

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

**Diferença da hiperplasia miointimal em coelhos submetidos a angioplastia e tratados com *Moringa oleifera*.**

Autor: Janio Cipriano Rolim

Orientador: Professor Doutor Guilherme Benjamim Brandão Pitta

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
PORTO ALEGRE 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

**Diferença da hiperplasia miointimal em coelhos submetidos a angioplastia e tratados com *Moringa oleifera*.**

Autor: Janio Cipriano Rolim

Orientador: Professor Doutor Guilherme Benjamim Brandão Pitta

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
PORTO ALEGRE 2012

*A minha amada LUCÍOLA, pela  
compreensão das ausências em momentos  
cruciais do nosso relacionamento.*

*Aos meus filhos MATHEUS e LUCAS, por  
serem o norte da minha vida*

*Ao meu Pai e minha Mãe, pelo amor  
e dedicação que me permitiram chegar até  
aqui.*

*Ao meu tio Benone que, apesar de  
não estar mais nesse mundo, sei que  
continua vibrando comigo a cada conquista  
alcançada.*

## AGRADECIMENTOS

Aos Professores Guilherme Pitta, Aldemar Araújo e Adamastor Humberto Pereira, pela orientação e incentivo.

A todos os colegas do Grupo da Moringa, como denominamos, Paulo, Chavier, Manoel Ricardo e Misael que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste estudo.

Aos funcionários do Biotério do LTF/UFPB, em especial Crispim e José Vieira, pela dedicação com o trabalho.

Ao amigo Sorismar Cavalcante que ajudou na organização dos materiais cirúrgicos nos dias de experimentação.

À Patologista Ana Paula, que revisou a histologia das lâminas, e a Guilherme, que preparou os blocos e as lâminas e fez a primeira leitura.

Ao amigo Joel por nos ceder o programa para a realização da morfometria digital.

A Marcos Antônio de Vivo Barros, Thiago, Marlon e Márcio Filho, que cederam gentilmente os balões de angioplastia.

À Dra. Margareth, que abriu as portas da UFPB para a realização do trabalho.

À Professora Eliene Alves, pela disponibilidade e pela correção do trabalho em português.

## **SUMÁRIO**

LISTA DE ABREVIATURAS .....	6
INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	7
OBJETIVO.....	21
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	22
ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS.....	29
ANEXOS DO ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	51
ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....	56
ANEXOS DO ARTIGO EM INGLÊS.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

LTF – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica  
UFPB – Universidade Federal da Paraíba  
IAM – Infarto Agudo do Miocárdio  
LEI – Lâmina Elástica Interna  
CMLV – Células da Musculatura Lisa Vascular  
cAMP – Adenosina Monofosfato Cíclica  
VLDL – Lipoproteína de Muito Baixa Densidade  
HDL – Lipoproteína de Alta Densidade  
LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade  
CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa  
PB – Paraíba  
UNESCO - United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization –  
Organização Educacional, Científica e Cultural das Nações Unidas  
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
Kg – Kilograma  
mL – miliLitro  
mg/kg – miligrama por kilograma de peso  
PAS - Periodic Acid-Schiff  
HE – Hemotoxilina Eosina  
CGPM - Conférence Générale des Poids et Mesures  
URL - Uniform Resource Locator  
IC – Intervalo de Confiança  
EUA – Estados Unidos da América

## REVISAO DA LITERATURA

A hiperplasia miointimal é uma importante característica morfológica de várias doenças arteriais, tais como aterosclerose, restenose pós-angioplastia e arteriopatia pós- transplante (1).

Hiperplasia miointimal é a proliferação e migração de células musculares lisas da camada média arterial, além de células da medula óssea que migram para a camada íntima, diminuindo, dessa forma, o lúmen vascular (2).

Imediatamente após angioplastia, com implante de STENT, a superfície endotelial desnuda e a túnica média da parede arterial, lesadas devido ao trauma mecânico, provocam um processo inflamatório, o que leva à adesão plaquetária, ativação, agregação e deposição de fibrina e, posteriormente, a formação de trombos dentro do stent ou do vaso (fase trombótica: dia 0-3) (2). Esses microtrombos, bem como a lesão por estiramento da parede do vaso, atraem células inflamatórias, tais como macrófagos e linfócitos, que migram a partir da corrente sanguínea e também a partir da *vasa vasorum* (fase de recrutamento: dia 3-8). Essas células inflamatórias estimulam a produção de vários fatores de crescimento e citocinas localmente, que ativam as adormecidas (G0 fase) células musculares lisas vasculares e também, possivelmente, recrutam as células-tronco circulantes para reentrar no ciclo celular e replicar. Esta proliferação de células musculares lisas, subseqüentemente, migra para dentro da íntima e trombo no lúmen do vaso e, eventualmente, formam uma camada neointimal dentro do lúmen do vaso (fase proliferativa: dia 8, a cura) . Mesmo

que a proliferação celular cesse em menos de 2 semanas, após a lesão inicial, essas células musculares lisas continuam a produzir matriz extracelular abundante, o que leva ao aumento do volume da neointima. Se esse processo de crescimento neointimal for exuberante e significativo, teremos o desenvolvimento de reestenose intra stent (3). Como uma lesão da parede vascular profunda estimula um maior grau de hiperplasia miointimal, a lesão de implantação do stent, na verdade, pode induzir o crescimento do tecido mais neointimal do que a lesão por balão de angioplastia (4).

