 também é um biomarcador inflamatório utilizado, para acompanhar a evolução das DCV, uma vez que essa interação está relacionada com o desenvolvimento da aterosclerose (HENN et al., 1998), da síndrome coronariana aguda (VISHNEVETSKY; KIYANISTA; GANDHI, 2004) e da hipertrofia cardíaca (VELLAICHAMY; SOMMANA; PANDEY, 2005).

2.4 Resistência insulínica

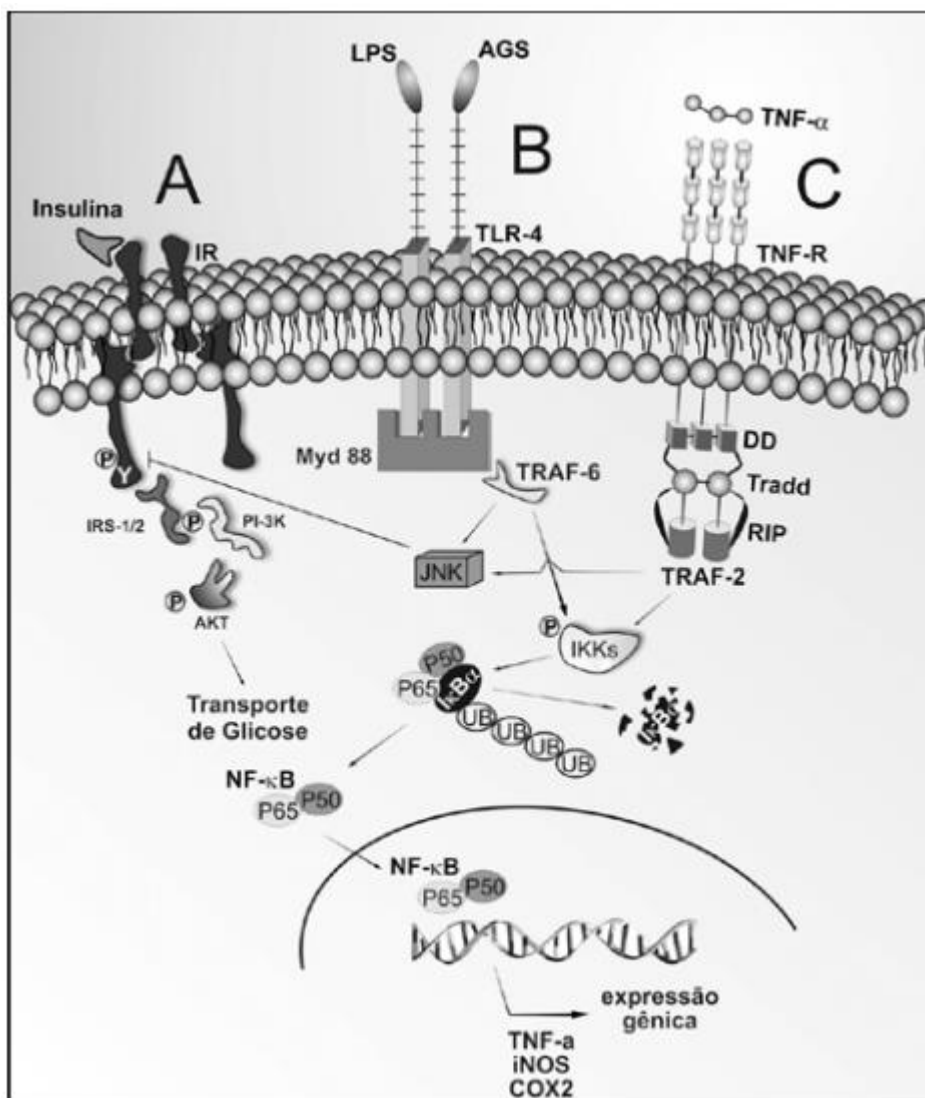
A resistência insulínica pode ser definida como uma resposta diminuída às ações biológicas da insulina. Está associada ao excesso de gordura corporal e alterações metabólicas, como diabetes, dislipidemias, hipertensão arterial, que, em conjunto, constituem a síndrome metabólica (FARIA et al., 2014). O aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs) pode levar à ativação de serina-quinases que fosforilam os receptores de insulina, ocasionando a resistência à insulina. Além disso, esse aumento pode

estimular uma sinalização pró-inflamatória por ativação de Ikappa β kinase (IKK β) que também leva à resistência insulínica (GRATAS-DELAMARCHE et al., 2014).

Segundo Pauli et al. (2009), ácidos graxos provenientes da dieta, principalmente os de origem animal, são capazes de ativar proteínas de membrana celulares denominadas TLR-4 (*toll like receptors*) que funcionam como mediadores da via inflamatória que influencia negativamente na ação da insulina em tecidos metabólicos (Figura 1). Ao se ligarem a esse receptor de membrana celular, alguns ácidos graxos acionam proteínas de resposta inflamatória, incluindo a JNK (c-jun N-terminal kinase) e IKK β , que bloqueiam a ação da insulina (DANDONA; ALJADA; BANDYOPADHYAY, 2004).

Em situações normais, a insulina ativa a produção de óxido nítrico, com consequente efeito vasodilatador e antiapoptótico, em células endoteliais por um mecanismo dependente da fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K) (GARCIA; INCERPI, 2008). A hiperinsulinemia decorrente da resistência à insulina favorece o desenvolvimento da HVE via ativação de quinases que fosforilam o substrato do receptor de insulina, inibindo sua função, ocasionando a inibição da via fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K), proteína quinase B (akt) e a ativação da via da quinase ativada por mitógenos (MAPK), induzindo estresse oxidativo e crescimento celular, contribuindo para o desenvolvimento da HVE e aumento do risco cardiovascular, associado à hiperinsulinemia e resistência à insulina (BROWNSEY; BOONE; ALLARD, 1997).

Figura 1 - Inflamação e resistência à insulina. A ativação de quinases, especialmente IKK β Kinase (IKK) e c-jun aminoterminal kinase (JNK), ressalta a sobreposição das vias metabólicas e inflamatórias: essas são as mesmas quinases ativadas na resposta imune inata pelo TLR (*toll-like receptor*) em resposta aos lipopolissacarídeos (LPS) e aos ácidos graxos (AGS). A IKK β pode interferir na sinalização de insulina por pelo menos duas vias: primeiro, ela pode fosforilar diretamente os substratos do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2) em resíduos de serina; segundo, ela pode ativar indiretamente o NF κ B, um fator de transcrição que, entre outros alvos, pode estimular a produção de vários mediadores inflamatórios, incluindo o TNF- α , iNOS e COX₂. A JNK ativada tanto pela via do TLR-4 como pelo TNF- α também pode interferir negativamente na sinalização da insulina, fosforilando o IRS-1 e o IRS-2 em serina. (A) via de sinalização da insulina; (B) via de sinalização do TLR-4; (C) via de sinalização do TNF- α .



Fonte: Pauli et al. (2009).

2.5 Hipertrofia Ventricular Esquerda (HVE)

A HVE ocorre em resposta a uma sobrecarga hemodinâmica relatada em várias condições fisiológicas e patológicas (GARCIA; INCERPI, 2008). É caracterizada por alterações estruturais decorrentes do aumento das dimensões dos cardiomiócitos, proliferação

do tecido conjuntivo intersticial e rarefação da microcirculação coronariana (WOLLERT; DREXLER, 2002). Marcador de alto risco cardiovascular, independente de comorbidades, sem distinção quanto à etnia, presença ou ausência de hipertensão arterial sistêmica ou doença coronariana, a HVE é um dos mais importantes fatores de risco para angina de peito, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral e morte súbita (COLOSIMO et al., 2011).

Segundo Garcia e Incerpi (2008), dentre os fatores que induzem a HVE estão os fatores hemodinâmicos, o aumento da necessidade metabólica e os fatores neuro-humorais incluindo catecolaminas, angiotensina II, insulina, estresse oxidativo e hipercolesterolemia. Esses fatores são capazes de promover alterações no funcionamento dos canais iônicos do sarcolema, levando a variações da concentração iônica intracelular e promovendo um estímulo inicial para a ativação de proteínas quinases ativadoras mitogênicas (MAPK), dentre elas, a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), a quinase c-jun NH₂-terminal (JNK) e a quinase p38 que são mediadores da sinalização hipertrófica, uma vez que induzem a transcrição de genes associados à hipertrofia (SUSSMAN; MCCULLOCH; BORG, 2002).