É bem conhecido, a partir de observações experimentais e clínicas, que locais de supregulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias nas células musculares lisas (SMCs) ativadas contribuem, significativamente, para a restenose após angioplastia com balão e implante de stent. (5,6).

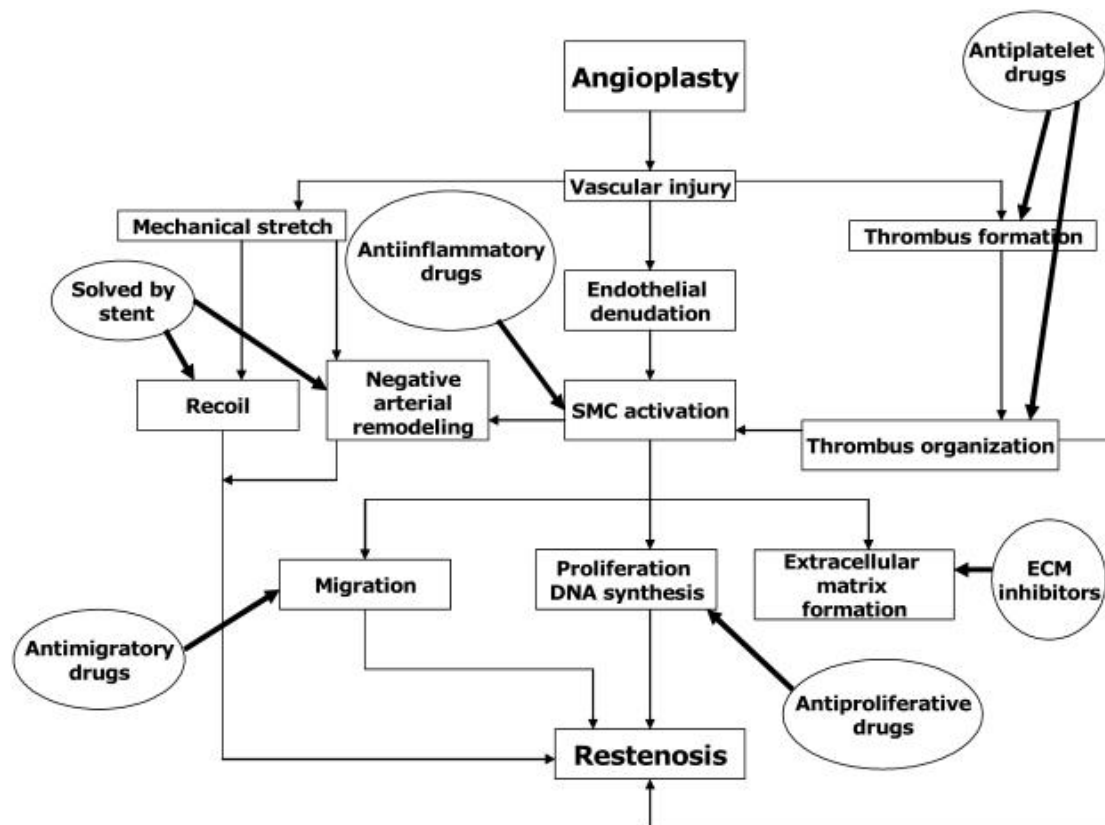
Quando uma angioplastia coronariana é realizada em pacientes com Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), outros fatores podem ativar várias citocinas pro-inflamatórias e fatores de crescimento, incluindo o TNF, IL-1, IL-6 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) estão expressas em ambas as regiões infartadas e não-infartadas do coração, e seus níveis plasmáticos estão elevados por 2 semanas após o IAM, (7-11) levantando a possibilidade de que eles, também, contribuam para a hiperplasia neointimal.

Descobertas recentes sugerem que 2 linhagens de células musculares lisas neointimais estão envolvidas na remodelação vascular após a lesão: uma linhagem medial, cuja ativação é desencadeada por várias citocinas pró-inflamatórias (o cenário clássico) e linhagem da medula óssea, recentemente identificada, derivada da linhagem de células-tronco hematopoiéticas (12,13); parece, agora, que as células hematopoiéticas e células progenitoras



endoteliais são liberados a partir da medula óssea para a circulação periférica durante a fase precoce do IAM (14, 15).

O processo descrito anteriormente está ilustrado na figura abaixo:



\* Adaptado de Liu Vasc Health Risk Manag. 2005

O endotélio apresenta um papel central na manutenção do equilíbrio vascular, através dos efeitos anti-inflamatório e anticoagulante das células endoteliais (17). Foi demonstrado, em modelo de angioplastia de carótida em ratos com cateter balão, que o primeiro evento que permite a migração e proliferação das células musculares lisas da camada média para a íntima é a ruptura da lâmina elástica interna (LEI)(18,19). Nesse estudo, citado, a proliferação da CMLV teve grande correlação com a ruptura da LEI, que ocorreu em 40% dos animais submetidos a angioplastia (Figura 2). Por outro lado, quando a LEI permaneceu intacta, a formação de neointima foi mínima.

Outro dado importante foi a demonstração do remodelamento negativo da artéria carótida de ratos após a angioplastia com cateter (18).

A proliferação das células musculares lisas é proporcional ao grau de lesão vascular. Modelo de angioplastia com balão de Fogarty em carótida de ratos demonstrou proliferação de CMLV em 100% dos casos. Foram realizadas três passagens do balão no vaso com diferentes níveis de pressão de insuflação: 0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2 atm. Análises histológica e molecular através da medida do RNA do proto-oncogene c-Fos (ativado durante a proliferação das CMLV) demonstraram que o grau de proliferação neointimal é proporcional à pressão de insuflação do balão (20).

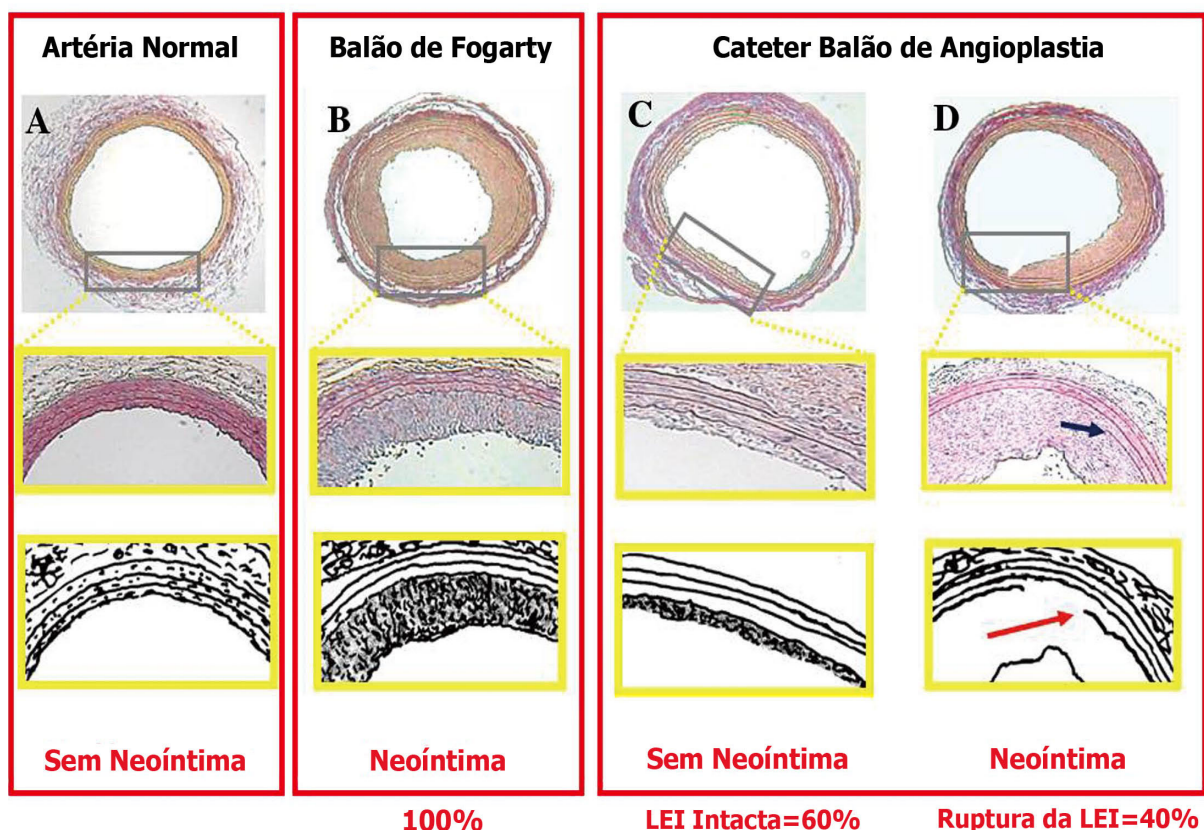
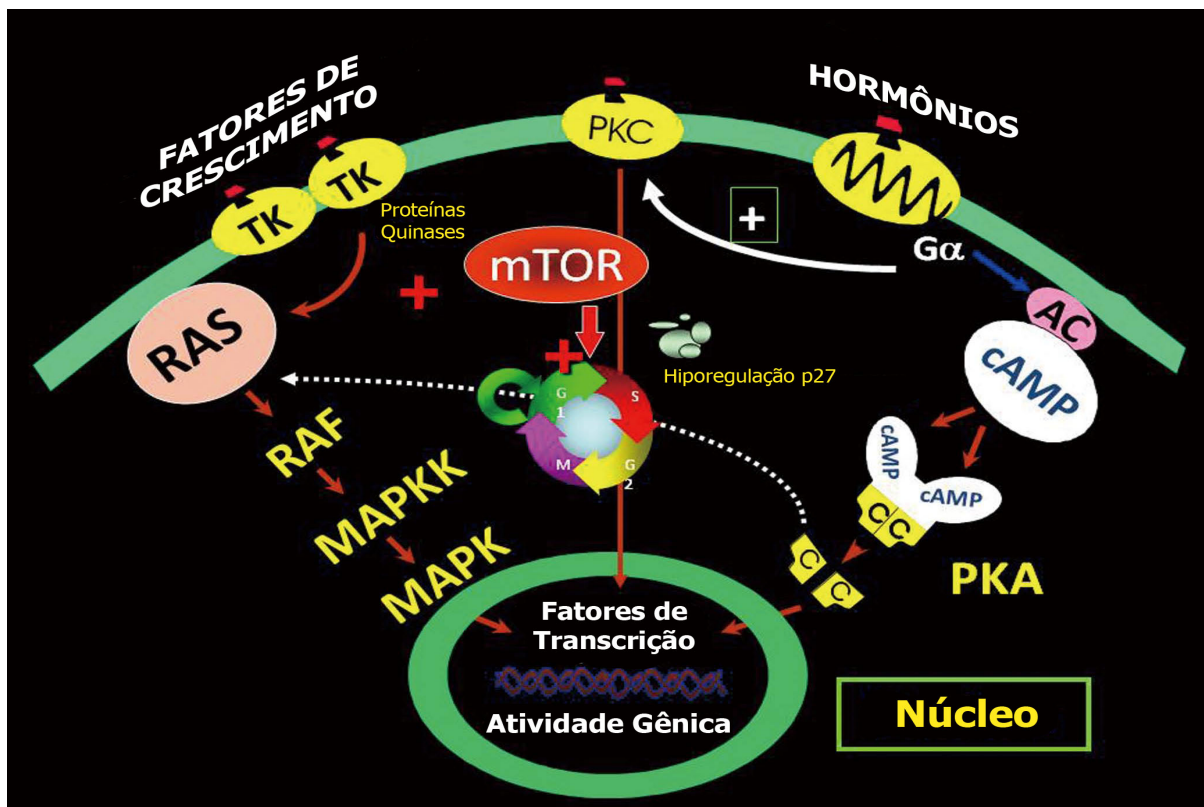