Apesar de as MAPK se organizarem de maneira semelhante, há indicações de certas especializações em sua regulação: as ERKs são primariamente ativadas por estímulos anabólicos como agonistas de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) e estiramento (SUGDEN; CLERK, 1997). As JNKs e as p38 respondem a estresse, pois, além de serem ativadas por estímulos anabólicos, como os agonistas GPCR e estiramento, são também ativadas por agentes citotóxicos (SUGDEN; CLERK, 1998).

Diversas vias de sinalização celular parecem estar envolvidas na indução dos diferentes aspectos da resposta hipertrófica do miocárdio e cardiomiócito à sobrecarga hemodinâmica crônica. Pesquisas com animais *knock-out* que reproduzem a hipertrofia cardíaca têm permitido maior esclarecimento sobre a contribuição de mecanismos específicos que determinam o crescimento hipertrófico (FRANCHINI, 2001).

2.6 Estatinas

A redução dos níveis séricos de CT e LDLc por inibidores da hidroximetilglutaril-coenzima-A redutase (HMG-CoA redutase), também conhecidos como estatinas, permanece a terapia mais validada para reduzir a incidência de eventos cardiovasculares (KASTELEIN et al., 2008). A depleção intracelular de colesterol estimula a liberação de fatores de transcrição e, conseqüentemente, síntese e expressão na membrana celular de receptores como o LDLr,

com isso, as estatinas podem influenciar as lipoproteínas circulantes que interagem com esse receptor, como a LDLc, a VLDLc e remanescentes de quilomicrons (XAVIER et al., 2013). A inibição da HMG-CoA redutase reduz também a formação de mevalonato e de radicais isoprenil, diminuindo a ativação de proteínas fundamentais à resposta inflamatória e aumentando um importante fator vasodilatador e antitrombótico, o óxido nítrico (NO) (SPOSITO; CHAPMAN, 2002).

Uma meta-análise realizada pelo *Cholesterol Treatment Trialists' Collaboration* (CTT, 2010), com 170.000 participantes, em 26 estudos randomizados, mostrou que a redução do LDLc com a utilização de estatinas reduz o risco de infarto do miocárdio, morte coronariana e acidente vascular cerebral isquêmico, em uma ampla gama de pessoas. Entretanto o tratamento com estatinas em longo prazo está associado a queixas musculares, comprometimento renal e hepático, hipotireoidismo, diabetes, polineuropatia e outros efeitos colaterais (THOMPSON; CLAKSON; KARAS, 2003).

Em razão do elevado custo desses medicamentos e a perspectiva de seu uso prolongado associado ao aparecimento de efeitos colaterais têm ganhado importância à busca por tratamentos alternativos para o controle das dislipidemias e prevenção de DCV (CALDERON et al., 2011).

2.7 Camundongos

Naturalmente, quando comparados aos humanos, os camundongos selvagens apresentam níveis elevados de HDLc e níveis reduzidos de LDLc, condições que exercem um papel protetor cardiovascular (BRESLOW, 1996). Camundongos também apresentam a ausência da lipoproteína A, uma lipoproteína pró-aterogênica presente em humanos. Ainda que existam diferenças no transporte e metabolismo de lipídios entre camundongos e humanos, alterações em partes específicas das vias tornam similares as duas espécies (SMITHIES; MAEDA, 1995).

Em seres humanos e camundongos, o gene da apolipoproteína E (apoE) é um dos principais determinantes dos níveis de lipídios no plasma (HOFKER; VAN VLIJMEN; HAVEKES, 1998). Estudos mostram que camundongos knockout (-/-), para a apoE ou para o receptor de LDLc (LDLr), podem desenvolver lesões cardiovasculares semelhantes às lesões humanas avançadas (CALARA et al., 2001; JOHNSON; JACKSON, 2001; SONG; LEUNG; SCHINDLER, 2001). Camundongos LDLr^{-/-} desenvolvem hiperlipidemia espontânea moderada, no entanto são mais resistentes ao desenvolvimento de lesões neointimais, na

artéria carótida, quando alimentados com dieta-padrão para roedores, mas, quando alimentados com dieta hiperlipídica, apresentaram-se susceptíveis às lesões neointimais (TIAN et al., 2006), significativo estresse oxidativo arterial com desenvolvimento da placa aterosclerótica e HVE, conforme descrito por Garcia et al. (2008) e Krieger et al. (2006).

Portanto, para a indução de DCV no camundongo LDLr^{-/-}, a dieta hiperlipídica consiste em adequado modelo experimental para o estudo das complicações encontradas na doença avançada (SANTOS, 2015).

2.8 Alimentos Funcionais

O conceito “Alimentos Funcionais” foi desenvolvido pela primeira vez, no Japão, na década de 1980, onde pesquisas apoiadas pelo governo japonês mostravam as potencialidades de alguns alimentos de influenciarem funções fisiológicas humanas. O Ministério da Saúde e Bem-Estar do Japão iniciou, então, um sistema regulatório, para aprovar certos alimentos com benefícios de saúde documentados, na esperança de melhorar a qualidade de vida durante o envelhecimento da população japonesa (HASLER, 2002). Este conceito difundiu-se mundialmente e, em geral, os alimentos que apresentam componentes biologicamente ativos, capazes de modular a fisiologia do organismo, proporcionando benefícios à saúde, além das funções nutricionais básicas, são definidos como alimentos funcionais (HENRY, 2010).

Diversos alimentos considerados funcionais são citados como auxiliares no tratamento e na prevenção das dislipidemias e do risco cardiovascular, por exemplo, as fibras solúveis (farelo de aveia e *psyllium*), a proteína de soja, os ácidos graxos ômega-3, o cacau, o chá-verde, o café, o alho, a levedura de arroz vermelho, a goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), o óleo de prímula, a alcachofra, a canela, as algas marinhas, o leite fermentado, a linhaça, as frutas vermelhas, o farelo de milho (PASCHOAL; NAVES, 2014), as uvas e seus derivados (GIEHL et al., 2007; TOALDO et al., 2016).

As uvas são consideradas uma das maiores fontes de compostos fenólicos, quando comparadas a outras frutas e vegetais (MACHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990), principalmente flavonoides (antocianinas e flavonóis), estilbenos (resveratrol), ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzoicos) e uma variedade de taninos (FRANCIS, 2000). Estudos demonstram que esses fenólicos da uva possuem alta capacidade antioxidante e de inibição da proliferação celular (FARIA et al., 2006; MITJANS et al., 2004), reduzem a oxidação do LDLc e a agregação plaquetária (HAYEK et al., 1997), promovendo benefícios à saúde.

2.8.1 Suco de uva

A cultura de videiras é bastante difundida no Brasil, com destaque para o cultivo das espécies *Vitis vinifera* L., de origem euroasiática e *Vitis labrusca* L., originária da América Setentrional (EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA - EPAGRI, 1999). A produção de uvas, no Brasil, em 2017, foi a maior já registrada, com destaque para os estados de Pernambuco e Rio Grande do Sul, sendo que, neste último, a produção de uvas se aproximou de um milhão de toneladas (MELLO, 2018). A espécie *Vitis labrusca* L. é amplamente cultivada nessa região e representa mais de 80% das uvas processadas, destinadas, sobretudo, à produção do suco de uva. Entre as variedades mais cultivadas destacam-se a Bordô e a Isabel, que correspondem a 50% da produção nacional de uvas (OLIVEIRA et al., 2008).

No Brasil, a Lei que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho é a Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que define suco de uva como a bebida não fermentada, obtida do mosto simples, sulfitado ou concentrado de uva sã, fresca e madura (BRASIL, 1988). Das etapas de produção do suco destacam-se: o controle da cultivar que é determinante para a qualidade do suco; a separação da ráquis, que imprime gosto amargo ao suco pelo seu baixo teor de açúcares; o esmagamento da uva, que contribui na extração da cor por meio do aumento da superfície de contato entre o mosto e a parte sólida; o aquecimento da uva esmagada no mínimo a 65°C, para a extração de substâncias presentes na película, como compostos fenólicos, responsáveis pela cor; a separação da parte sólida (película e sementes); a refrigeração, além das Boas Práticas de Fabricação para assegurar um produto final de qualidade (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

O suco integral de uva é rico em flavonóis, antocianinas, ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzoico, resveratrol, glicose, frutose, aminoácidos, polipeptídios, proteínas, ácidos tartárico, málico e cítrico, vitaminas como tiamina, riboflavina, niacina, ácido ascórbico e inositol e elementos minerais, como potássio, sódio, cálcio, magnésio, fósforo, ferro, manganês, cobre, zinco, lítio e rubídio (DÜSMAN et al., 2017).

Seu consumo vem sendo associado a efeitos positivos à saúde, como o aumento da capacidade antioxidante (GIEHL et al., 2007), redução dos níveis de colesterol e de marcadores pró-inflamatórios (BUB et al., 2001; CASTILLA et al., 2006), benefícios cardiovasculares e redox, em ratos Wistar hipertensos, mesmo quando a síntese de óxido nítrico estava bloqueada (DILLENBURG, 2012), redução significativa de índice de massa corporal (IMC), circunferências abdominal e da cintura e um aumento de HDLc em mulheres

(ZUANAZZI, 2017), melhora do desempenho físico, aumento da atividade antioxidante e redução da inflamação sistêmica em corredores recreacionais (TOSCANO, 2015), efeitos atribuídos, em especial, aos compostos fenólicos presentes (SOUZA, 2008).

2.8.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são encontrados em diferentes concentrações em uma variedade de fontes alimentares à base de plantas, como leguminosas, frutas, vegetais, extratos de ervas, especiarias, café, chá e cacau. Estes compostos são agrupados em ácidos fenólicos, estilbenos, lignanas e flavonoides com base no número de anéis de fenol. Os flavonoides são sub-classificados em flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavano-3-ols em função de sua complexidade estrutural (RAMSAY et al., 2017).

Frutos de baga representam uma rica fonte de fenólicos, que estão relacionados a uma série de benefícios à saúde, incluindo modulação da inflamação, redução no risco de doença cardiovascular, efeito anticancerígeno e proteção contra doenças neurodegenerativas (FRANCIS, 2000). As uvas da espécie *Vitis labrusca* L. contêm uma mistura única de flavano-3-ols, ésteres tartáricos de hidroxicinamatos e antocianinas, sendo as antocianinas responsáveis por 46% do seu conteúdo fenólico total (RAMSAY et al., 2017).

As antocianinas, do grego: anthos = flores; kianos = azul, são os pigmentos responsáveis pela coloração azul, violeta, vermelha e rosa exibida em flores e frutos. Todas as antocianinas são derivadas da estrutura básica do cátion flavilium, deficiente em elétrons e, portanto muito reativo (GUIMARÃES; ALVES; FILHO, 2012). São atribuídos às antocianinas benefícios à saúde por suas atividades biológicas, que incluem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, inibição da oxidação do LDLc, diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares e de câncer, sendo que vários mecanismos podem estar envolvidos nesse processo (CHANG et al., 2006; YI et al., 2010).

A presença de altas concentrações de polifenóis antioxidantes, em uvas tintas, tem sido relacionada a benefícios cardiovasculares observados em populações que consomem a fruta ou seus derivados como vinho ou suco (HASLER, 2002). No entanto os tratamentos com alimentos funcionais têm sido utilizados de forma empírica, carecendo de metodologia de estudo que permita conclusões mais confiáveis (CALDERON et al., 2011).

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M. N. L. **Dislipidemia e sua associação com estresse oxidativo em uma coorte de escolares do Recife - PE**. 2014. 108 p. Tese (Doutorado em Nutrição) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.
- BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- BRASIL. **Lei nº 7.678**, de 8 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. Brasília, DF, 8 nov. 1988. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/1980-1988/L7678.htm>. Acesso em: 3 maio 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo**. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2017/09/doencas-cardiovasculares-sao-principal-caoa-de-morte-no-mundo>>. Acesso em: 2 maio 2018.
- BRESLOW, J. L. Mouse models of atherosclerosis. **Science**, New York, v. 272, p. 685-688, 1996.
- BROWNSEY, R. W.; BOONE, A. N.; ALLARD, M. F. Actions of insulin on the mammalian heart: metabolismo, pathology and biochemical mechanisms. **Cardiovascular Research**, Oxford, v. 34, p. 3-24, 1997.
- BUB, A. et al. Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. **European Journal of Nutrition**, London, v. 40, p. 113-120, 2001.
- CALARA, F. et al. Spontaneous plaque rupture and secondary thrombosis in apolipoprotein E-deficient and LDL receptor-deficient mice. **Journal of Pathology**, Sussex, v. 195, p. 257-263, 2001.
- CALDERON, H. L. et al. Efeito da lecitina de soja sobre os lipídeos e proteína C reativa e na prevenção da hipertrofia ventricular esquerda de camundongos hiperlipidêmicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 32, n. 3, p. 389-393, 2011.
- CARDOSO, L. M.; LEITE, J. P. V.; PELUZIO, M. C. G. Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico. **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacêuticas**, Bogotá, v. 40, n. 1, p. 116-138, 2011.
- CASTELLI, W. P. et al. HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease: the cooperative lipoprotein phenotyping study. **Circulation**, Baltimore, v. 55, n. 5, p. 767-772, 1977.
- CASTILLA, P. et al. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 84, p. 252-262, 2006.

CHANG, Y. C. et al. Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 44, n. 7, p. 1015-1023, 2006.

CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS' COLLABORATION. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170 000 participants in 26 randomised trials. **The Lancet**, London, v. 376, p. 1670-1681, 2010.

COLOSIMO, A. P. et al. Sensibilidade do eletrocardiograma na hipertrofia ventricular de acordo com o gênero e massa cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 97, n. 3, p. 225-231, 2011.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends in Immunology**, London, v. 25, n. 1, p. 4-7, 2004.

DAUGHERTY, A. et al. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 94, n. 1, p. 437-444, 1994.

DILLENBURG, D. R. **Efeito do suco de uva sobre o controle autônomo da pressão arterial e frequência cardíaca em ratos hipertensos**. 2012. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde: Cardiologia) - Fundação Universitária de Cardiologia, Porto Alegre, 2012.

DÜSMAN, E. et al. Influence of processing and storage of integral grape juice (*Vitis labrusca* L.) on its physical and chemical characteristics, cytotoxicity, and mutagenicity *in vitro*. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 2, May 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28613380>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. **Zoneamento agroecológico e socioeconômico do estado de Santa Catarina**. Florianópolis, 1999.

FARIA, A. et al. Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 2392-2397, 2006.

FARIA, E. R. et al. Resistência à insulina e componentes da síndrome metabólica, análise por sexo e por fase da adolescência. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 58, n. 6, p. 610-618, 2014.

FARRET, J. F. **Nutrição e doenças cardiovasculares: prevenção primária e secundária**. São Paulo: Atheneu, 2005.

FRANCHINI, K. G. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. **Revista Brasileira de Hipertensão**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 125-142, 2001.

FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods World**, Minneapolis, v. 45, p. 208-213, 2000.

GARCIA, J. A.; INCERPI, E. K. Fatores e mecanismos envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda e o papel anti-hipertrofico do óxido nítrico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 90, n. 6, p. 443-450, 2008.

GARCIA, J. A. D. et al. Efeito anti-inflamatório da lipoproteína de alta densidade no sistema cardiovascular de camundongos hiperlipidêmicos. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, Lisboa, v. 30, n. 10, p. 763-769, 2011.

_____. S-Nitroso-N-Acetylcysteine (SNAC) Prevents Myocardial Alterations in Hypercholesterolemic LDL Receptor Knockout Mice by Antiinflammatory Action. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, Hagerstown, v. 51, p. 78-85, 2008.

GIEHL, M. R. et al. Eficácia dos flavonoides da uva, vinho tinto e suco de uva tinto na prevenção e no tratamento secundário da aterosclerose. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 17, n. 3, p. 145-155, 2007.

GOMES, E. C.; SILVA, A. N.; OLIVEIRA, A. R. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Cairo, v. 2012, p. 1-12, 2012.

GRATAS-DELMARCHE, A. et al. Physical inactivity, insulin resistance and the oxidative-inflammatory loop. **Free Radical Research**, New York, v. 48, n. 1, p. 93-108, 2014.

GUIMARÃES, W.; ALVES, M. I. R.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Antocianinas em extratos vegetais: aplicação em titulação ácido-base e identificação via cromatografia líquida/espectrometria de massas. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 8, p. 1673-1679, 2012.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 410-418, 2000.

HASLER, C. M. Functional foods: benefits, concerns and challenges: a position paper from the American Council on Science and Health. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 132, p. 3772-3781, 2002.

HAYEK, T. et al. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v. 17, p. 2744-2752, 1997.

HENN, V. et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. **Nature**, London, v. 391, p. 591-594, 1998.

HENRY, C. J. Functional foods. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 64, p. 657-659, 2010.