Figura 2 - Fisiopatologia da reestenose após lesão vascular com balão. Cortes histológicos representativos: primeiro, com coloração de Van Gieson x100; no meio, hematoxilina-eosina x400; por último, com desenhos esquemáticos x400. Artéria carótida comum de rato sem lesão por balão (A), após lesão com balão de Fogarty 2 Fr (B), após lesão com cateter balão (C) e após 28 dias de lesão com cateter balão (D). A lesão do balão de Fogarty 2 Fr provocou a formação de neointima

homogênea sem a ruptura da lâmina elástica interna (LEI) (B). O cateter balão provocou formação insignificante de neointima quando a LEI permaneceu intacta (C). Lesão neointimal excêntrica foi observada quando houve ruptura da LEI (setas) (D).

As principais vias comuns intracelulares que utilizam múltiplos receptores para transmitir os sinais mitogênicos da membrana para o núcleo na CMLV, após lesão arterial induzida por cateter balão ou stent, estão sumarizadas na figura 3 (21,22). A inibição da proliferação da CMLV pode ser atingida bloqueando a via Ras-Raf-MAPK (23,24) ou ativando a sinalização da proteína quinase A dependente de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) (25,26).



Adaptado de Curcio, *Circulation Journal*, 2011.

Figura 3 - Mecanismos moleculares de proliferação das células musculares lisas vasculares. Uma vez ativado, o receptor de tirosina-quinase desencadeia uma cascata de fosforilações de tirosina, que levam à formação de um complexo ternário de ligação ao receptor da proteína RAS. A RAS ativa liga a serina da proteína quinase RAF [também chamada MEKK ou

MAPKKK (proteína quinase quinase quinase ativada por mitógeno)], que ativa a MAPKK/MEK (proteína quinase quinase ativada por mitógeno). Essa cascata culmina na ativação dos fatores de transcrição nucleares. No outro lado da figura, o receptor de sete segmentos transmembrana, após ligação do hormônio, ativa a cascata de proteína G heterotrimérica. A G $\alpha$  (ligação ao GTP) ativa a adenilato ciclase (AC), o que aumenta a produção da adenosina monofosfato cíclica (cAMP). A cAMP liga a enzima tetramérica da proteína quinase A (PKA) e dissocia a enzima, liberando a subunidade catalítica ativada (C), que fosforila vários substratos no citoplasma, incluindo a RAF. Uma fração de C migra para o núcleo, onde estimula a transcrição de vários genes responsivos à cAMP, levando à supressão ou à estimulação do crescimento celular.