HOFKER, M. H.; VAN VLIJMEN, B. J.; HAVEKES, L. M. Transgenic mouse models to study the role of ApoE in hyperlipidemia and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 137, n. 1, p. 1-11, 1998.

- ISOSAKI, M.; CARDOSO, E. **Manual de dietoterapia e avaliação nutricional**: serviço de nutrição e dietética do Instituto do Coração - HCFMUSP. São Paulo: Atheneu, 2004.
- JOHNSON, J. L.; JACKSON, C. L. Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 154, p. 399-406, 2001.
- KASTELEIN, J. J. P. et al. Simvastatin with or without ezetimibe in familial hypercholesterolemia. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 358, n. 14, p. 1431-1443, 2008.
- KRIEGER, M. H. et al. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 14, p. 12-20, 2006.
- LEANÇA, C. C. et al. HDL: o yin-yang da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 54, n. 9, p. 777-784, 2010.
- LIBBY, P.; RIDKER, P.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, Baltimore, v. 105, n. 9, p. 1135-1143, 2002.
- LUSIS, A. Atherosclerosis. **Nature**, London, v. 407, p. 233-241, 2000.
- MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. The main phenolics of fruit. In: _____. **Fruit phenolics**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 1-98.
- MADAMANCHI, N. R.; VENDROV, A.; RUNGE, M. S. Oxidative stress and vascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v. 25, p. 29-38, 2005.
- MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2017**. Bento Gonçalves: Embrapa, 2018. (Comunicado técnico, 207).
- MITJANS, M. et al. Immunomodulatory activity of a new family of antioxidants obtained from grape polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 7297-7299, 2004.
- OLIVEIRA, J. E. M. et al. **Produção integrada de uva no Vale do São Francisco**. Vitória: Incaper, 2008.
- PANIERI, E. et al. Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 57, p. 176-187, 2013.
- PASCHOAL, V.; NAVES, A. **Tratado de nutrição esportiva funcional**. São Paulo: Roca, 2014.
- PAULI, J. R. et al. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 53, n. 4, p. 399-408, 2009.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, New Delhi, v. 30, n. 1, p. 11-26, 2015.

PRASSL, R.; LAGGNER, P. Molecular structure of low density lipoprotein: current status and future challenges. **European Biophysics Journal**, New York, v. 38, n. 2, p. 145-158, 2009.

PREDIGER, C. C. C. **Efeitos do consumo de proteína de soja isolada sobre os níveis de lipídios séricos em mulheres**. 2009. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

RAMSAY, C. F. H. et al. Cognitive and mood improvements following acute supplementation with purple grape juice in healthy young adults. **European Journal of Nutrition**, London, v. 56, p. 2621-2631, 2017.

RIDKER, P. M. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. **Circulation**, Baltimore, v. 107, n. 3, p. 363-369, 2003.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. **Suco de uva**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007.

SANTOS, L. **Influência do leite de soja e do extrato etéreo de *Capsicum baccatum* na lesão aterosclerótica e no remodelamento cardíaco em camundongos knockout para o receptor de LDL**. 2015. 72 p. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

SANTOS, L. et al. Soy milk versus simvastatin for preventing atherosclerosis and left ventricle remodeling in LDL receptor knockout mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 50, n. 3, p. e5854, 2017.

SICCHIERI, L. B. **Caracterização da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) por meios espectroscópicos**. 2012. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SIMÃO, M. Doenças cardiovasculares: perfil de trabalhadores do sexo masculino de uma destilaria do interior paulista. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, Goiânia, v. 2, n. 4, p. 27-35, 2002.

SMITHIES, O.; MAEDA, N. Gene targeting approaches to complex genetic diseases: atherosclerosis and essential hypertension. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 92, p. 5266-5272, 1995.

SONG, L.; LEUNG, C.; SCHINDLER, C. Lymphocytes are important in early atherosclerosis. **Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 108, p. 251-259, 2001.

SOUZA, J. C. **Atividade Antioxidante *in vitro* e *in vivo* de suco de uva e da norbixina**. 2008. 82 p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

SPOSITO, A. C.; CHAPMAN, M. J. Statin therapy in acute coronary syndromes: mechanistic insight into clinical benefit. **Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v. 22, p. 1524-1534, 2002.

SPOSITO, A. C. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia: IV diretriz brasileira sobre dislipidemia e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 88, p. 2-19, abr. 2007. Suplemento 1.

STEINBERG, D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 50, p. 376-381, 2009.

SUGDEN, P. H.; CLERK, A. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. **Cellular Signalling**, New York, v. 9, p. 337-351, 1997.

_____. Stressresponsive mitogen-activated protein ki-nases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. **Circulation Research**, Baltimore, v. 83, p. 345-352, 1998.

SUSSMAN, A.; MCCULLOCH, A.; BORG, T. K. Dance band on the titanic: biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. **Circulation Research**, Baltimore, v. 91, p. 888-898, 2002.

THOMPSON, P. D.; CLARKSON, P.; KARAS, R. H. Statin-associated myopathy. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 2, p. 1681-1690, 2003.

TIAN, J. et al. Hyperlipidemia is a major determinant of neointimal formation in LDL receptordeficient mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 345, p. 1004-1009, 2006.

TOALDO, I. M. et al. Acute consumption of organic and conventional tropical grape juices (*Vitis labrusca* L.) increases antioxidants in plasma and erythrocytes, but not glucose and uric acid levels, in healthy individuals. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 36, n. 8, p. 808-817, 2016.

TOSCANO, L. T. **Efeitos da suplementação de suco de uva sobre o estresse oxidativo, inflamação, imunocompetência, desgaste muscular e desempenho de corredores recreacionais**. 2015. 122 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

VELLAICHAMY, E.; SOMMANA, N. K.; PANDEY, K. N. Reduced cGMP signaling activates NF-kB in hypertrophied hearts of mice lacking natriuretic peptide receptor-A. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 327, p. 106-111, 2005.

VISHNEVETSKY, D.; KIYANISTA, V. A.; GANDHI, P. CD40 ligand: a novel target in the fight against cardiovascular disease. **The Annals of Pharmacotherapy**, Cincinnati, v. 38, p. 1500-1508, 2004.

WOLLERT, K. C.; DREXLER, H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis. **Heart Failure Reviews**, Greenwich, v. 7, n. 4, p. 317-325, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cardiovascular diseases**. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/>. Acesso em: 7 dez. 2018.

XAVIER, H. T. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia: V diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 101, n. 4, p. 1-22, 2013. Suplemento 1.

YI, L. et al. Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 584, n. 3, p. 583-590, Feb. 2010.

ZUANAZZI, C. **Efeitos da suplementação de suco de uva branco sobre as medidas antropométricas e bioquímicas em mulheres**. 2017. 101 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2017.

CAPÍTULO 2

ARTIGO 1 - GRAPE JUICE ATTENUATES LEFT VENTRICULAR HYPERTROPHY IN DYSLIPIDEMIC MICE

Artigo preparado de acordo com as normas para submissão do *Brazilian Archives of Biology and Technology*

Grape Juice Attenuates Left Ventricular Hypertrophy in Dyslipidemic Mice

Grape: hipolipemiant and cardiac protector

Angela Maria Martins¹, Danielle Aparecida Quintino Silva Sarto¹, Karine de Paula Caproni¹, Janaína Silva², Jaqueline Silva², Paulo Sérgio de Souza², Leandro dos Santos³, Marcos Javier Espino Ureña⁴, Brígida Monteiro Vilas Boas¹, Lidiane Paula Ardisson Miranda⁵, José Antonio Dias Garcia^{1,5}.

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – *Campus Machado*; ²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – *Campus Muzambinho*; ³Universidade Federal Rural de Pernambuco – *Campus Serra Talhada*; ⁴Universidad Autónoma de Santo Domingo e Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y forestales; ⁵Universidade José do Rosário Vellano – *Campus Alfenas*.

Abstract

In the present study the effects of grape juice from Isabel cultivar (Vitis labrusca L.) on dyslipidemia, insulin resistance, and left ventricular hypertrophy (LVH) in homozygous mice for LDL receptor gene absence (LDLr - / -) under a hyperlipidemic diet were evaluated. A total of 30 male LDLr-/- mice (3 months old), were divided into three groups (n = 10). Group HL received hyperlipidic feed; Group HLU received hyperlipid feed and 2 g/kg/day of grape juice; Group HLS received hyperlipid feed and 20 mg/kg/day of simvastatin. After 60 days of the experiment, the mice treated with grape juice presented similar results to the group treated with simvastatin, since it's use attenuate dyslipidemia and insulin resistance, besides to promoting a significant growth of cholesterol high-density lipoproteins (HDLc) levels. The association of the antioxidant power of phenolic compounds with the rise of HDLc levels in HLU mice prevented the development of LVH as it inhibited the inflammatory response induced by the CD40 pathway and its CD40L ligand. These effects can occur through different mechanisms, preventing the deposition of collagen in ventricular tissues, development of LVH, and the increase of serum levels of C-reactive protein (CRP). As a conclusion, grape juice is a hypolipidemic and cardiac protector, which had a very close effect to simvastatin by direct antioxidant action of phenolic compounds, or indirectly via antioxidant action and anti-inflammatory activity of the HDLc molecule. These results suggest that grape juice is a functional food with great potential to prevent cardiovascular diseases.

Keywords: *insulin resistance; phenolic compounds, lipids; dyslipidemia; functional foods; Vitis labrusca.*

INTRODUCTION

Cardiovascular diseases (CVD) represent 30% of all causes of death worldwide¹. According to the Ministry of Health, in Brazil, 300,000 people suffer heart attacks every year². Dyslipidemia is a significant risk factor for CVD³ and its development is directly related to serum levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDLc) and triglycerides (TG) and, inversely associated with serum levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDLc)⁴. In addition, oxidative stress has been associated with its onset⁵, accompanied by insulin resistance, increased inflammatory markers⁶, and left ventricular hypertrophy (LVH)⁷.

The Inhibitors of hydroxymethyl glutaryl-coenzyme-A reductase (HMG-CoA reductase), better known as statins, are the most validated clinically therapy to reduce cardiovascular events by lowering plasma levels of LDLc, very-low-density lipoprotein cholesterol (VLDLc), inflammatory markers and increase the levels of nitric oxide⁸. However, long-term treatment with statins is associated with

muscle complaints, renal and hepatic impairment, hypothyroidism, diabetes, polyneuropathy, and other side effects⁹.

The lipid metabolism regulation through diet is an essential target for therapeutic intervention in order to reduce the risk of CVD¹⁰. The consumption of grape products such as red wine and red grape juice has been shown to have positive effects on human health by increasing the antioxidant capacity¹, reducing the cholesterol levels and pro-inflammatory markers. These effects are attributed mainly to the presence of phenolic compounds¹¹⁻¹³.

Grapes (*Vitis labrusca* L.) are rich in phenolic compounds and, according to Ramsay¹⁴, about 46% are anthocyanins. Anthocyanins have great health benefits due to their biological activities, which include antioxidant, anti-inflammatory properties, inhibition of LDLc oxidation, reduction of CVD, and cancer risks¹⁵.

Studies with LDL receptor-deficient mice (LDLr - / -) showed that when these animals are fed with a hyperlipidic diet, they became susceptible to neointimal lesions¹⁶, with increased arterial oxidative stress with development of atherosclerosis plaque¹⁷. It also causes LVH with a larger immunoreactive area for CD40L7, severe mixed dyslipidemia with reduction of serum levels of HDLc, and insulin resistance¹⁸. In the present study, the effects of grape juice on dyslipidemia, insulin resistance, and LVH in LDLr - / - mice submitted to a hyperlipidemic diet were evaluated.

MATERIAL AND METHODS

Grape Juice (*Vitis labrusca* L.)

To prepare the juice we used red table grapes from Isabel cultivar (*Vitis labrusca* L), harvested in the Federal Institute of Education, Science and Technology of South Minas Gerais (IFSULDEMINAS), in the Muzambinho *Campus*. The juice was developed by the sector of Agroindustry Vegetables of the same institution, using a steam drag juice extractor, without the addition of any solute, preservative, and/or water. The juice was kept in a amber glass vessel under 5°C during all the experiment.

Physicochemical analyzes were carried out in the grape juice to analyze the moisture content, the presence of ashes or mineral material, the amount of total lipids, crude protein, pH and soluble solids.

The moisture content was obtained by direct drying in an oven at 105°C; the percentage of ash was obtained by heating to 550 ° C; the amount of crude protein was calculated by the Kjeldahl method adopting the correction factor of 6.25; the pH analysis was performed using pHmeter and the content of soluble solids (°Brix) was obtained by reading a benchtop refractometer with automatic temperature correction. All the analyses were performed according to the methodology described by Pregnotto and Pascuet, 1985¹⁹.

To analyse the total lipids content we used the Bligh and Dyer technique²⁰.

The analysis of total phenolic content was carried out at in the Agricultural Research Company of Minas Gerais (EPAMIG) in Caldas/MG, using the Folin Ciocalteu method with gallic acid as the reference standard²¹. All the analysis were conducted in triplicate.

ANIMAL PROTOCOL

A total of 30 male mice (3 months old), which were homozygous for the absence of the LDL receptor gene (LDLr -/-) generated in background C57BL6 and weighing 22 ± 2 g, were studied. The animals were purchased at the Jackson Laboratory (USA) and maintained at the José do Rosário Vellano University (UNIFENAS), Alfenas/MG, with temperature control and light/dark cycle (12h).

The mice were divided into three experimental groups (n = 10)

Group HL: The mice received hyperlipid feed with 20% total fat, 1.25% cholesterol, and 0.5% cholic acid; Group HLU: The mice received hyperlipid feed with 20% total fat, 1.25% cholesterol, 0.5% cholic acid, and treated with grape juice at a dosage of 2 g/kg administered via gavage once a day.

HLS Group: The mice received hyperlipidemic feed with 20% total fat, 1.25% cholesterol, 0.5% cholic acid and treatment with simvastatin (commercially available) at a dose of 20 mg/kg administered via gavage once a day.

All animals received their respective diets and were treated with water ad libitum.

After 60 days of the experiment, all the animals were anaesthetized intraperitoneally using Xylazine/Ketamine (Bayer AS and Parke-Davis®), respectively, at the concentration of 6-40 mg/kg. After anaesthesia, blood samples were collected via retro-orbital, using heparinized capillaries, and analyzed for glucose, insulin, C-reactive protein (CRP), TG, total cholesterol (TC) and its fractions.

After the thoracotomy, the left ventricle (LV) was removed and freshly weighed to perform the calculation of ventricular weight (mg) by the animal weight (g)⁷. The procedures were approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals - CEUA / IFSULDEMINAS, n° 03A/2014.

SERUM ANALYSIS

Serum levels were obtained by blood sample centrifugation and serum glucose concentration was measured by the enzymatic colourimetric method, according to the technique proposed by Trinder²². The concentration of insulin was measured using a commercial ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kit. The Homa index (HOMA_{IR}) to determine the insulin resistance was calculated by the formula: {HOMA_{IR} = fasting insulinemia (mU/L) x fasting blood glucose (mmol/L)/22.5}. For the measurement of serum lipids (TG, TC, and HDLc), an enzymatic assay was used according to Hedrick et al²³. The levels of LDLc were determined by the formula proposed by Friedewald et al²⁴. The quantitative determination of CRP was done by turbidimetry and photometry (Humastar 300® apparatus) and the results were expressed in mg/dL²⁵.

MORPHOMETRIC AND HISTOLOGICAL ANALYSIS

The left ventricle (LV) was fixed for 48 hours in formalin (10%) and histologically processed according to Junqueira et al.²⁶. The ventricles histological sections were treated with 3% hydrogen peroxide to block endogenous peroxidase activity. The samples were incubated for 12 hours with polyclonal antibody produced in rabbit anti-CD40L (Santa Cruz® 1:50) in a humid chamber. After incubation with the primary antibody, a second incubation with biotinylated secondary antibody (Dako® LSAB kit) was performed for 1 hour at 37 °C. In order to demonstrate the immunoreactive areas, the sections were incubated with peroxidase-conjugated complex (Dako® LSAB kit) for 45 minutes at 37 °C and placed in chromogen solution (50 mg DAB in 50 mL PBS with 3 mL of 10% hydrogen peroxide) for 3 minutes. After counterstaining with Harris hematoxylin (Sigma®) for 25 seconds, the blades were mounted and analyzed under an optical microscope and the fractional percentages of the immunoreactive area for LV CD40L were acquired¹⁷.

The ventricles histological sections were stained with Picrosirius red to evaluate and quantify the collagen of cardiac tissue by means of polarized light and with HE (hematoxylin/eosin) for morphometric analysis of cardiomyocytes.