A Cirurgia Vascular reconstrutiva tem enfrentado, na sua história, um fenômeno biológico complexo, comprometendo os resultados dos procedimentos abertos ou endovasculares. A hiperplasia miointimal e fibroplasia da anastomose, desenvolvido na anastomose vascular ou em seguida à angioplastia por balão, leva, muitas vezes, a uma oclusão vascular e insuficiência da revascularização. Diversas pesquisas têm sido dedicadas, ao longo dos anos, ao estudo dos mecanismos envolvidos no processo e tentativas de controlar o fenômeno por agentes farmacoterapêuticos; os resultados, porém, ainda estão longe de serem considerados satisfatórios. (27) Em virtude da necessidade do bloqueio desse fenômeno, existem, no momento, várias pesquisas em busca de novas substâncias que possam impedir tal resposta e, conseqüentemente, a falha dos tratamentos de revascularização, sejam eles por cirurgias convencionais ou por terapias minimamente invasivas.

Muitos agentes com propriedades anti-inflamatórias ou antiproliferativas foram incorporados na superfície do stent e testados clinicamente. Muitos desses agentes têm mais do que um mecanismo de ação. O mecanismo geral de ação, para a maioria destas drogas, é parar a progressão do ciclo celular por inibição da síntese de DNA. Everolimus,

sirolimus, tacrolimus (FK-506), ABT-578, interferon, dexametasona, ciclosporina, todos se enquadram nessa categoria. Nesse grupo, Sirolimus e seus derivados mostraram efeitos redutor no espessamento da íntima (28,29). Dexametasona revestido Biodivysio stent também mostrou um ligeiro e moderado benefício na redução da reestenose (30). O paclitaxel foi aprovado para uso clínico e ABT-578 também parece promissora (16). Angiopeptina e c-myc têm sido testados em ensaios clínicos. Os inibidores de migração (por exemplo, o batimastat) são destinados a prevenir a célula de músculo liso de migrar para o interior do vaso. Se as células musculares lisas migrarem para o lado luminal do stent, elas podem produzir matriz extracelular e estreitar o lúmen vascular (31). Portanto, a inibição da migração de células musculares lisas pode ter aplicações terapêuticas para a prevenção da reestenose. Exemplos destes compostos são batimastat e halofuginona. Batimastat inibe enzimas metaloproteinases da matriz e previne a degradação da matriz o que é necessário para as células a libertarem-se para se moverem e invadirem a área do vaso. No entanto, um estudo clínico utilizando batimastat-stent revestido não conseguiu demonstrar uma redução na taxa de reestenose, quando comparado com Stents. Fatores de cura melhorados promover a cicatrização do local de implantação do stent, reduzindo a agregação plaquetária e aumentando a taxa de reendotelização (16). Estradiols e compostos doadores de óxido nítrico podem também replicar este efeito (Abizaid 2003; Constantini, 2003).

Uma abordagem única de promover o processo de cura tem sido a utilização de anticorpos CD34 em stents revestidos com a fim de capturar as células progenitoras endoteliais circulantes. Neste modelo, experimental, a

superfície do STENT foi completamente reendothelializada dentro de 48 horas após a implantação do stent. Um primeiro ensaio clínico humano usando stent revestido de anticorpos CD34 foi completado com um resultado de segurança e de viabilidade no tratamento da reestenose da artéria coronária (16). Portanto, um agente ideal deve exercer efeitos antireestenóticos suficientes, mas também permitir reendotelização e cura adequada do vaso no local do tratamento. Ele também deve ter efeitos insignificantes ou não ter efeitos sistêmicos (32-34). Apenas 2 agentes antiproliferativos, sirolimus e paclitaxel, têm provado ser eficazes em ensaios clínicos até a data (33,34). Sirolimus (rapamicina), um produto de fermentação de *Streptomyces hygroscopicus*, foi descoberto em 1977 como um antibiótico macrolídeo antifúngico com potentes propriedades imunossupressoras. Sirolimus é uma molécula lipofílica, que prontamente se difunde através das membranas celulares de células musculares lisas vasculares e leucócitos. Uma vez no citoplasma, o composto se liga com elevada afinidade a uma proteína intracelular específica (FKBP12), e o complexo resultante inibe uma enzima reguladora, chamado TOR (alvo da rapamicina). Em última análise bloqueia a progressão do ciclo celular de G1 para a fase S e, portanto, limita a replicação do músculo liso e proliferação (29,32,35).

O paclitaxel é um agente antineoplásico, originalmente isolado a partir da casca da árvore teixo do Pacífico, *Taxus brevifolia*. Foi aprovado pelo FDA para o tratamento de câncer de mama e de ovário em 1992. É também uma molécula lipofílica que prontamente se difunde através das membranas celulares e tem um potente efeito de estabilização de microtúbulos. Uma vez que a desmontagem de microtúbulos é essencial para a progressão da fase

G2 para M no ciclo celular mitótico, a estabilização de microtúbulos inibe a mitose das células do músculo liso, bem como inibe a migração celular. Isso reduz a infiltração de células musculares lisas vasculares e leucócitos para a zona de lesão causada por stent (36,37).

A curto prazo, a exposição ao paclitaxel, obviamente, bloqueia os primeiros eventos de crescimentos iniciais que são cruciais para a formação neointimal subsequente. A revogação exclusiva desta proliferação prematura é suficiente para prevenir restenose. O grau de redução na formação de neoíntima é pelo menos comparável ao obtido com libertação da droga sustentada de stents (38). O balão eluidor de droga revestida foi superior ao stent farmacológico em relação ao melhor resultado angiográfico obtido e foi associado com menos eventos clínicos adversos (39).