STATISTICAL ANALYSIS

The obtained data were expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM). The analyses of variance (ANOVA), followed by the Tukey test, were used to compare the average between the different groups. The differences were considered significant when $p < 0.05$. All statistical treatments were performed using GraphPad InStat statistical software, version 3.05, for Windows (GraphPad InStat™, San Diego, CA, USA).

RESULTS

In the present study, the grape juice presented an average of total phenolic concentration of 1029 ± 24 mg/L. The pH average found was 2.96 and the average of soluble solids was 11.7° Brix. The percentages of moisture, ash, lipids and proteins found were 89.88; 0.16; 0.38 and 0.58, respectively.

In the analysis of the lipid profile, grape juice prevented the increase of TC, LDLc and TG in 42, 46, 31% respectively, in the HLU group, when compared to the HL group. In addition, its use promoted a significant rise in HDLc levels. Similar results were found in the mice in the simvastatin-treated group (HLS) (Table 1). The serum levels of TC and LDLc in the HLS group were lower when compared with the HLU group.

The use of simvastatin and grape juice prevented the increase in the serum insulin levels when compared to the HL group. Serum glucose levels did not change significantly between groups. Regarding the HOMA_{ir}, the HL group presented an increase in this index compared to the other groups, while the HLU group presented a similar result to the HLS group, indicating the positive effect of grape juice on the prevention of insulin resistance. The HL group presented an increase in the CRP levels, whereas the HLU group showed no significant difference when compared with the HLS group. These results show that grape juice prevented the increase of this circulating inflammatory indicator (Table 1).

Table 1 – Comparison of serum levels of lipids, glucose, insulin, Homa index (Homa_{ir}), and CRP of LDLr - / - mice of the HL, HLU, and HLS groups.

	HL	HLU	HLS
TC (mg/dL)	681 ± 38.2^a	398 ± 15.0^b	330 ± 8.0^c
HDLc (mg/dL)	27 ± 2.7^a	37 ± 5.2^b	36 ± 1.9^b
LDLc (mg/dL)	608 ± 32.0^a	329 ± 13.3^b	264 ± 23.1^c
TG (mg/dL)	230 ± 5.7^a	159 ± 8.0^b	158 ± 6.3^b
Glucose (mMol/L)	5.6 ± 0.2^a	5.3 ± 0.1^a	5.3 ± 0.2^a
Insulin (μ g/dL)	6.3 ± 0.6^a	3.6 ± 0.2^b	3.2 ± 0.4^b
Homa _{ir}	1.6 ± 0.2^a	0.8 ± 0.05^b	0.7 ± 0.06^b
CRP (mg/dL)	15.2 ± 1.0^a	6.3 ± 1.5^b	5.2 ± 1.2^b

Values expressed as mean \pm standard error of the mean. Different letters indicate significant differences between groups for each variable ($p < 0.05$).

Regarding the left ventricular weight (mg) by animal weight (g), the HL group showed an increase in this proportion, followed by increased cardiomyocyte diameter, tissue collagen deposition, and CD40L immunoreactive area in LV when compared to the HLS and HLU groups (Table 2 and Figure 1). However, the use of grape juice attenuates the increase of these indicators when compared to the HLS group, with an anti-inflammatory effect similar to the HLS group (Table 2 and Figure 1).

Table 2 - Comparison of left ventricular weight (mg) per animal weight (g), cardiomyocyte diameter (μ m), percentage of collagen deposition in LV (%) and CD40L immunoreactive area in LV (%) in the mice groups: HL, HLU, and HLS.

	HL	HLU	HLS
Proportion of LV weight (mg)/ animal weight (g)	4.2 ± 0.08^a	3.6 ± 0.01^b	3.1 ± 0.09^c
Cardiomyocyte diameter (μ m)	25.0 ± 0.8^a	22.5 ± 1.0^b	19.0 ± 1.0^c
LV Collagen deposition (%)	9.8 ± 1.2^a	4.2 ± 1.0^b	4.1 ± 1.1^b
LV CD40 immunoreactive area (%)	7.0 ± 0.5^a	3.0 ± 0.3^b	2.6 ± 1.0^b

Values expressed as mean \pm standard error of the mean. Different letters indicate significant differences between groups for each variable ($p < 0.05$).

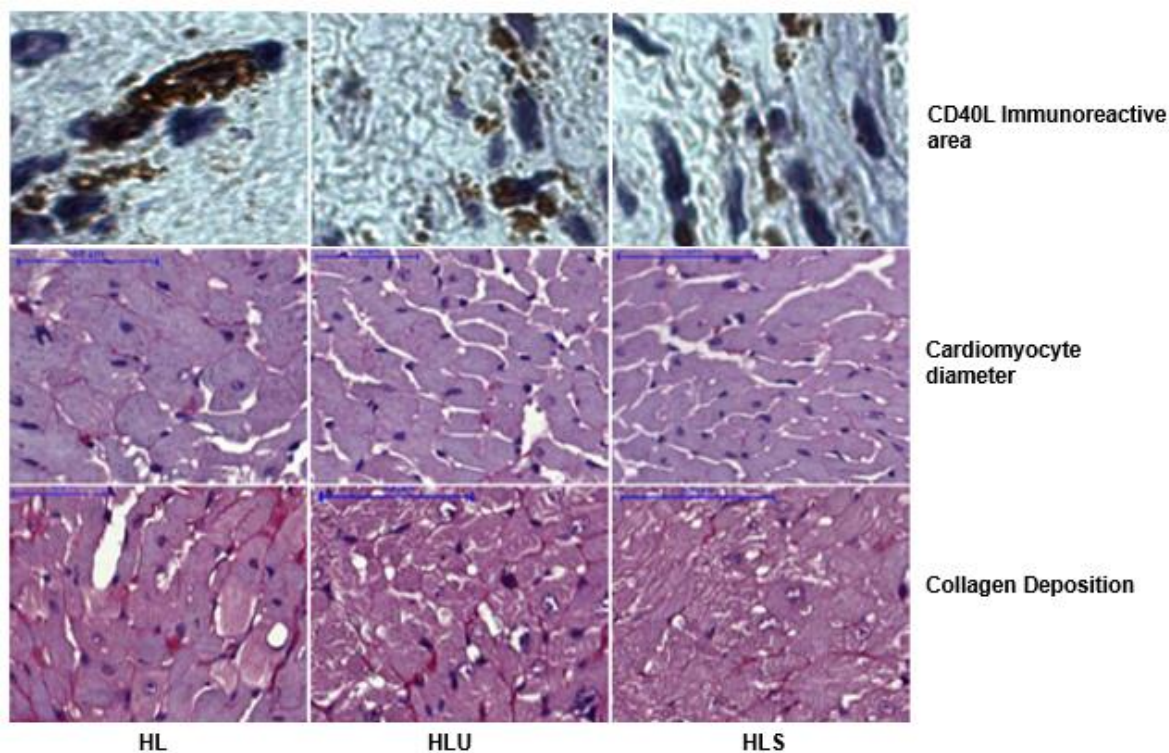


Figure 1 - Photomicrograph of transverse histological sections of the left ventricle of mice showing the immunoreactive area for CD40L, cardiomyocyte diameter, and collagen deposition (marked in red). Group HL: received hyperlipid ration; Group HLU: received hyperlipid feed and grape juice; Group HLS: received hyperlipidic ration and simvastatin.

DISCUSSION

Grapes are considered one of the main sources of phenolic compounds when compared to other fruits and vegetables²⁷. The total phenolic content in grape juice varies from 400 to 3000 mg/L on average and depends on the grape variety, its maturation stage, the geographical origin of the grapes, the soil type where they are cultivated, the amount of sun exposure, and the juice processing technology²⁸. The grape juice used in this study presented an average of total phenolics corresponding to the average found in juices of different grape varieties²⁹⁻³⁰. The average pH found in this study corroborates with the analyzes of grape juices of Gurak et al.³⁰. Regarding the soluble solids content, this content was below the minimum value recommended by the legislation, which is 14 °Brix³¹. The percentage of moisture, ashes, lipids, and proteins found in these samples resembles the analyzes performed by Santana et al.³² in whole-grape juice.

The treatment with grape juice prevented mixed dyslipidemia and reduced serum HDLc levels in mice of the HLU when compared to the HL group. In addition, it prevented insulin resistance, LVH and ventricular inflammatory process, which were demonstrated by the smaller immunoreactive area for CD40L, lower collagen deposition in the ventricular tissue, and lower serum levels of CRP. These effects are correlated with the content of phenolic compounds and their antioxidant capacities.³³

The hypolipidemic effect of grape juice on mice of the HLU group might have occurred due to the presence of phenolic compounds, which reduced the absorption of cholesterol by their ability to bind to this lipid, preventing its absorption and causing a greater faecal excretion of cholesterol, bile acids, and other dietary lipids³⁴. In addition, phenolic compounds increase the activity of lipoprotein lipase (LPL), promoting the hydrolysis of TG molecules found in the lipoprotein particles, causing their greater plasma removal³⁵ and, consequently, reducing the TG levels in the HLU group. These results are consistent with other studies that demonstrated that red wine phenolics, with or without alcohol, had a lipid-lowering effect in LDLr^{-/-} mice and in hyperlipidemic hamsters^{36,37}. On the other hand,

the use of simvastatin by the HLS group prevented the endogenous production of lipids, inhibiting the functioning of the enzyme HMG-CoA reductase³⁸, reducing serum lipid levels in the HLS group.

The main phenol molecules present in grapes are flavonoids (anthocyanins and flavonols), stilbenes (resveratrol), phenolic acids (derived from cinnamic and benzoic acids), and a wide variety of tannins³⁹.

Different studies have shown that these grape phenolics compounds can promote health benefits such as high antioxidant capacity and cell proliferation inhibition^{40,41}, can also reduce the oxidation of LDLc and platelet aggregation, contributing thus, to the reduction of atherosclerotic lesion progression⁴². In hypertensive Wistar mice, the treatment with grape juice demonstrated cardiovascular and redox benefits, even when the nitric oxide synthesis was blocked⁴³. Women supplemented with grape juice had a significant reduction in the body mass index, waist circumferences and showed a 16% increase in the HDLc levels⁴⁴. Recreational joggers, when supplemented with grape juice, showed an improvement in their physical performance together with an increase in the antioxidant activity and a reduction in the systemic inflammation⁴⁵.

In the present study, the phenolic compounds in grape juice prevented the decrease in serum levels of HDLc and their oxidation, which consequently decreased their hepatic removal⁴⁶. Thus, the use of grape juice in this studied models equilibrated the balance between LDLc and HDLc, protecting the cardiac tissue.

The role of the CD40 receptor and its CD40L binder as inflammatory markers involved in cardiac hypertrophy⁷ and atherosclerosis⁴⁷ is evident at different stages. CD40L is a transmembrane protein that exerts a pro-oxidant effect. The interaction with its CD40 receptor induces the inflammatory response, facilitating the development of acute coronary syndrome⁴⁸, the activation of the NFkappa β ⁴⁹ pathway and the phosphorylation of the IKK (Kappa β kinase inhibitor), triggering genes involved in inflammation and cardiac hypertrophy⁵⁰, which was observed in the mice of the HL group in this study.

The equilibrium of LDLc/HDLc balance associated with the antioxidant effect of grape juice phenolic compounds prevented oxidation and ventricular inflammation, as verified in the HLU group since they inhibited the inflammatory response induced via the CD40 pathway and its CD40L binder. These effects may occur through different mechanisms: inhibition the NFkappa β ⁵¹ pathway; reduction in the production and activity of matrix metalloproteinases and suppression of MAPK activation (mitogen-activated protein kinases), JNK, and p38⁵²; as well as prevention of collagen deposition in ventricular tissue. The prevention of the reduction of serum levels of the HDLc molecule was crucial in the cardiac protection because, besides the reverse cholesterol transport function⁵³, it has an antioxidant effect^{18,54} due to its ability to destroy lipid hydroperoxides that oxidize LDLc phospholipids, by the action of the enzymes paraoxonase-1⁵⁵ and paraoxonase-3⁵⁶. The HLU and HLS groups showed elevated levels of HDLc and lower levels of CRP. This increase in the HDLc level may have played an anti-inflammatory role in these animals⁵⁷, preventing LVH.

The HL group showed an increase in serum insulin levels and in insulin resistance. Insulin causes tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate (IRS-1). However, insulin-inducing agents such as free fatty acids, oxidative stress, and inflammations promote the activation of IRS-1 phosphorylating kinases in serine, inhibiting its function⁵⁸. The mice of the HL group did not present hyperglycemia. The insulin resistance without hyperglycemia found in the HL group in this study may have occurred because of the ability of the IRS-2 to compensate for the absence of the IRS-1⁵⁹ partially.

The HLU and HLS groups that presented high levels of HDLc did not show an increase in insulin levels and insulin resistance when compared to the HL group. In the HLU group, in addition to the antioxidant action of the HDLc molecule, phenolic compounds, especially the anthocyanins present in grape juice, may also have exerted this function, since anthocyanins can attenuate oxidative stress. This can happen through the oxidation inhibition of LDLc due to its chemical structure, such as glycosylation degree and number of hydroxyl groups⁶⁰. Insulin resistance associated with hyperinsulinemia was not observed in mice of the HLU and HLS groups, showing that the antioxidant/anti-inflammatory effect of HDLc and phenolic compounds in these animals may have prevented the oxidation of insulin receptor substrates. Both *in vitro* and *in vivo* studies have shown that several proinflammatory cytokines⁶¹ are involved in the pathogenesis of insulin resistance, and many anti-inflammatory strategies have been shown to improve insulin sensitivity⁶².

CONCLUSION

Grape juice (*Vitis labrusca* L.) is a hypolipidemic and cardiac protector, which had a very close effect to simvastatin, preventing insulin resistance by direct antioxidant action of phenolic compounds, or indirectly via antioxidant action and anti-inflammatory activity of the HDLc molecule, demonstrating to be a functional food with great potential to prevent cardiovascular diseases.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors gratefully thank CNPq and FAPEMIG for the financial support, and the Federal Institute of Education, Science and Technology of the South of Minas Gerais and the University of José do Rosário Vellano for the support in carrying out the study.

REFERENCES

1. Giehl MR, Bosco SMD, Laflor CM, Weber B. Efficacy of grape, red wine and grape juice flavonoids in the prevention and secondary treatment of atherosclerosis. *Sci Med*. 2007; 17(3): 145-155.
2. Brasil. Doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo. Ministério da Saúde, 2017. Accessed in: 02 may 2018. Available from: <http://www.brasil.gov.br/saude/2017/09/doencas-cardiovasculares-sao-principal-caoa-de-morte-no-mundo>.
3. Libby P, Ridker P, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105(9): 1135-1143.
4. Castelli WP, Doyle JT, Gordon T, Hames CG, Hjortland MC, Hulley SB, et al. HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease: The cooperative lipoprotein phenotyping study. *Circulation*. 1977; 55(5): 767-772.
5. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25(1): 29-38.
6. Lusis A. Atherosclerosis. *Nature*. 2000; 407(6801): 233-241.
7. Garcia JAD, dos Santos L, Moura AL, Ricardo KF, Wanschel AC, Shishido SM, et al. S-Nitroso-N-Acetylcysteine (SNAC) Prevents Myocardial Alterations in Hypercholesterolemic LDL Receptor Knockout Mice by Antiinflammatory Action. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008; 51(1): 78-85.
8. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia: V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*. 2013; 101(4): 1-36.
9. Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. *JAMA*. 2003; 2(13): 1681-1690.
10. Schaefer EJ. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. *Am J Clin Nutr*. 2000; 75(2): 191-212.
11. Bub A, Watzl B, Heeb D, Reckemmer G, Briviba K. Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *Eur J Nutr*. 2001; 40(3): 113-120.
12. Castilla P, Echarri R, Dávalos A, Cerrato F, Ortega H, Teruel JL, et al. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am J Clin Nutr*. 2006; 84(1): 252-262.
13. Souza JC. Atividade Antioxidante in vitro e in vivo de suco de uva e da norbixina (Antioxidant activity in vitro and in vivo of grape juice and norbixin). Dissertação Mestrado em Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual de Campinas, 2008. Accessed in: 02 may 2018. Available from: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/256113/1/Souza_JaneCristinade_M.pdf.
14. Ramsay CFH, Stuart RC, Okello EJ, Watson AW. Cognitive and mood improvements following acute supplementation with purple grape juice in healthy young adults. *Eur J Nutr*. 2017; 56(8): 2621-2631.
15. Cardoso LM, Leite JPV, Peluzio MCG. Biological effects of anthocyanins on the atherosclerotic process. *Rev Colomb Cienc Quim Farm*. 2011; 40(1): 116-138.
16. Tian J, Pei H, Sanders JM, Angle JF, Sarembok IJ, Matsumoto AH, et al. Hyperlipidemia is a major determinant of neointimal formation in LDL receptordeficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 345(3): 1004-1009.
17. Krieger MH, Santos KFR, Shishido SM, Wanschela ACBA, Estrela HFG, Santosa L, et al. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide*, 2006; 14(1): 12-20.
18. Garcia JAD, Lima CC, Messoria LB, Cruz AF, Marques APS, Simão TP, et al. Efeito anti-inflamatório da lipoproteína de alta densidade no sistema cardiovascular de camundongos hiperlipidêmicos (Anti-inflammatory effect of high density lipoprotein on the cardiovascular system of hyperlipidemic mice). *Rev Port Cardiol*. 2011; 30(10): 763-769.