Dados experimentais (38) e as primeiras experiências clínicas mostraram que a inibição da hiperplasia neointimal podem ser obtidos por administração local de drogas antiproliferativas (como paclitaxel) carregadas sobre a superfície de balões de angioplastia (39-41). Por conseguinte, os balões eluidores de medicamentos são uma ferramenta promissora para prevenir a restenose e evitar a persistência indesejável dos polímeros dos STENTS Eluidores de Drogas na parede do vaso, aumentando assim, potencialmente, a segurança da intervenção coronariana percutânea(41).

A *Moringa oleifera*, Lam (*M. oleifera*), também conhecido como *Moringa pterygosperma* Gaertn, é um membro da família de plantas Moringaceae angiospermas perenes, que inclui 12 outras espécies (42). Nativa das partes sub-Himalaia do norte da Índia, é cultivado em todas as áreas tropicais e subtropicais do mundo, onde é conhecido por vários nomes

populares (43): árvore de baqueta, árvore de rábano, e malunggay, sendo o mais comumente encontrado na literatura.

*Moringa oleifera* é uma planta comestível e uma grande variedade de propriedades nutricionais e medicinais tem sido atribuída às suas raízes, cascas, folhas, flores, frutos e sementes (43-45). Análises fitoquímicas têm mostrado que as folhas são particularmente ricas em potássio, cálcio, fosfato, fósforo, ferro, vitaminas A e D, aminoácidos essenciais, bem como conhecidos antioxidantes, como  $\beta$ -caroteno, vitamina C, e flavonoides (46-50).

O uso terapêutico de partes de *M. oleifera*, na Índia, remonta à Antiguidade. Em outras partes do mundo, na África subsahariana, em particular, tal uso não parece ter sido conhecido pelo grande público, como está sendo promovida por diversas organizações como uma oportunidade inexplorada (51,52).

Quase todas as partes desta árvore têm sido bastante consumidas por seres humanos e utilizadas para diversos fins domésticos como: o cultivo em alamedas, forragem animal, biogás, agente de limpeza doméstica, corante azul, fertilizantes, nutrientes foliar, adubação verde, goma (a partir de troncos de árvores ), mel e cana de açúcar, suco clarificador (pó de sementes), plantações ornamentais, biopesticida, celulose, corda, tanino para curtimento de peles, purificação de água, lubrificante (óleo), fabricação de perfumes e produtos de cuidados capilares(53).

Além da culinária e outros usos domésticos, várias propriedades biológicas atribuídas a várias partes desta árvore foram revistas no passado (44,54). As folhas de *M. oleifera* foram relatadas como sendo uma valiosa



fonte de macro e micronutrientes, sendo considerada uma fonte rica de proteína  $\beta$ -caroteno, vitamina C, cálcio e potássio e agir como uma boa fonte de antioxidantes naturais, melhorando assim a vida de prateleira de alimentos que contém gordura (55, 56]. Frutas (vagem), caule e folhas têm sido usadas para combater a desnutrição, especialmente entre crianças e lactantes para aumentar a produção de leite (55, 57) e também regular o desequilíbrio hormonal da tireóide (58).

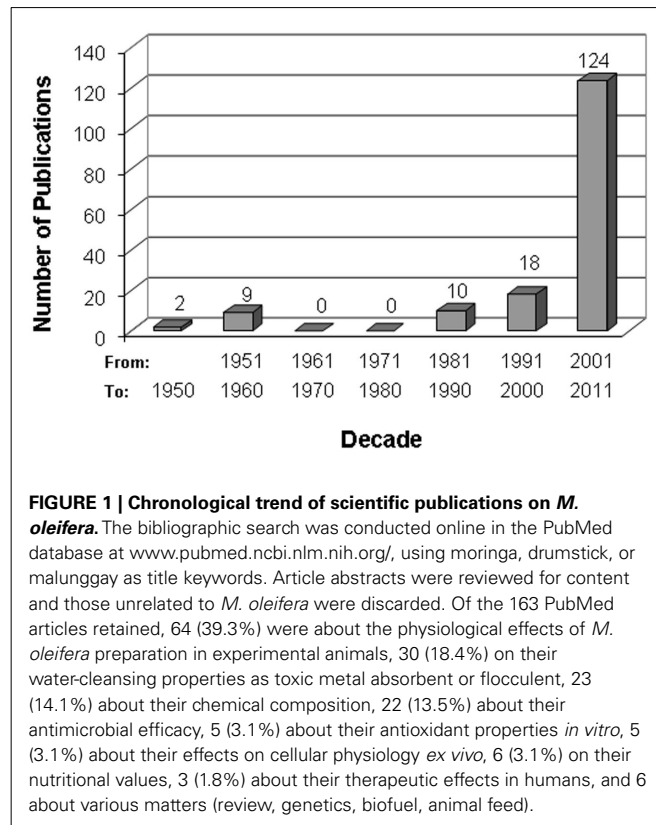
Um número de propriedades medicinais atribuídas a diferentes partes da Moringa foram reconhecidos por ambos os sistemas de Ayurveda e Unani de medicamentos (59). A planta encontra a sua ampla aplicabilidade no tratamento de doenças cardiovasculares; suas raízes, folhas, flores, goma e sementes têm nitrito, glicosidos, óleo de mostarda, e glicosídeos tiocarbamato como componentes. Esses produtos químicos são sugeridos para ser utilizados em Medicina Alternativa e Complementar Baseada em Evidências, pelos seus efeitos diurético, de redução do colesterol, antiulcerosos, hepatoprotetor, e de propriedade de proteção cardiovascular da árvore (60). As raízes parecem possuir atividade anti-espasmódica, através do bloqueio dos canais de cálcio que constitui a base para a sua utilização tradicional nos casos de diarreia (61,62). Também possui atividade antimicrobiana, devido à sua pterygospermin como princípio ativo. O sumo de folha fresca já foi usado para inibir o crescimento de patógenos humanos como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (63). Fitoconstituintes de diferentes partes da árvore como niazimicina, niainina, vários carbamatos e thiocarba, têm demonstrado exibir atividade antitumoral *in vitro* (64-66). As flores mostram efeito hepatoprotetor eficaz devido à