19. Pregnotatto W, Pascuet NS. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 1985.
20. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37(8): 911-917.
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-275.
22. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem.* 1969; 6: 24-27.
23. Hedrick CC, Castellani LW, Wong H, Lusic AJ. In vivo interactions of apoA-II, apoA-I, and hepatic lipase contributing to HDL structure and antiatherogenic functions. *J Lipid Res.* 2001; 42(4): 563-570.
24. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparatory ultracentrifugation. *Clin Chem.* 1972; 18(6): 499-502.
25. Lima JCC, Correia LCL, Silva AM, Lima DL. Usando proteína C reativa de alta sensibilidade (PCR-AS) como preditor de doença cardiovascular (Using high sensitivity C-reactive protein (CRP-AS) as a predictor of cardiovascular disease). *NewsLab*, 2000; 41: 164-166.
26. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979; 11(4): 447-455.
27. Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J. The Main Phenolics of Fruit. Boca Raton: CRC Press; 1990.
28. Cosme F, Pinto T, Vilela A. Phenolic compounds and antioxidant activity in grape juices: A chemical and sensory view. *Beverages.* 2018; 22(4): 22-26.
29. Sautter CK, Denardin S, Alves AO, Mallmann CA, Penna NG, Hecktheuer LH. DETERMINATION OF Resveratrol in grape juice produced in Brazil. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2005; 25(3): 437-442.
30. Gurak PD, Silva MC, Matta VM, Rocha-Leão MH, Cabral LMC. Physical-chemical evaluation of grape juices, grape nectars and light grape nectars. *Rev Ciênc Exatas.* 2008; 27(2): 1-15.
31. Brasil. Instrução normativa nº 14, de 8 de fevereiro de 2018. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2018. Accessed in: 06 dez 2018. Available from: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/mapa-atualiza-padroes-de-vinho-uva-e-derivados/INMAPA142018PIQVinhoseDerivados.pdf>.
32. Santana I, Cabral LMC, Freitas SC, Freitas SP, Oliveira A, Matta VM. Composição química e centesimal de suco de uva concentrado por osmose inversa: influência da temperatura do processo. Embrapa, 2011. Accessed in: 23 jan 2019. Available from: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/917017/composicao-quimica-e-centesimal-de-suco-de-uva-concentrado-por-osmose-inversa-influencia-da-temperatura-do-processo>.
33. Vaccari NFS, Soccol MCH, Ide GM. Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças (Phenolic compounds in wines and their antioxidant effects in disease prevention). *Rev Ciênc Agrovet.* 2009; 8(1): 71-83.
34. Napoli C, Balestrieri ML, Sica V, Lerman LO, Crimi E, De Rosa G, et al. Beneficial effects of low doses of red wine consumption on perturbed shear stress-induced atherogenesis. *Heart Vessels.* 2008; 23(2): 124-133.
35. Woo M, Bok S, Choi M. Hypolipidemic and body fat-lowering effects of Fatclean in rats fed a high-fat diet. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47(8): 2076-2082.
36. Hort MA, Schuldt EZ, Bet AC, DalBó S, Siqueira JM, Ianssen C, et al. Anti-atherogenic effects of a phenol-rich fraction from Brazilian red wine (*Vitis labrusca* L.) in hypercholesterolemic low-density lipoprotein receptor knockout mice. *J Med Food.* 2012; 15(10): 936-944.
37. Vinson JA, Teufel K, Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis.* 2001; 156(1): 67-72.
38. Kastelein JJP, Kastelein MD, Fatima MD, Stroes ESG, D., Zwinderman AH, Bots ML, et al. Simvastatin with or without Ezetimibe in Familial Hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 2008; 358(14): 1431-1443.
39. Francis FJ. Anthocyanins and betalains: composition and applications. *Cereal Foods World.* 2000; 45(5): 208-213.
40. Mitjans M, Del Campo J, Abajo C, Martínez V, Selga A, Lozano C, et al. Immunomodulatory activity of a new family of antioxidants obtained from grape polyphenols. *J Agric Food Chem.* 2004; 52(24): 7297-7299.
41. Faria A, Calhau C, de Freitas V, Mateus N. Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(6): 2392-2397.
42. Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, et al. Reduced Progression of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice Following Consumption of Red Wine, or Its Polyphenols Quercetin or Catechin, Is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17(11): 2744-2752.

43. Dillenburg DR. Efeito do suco de uva sobre o controle autonômico da pressão arterial e frequência cardíaca em ratos hipertensos. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde: Cardiologia, Fundação Universitária de Cardiologia, Porto Alegre. 2012. Accessed in: 24 abr. 2019. Available from: <http://www.ppgcardiologia.com.br/wp-content/uploads/2013/11/Denise-dillenburg.pdf>.
44. Zuanazzi C. Efeitos da suplementação de suco de uva branco sobre as medidas antropométricas e bioquímicas em mulheres. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul. 2017. Accessed in: 22 abr. 2019. Available from: <https://repositorio.ucs.br/xmlui/handle/11338/3326>.
45. Toscano LT. Efeitos da suplementação de suco de uva sobre o estresse oxidativo, inflamação, imunocompetência, desgaste muscular e desempenho de corredores recreacionais. Dissertação de Mestrado em Ciências da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2015. Accessed in: 20 abr. 2019. Available from: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/tede/8832/2/arquivototal.pdf>.
46. Christison J, Karjalainen A, Brauman J, Bygrave F, Stocker R. Rapid reduction and removal of HDL- but not LDL- associated cholesteryl ester hydroperoxides by rat liver perfused in situ. *Biochem J*. 1996; 314(3): 739-742.
47. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340(2): 115-126.
48. Vishnevsky D, Kiyani VA, Gandhi P. CD40 ligand: a novel target in the fight against cardiovascular disease. *Ann Pharmacother*. 2004; 38(9): 1500-1508.
49. Gelbmann CM, Leeb SN, Vogl D, Maendel M, Herfarth H, Schölmerich J, et al. Inducible CD40 expression mediates NF- κ B activation and cytokine secretion in human colonic fibroblasts. *Gut*. 2003; 52(10): 1448-1456.
50. Vellaichamy E, Sommana NK, Pandey KN. Reduced cGMP signaling activates NF- κ B in hypertrophied hearts of mice lacking natriuretic peptide receptor-A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 327(1): 106-111.
51. Winther MPJ, Kanters E, Kraal G, Hofker MH. Nuclear factor κ B signaling in Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25(5): 904-914.
52. Xia M, Ling W, Zhu H, Ma J, Wang Q, Hou M, et al. Anthocyanin attenuates CD40-mediated endothelial cell activation and apoptosis by inhibiting CD40-induced MAPK activation. *Atherosclerosis*. 2009; 202(1): 41-47.
53. Prediger CCC. Efeitos do consumo de proteína de soja isolada sobre os níveis de lipídios séricos em mulheres. Tese de Doutorado em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2009. Accessed in: 02 may 2018. Available from: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/18757>.
54. Leança CC, Passarelli M, Nakandakare ER, Quintão ECR. HDL: o yin-yang da doença cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2010; 54(9): 777-784.
55. Mackness B, Hine D, Liu Y, Mastorikou M, Mackness M. Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 318(3): 680-683.
56. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, et al. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21(4): 542-547.
57. Navab M, Ananthramiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, et al. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res*. 2004; 45(6): 993-1007.
58. Sykiotis GP, Papavassiliou AG. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: a novel target for the reversal of insulin resistance. *Molec Endocrinol*. 2001; 15(11): 1864-1869.
59. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag B, Johnson RS, et al. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*. 1994; 372(6502): 186-190.
60. Chang YC, Huang KX, Huang AC, Ho YC, Wang CJ. Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis. *Food Chem Toxicol*. 2006; 44(7): 1015-1023.
61. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993; 259(5091): 87-91.
62. Barbuio R, Milanski M, Bertolo MB, Saad MJ, Velloso LA. Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *J Endocrinol*. 2007; 194(3): 539-550.