presença de quercetina (60). As sementes são utilizadas como bioissorvente para a remoção de cádmio a partir de meio aquoso e são um dos coagulantes naturais, mais conhecidas naturais descobertos até agora (67,68).

A flor da moringa tem alto valor medicinal como estimulante central, afrodisíaco, abortivo, anti-inflamatório, age em doenças musculares, tem ação antitumoral, diminui o colesterol sérico, triglicérides, VLDL, LDL, melhora o índice aterogênico, diminui o perfil lipídico no coração, no fígado e na aorta de coelhos hipercolesterolêmicos, aumenta a excreção fecal de colesterol. Já a folha tem efeito purgativo, aplicado como cataplasma para feridas; foi usada para dores de cabeça, bem como para hemorróidas, febre, dor de garganta, bronquite e infecções de olhos e ouvidos, escorbuto e catarro; acredita-se que o suco da folha é eficiente para controlar os níveis de glicose. (44)



No PUBMED existe um número crescente de publicações envolvendo atividades medicinais da Moringa, demonstrado no gráfico a seguir



**Tendência cronológica de publicações científicas sobre *M. oleifera*.** A pesquisa bibliográfica foi realizada online na base de dados PubMed em [www.pubmed.ncbi.nlm.nih.org/](http://www.pubmed.ncbi.nlm.nih.org/), usando moringa, pilão, ou malunggay como palavras-chave do título. Resumos dos artigos foram revistos para o conteúdo e, os não relacionados com *M. oleifera*, foram descartados. Dos 163 artigos PubMed retidos, 64 (39,3%) eram sobre os efeitos fisiológicos de preparação de *M. oleifera* em animais experimentais; 30 (18,4%) na sua propriedade de limpeza da água como absorvente metal tóxico ou flocculento; 23 (14,1%) sobre sua composição química; 22 (13,5%) sobre a sua eficácia antimicrobiana; 5 (3,1%) sobre as suas propriedades antioxidantes *in vitro*; 5 (3,1%) sobre os seus efeitos sobre a fisiologia celular *ex vivo*; 6 (3,1%) sobre os seus valores nutricionais; 3 (1,8%) sobre os seus efeitos terapêuticos em seres humanos e 6 sobre vários assuntos (revisão, genética, alimentação, biocombustível animal).

Dessa forma é relevante responder a seguinte pergunta de pesquisa:

qual a diferença de frequência de hiperplasia miointimal pós-angioplastia na artéria ilíaca de coelhos com aterosclerose experimental tratados e não tratados com extrato das folhas da *Moringa oleifera* ?

## OBJETIVO

Determinar a diferença de frequência de hiperplasia miointimal pós-angioplastia na artéria ilíaca de coelhos com aterosclerose experimental tratados e não tratados com extrato das folhas da *Moringa oleifera*.

## BIBLIOGRAFIA

1. Il'inskaia OP, Antropova IuG, Kalinina NI, Mishina VA, Tararak M, Smirnov VN. A new concept of development of neointimal hyperplasia. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 2004 Oct;90(10):1203-14. PMID: 15628176.
2. Liu MW, Roubin GS, King SB 3rd. Restenosis after coronary angioplasty potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation*. 1989 Jun;79(6):1374-87. PMID: 2524293.
3. Schwartz RS, Henry TD. Pathophysiology of coronary artery restenosis. *Rev Cardiovasc Med*. 2002;3 Suppl 5:S4-9. PMID: 12478229.
4. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol*. 1992 Feb;19(2):267-74. PMID: 1732351.
5. Serrano CV Jr., Ramires JA, Venturinelli M, Arie S, D'Amico E, Zweier JL, Pileggi F, da Luz PL. Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression. Evidence of inflammatory responses in coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29:1276 –83. PMID: 9137224
6. Wu L, Iwai M, Nakagami H, Li Z, Chen R, Suzuki J, Akishita M, de Gasparo M, Horiuchi M. Roles of angiotensin II type 2 receptor stimulation associated with selective angiotensin II type 1 receptor blockade with valsartan in the improvement of inflammation-induced vascular injury. *Circulation*. 2001 Nov 27;104(22):2716-21. PMID: 11723025.
7. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2002 Jan;53(1):31-47. PMID: 11744011.
8. Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, Liu P. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation*. 1999 Mar 23;99(11):1492-8. PMID: 10086975.
9. Kukielka GL, Smith CW, Manning AM, Youker KA, Michael LH, Entman ML. Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium. Potential role in postreperfusion inflammatory injury. *Circulation*. 1995 Oct 1;92(7):1866-75. PMID: 7671371.
10. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med*. 2000 Mar 2;342(9):626-33. PMID: 10699162.

11. Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, flk-1, andflt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol.* 1996 May;270(5 Pt 2):H1803-11. PMID: 8928889.
12. Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhsa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med.* 2002 Apr;8(4):403-9. PMID: 11927948.
13. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 Jan 14;340(2):115-26. PMID: 9887164.
14. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001 Jun 12;103(23):2776-9. PMID: 11401930.
15. Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, De Ferrari GM, Ferlini M, Goffredo L, Bertolotti A, Klersy C, Pecci A, Moratti R, Tavazzi L. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood.* 2005 Jan 1;105(1):199-206. Epub 2004 Sep 2. PMID: 15345590.
16. Htay T, Liu MW. Drug-eluting stent: a review and update. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1(4):263-76. PMID: 17315599; PMCID: PMC1993957.
17. Fuke S, Maekawa K, Kawamoto K, Saito H, Sato T, Hioka T, Ohe T. Impaired endothelial vasomotor function after sirolimus-eluting stent implantation. *Circ J.* 2007 Feb;71(2):220-5. PMID: 17251671.
18. Indolfi C, Torella D, Coppola C, Stabile E, Esposito G, Curcio A, Pisani A, Cavuto L, Arcucci O, Cireddu M, Troncone G, Chiariello M. Rat carotid artery dilation by PTCA balloon catheter induces neointima formation in presence of IEL rupture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Aug;283(2):H760-7. PMID: 12124225.
19. Indolfi C, Curcio A, Chiariello M. Simvastatin reduces neointimal thickening after experimental angioplasty. *Circulation.* 2003 Jan 28;107(3):e25. PMID: 12551884.
20. Indolfi C, Esposito G, Di Lorenzo E, Rapacciuolo A, Feliciello A, Porcellini A, Avvedimento VE, Condorelli M, Chiariello M. Smooth muscle cell proliferation is proportional to the degree of balloon injury in a rat model of angioplasty. *Circulation.* 1995 Sep 1;92(5):1230-5. PMID: 7648670.
21. Mongiardo A, Curcio A, Spaccarotella C, Parise S, Indolfi C. Molecular mechanisms of restenosis after percutaneous peripheral angioplasty and approach to endovascular therapy. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2004 Sep;4(3):275-87. PMID: 15379621.

22. Indolfi C, Coppola C, Torella D, Arcucci O, Chiariello M. Gene therapy for restenosis after balloon angioplasty and stenting. *Cardiol Rev.* 1999 Nov-Dec;7(6):324-31. PMID: 11208244.
23. Indolfi C, Avvedimento EV, Rapacciuolo A, Di Lorenzo E, Esposito G, Stabile E, Feliciello A, Mele E, Giuliano P, Condorelli G, et al. Inhibition of cellular ras prevents smooth muscle cell proliferation after vascular injury in vivo. *Nat Med.* 1995 Jun;1(6):541-5. PMID: 7585120.
24. Indolfi C, Avvedimento EV, Rapacciuolo A, Esposito G, Di Lorenzo E, Leccia A, Pisani A, Chieffo A, Coppola A, Chiariello M. In vivo gene transfer: prevention of neointima formation by inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase. *Basic Res Cardiol.* 1997 Dec;92(6):378-84. PMID: 9464861.
25. Indolfi C, Avvedimento EV, Di Lorenzo E, Esposito G, Rapacciuolo A, Giuliano P, Grieco D, Cavuto L, Stingone AM, Ciullo I, Condorelli G, Chiariello M. Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nat Med.* 1997 Jul;3(7):775-9. PMID: 9212106.
26. Indolfi C, Stabile E, Coppola C, Gallo A, Perrino C, Allevato G, Cavuto L, Torella D, Di Lorenzo E, Troncone G, Feliciello A, Avvedimento E, Chiariello M. Membrane-bound protein kinase A inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo by amplifying cAMP-protein kinase A signals. *Circ Res.* 2001 Feb 16;88(3):319-24. PMID: 11179200.
27. Dinis da Gama A. New trends in the prevention of myointimal hyperplasia and anastomotic fibroplasia. *Rev Port Cir Cardiorac Vasc.* 2007 Oct-Dec;14(4):211-5. Review. Portuguese. PubMed PMID: 18408819.
28. Sousa JE, Costa MA, Abizaid AC, Rensing BJ, Abizaid AS, Tanajura LF, Kozuma K, Van Langenhove G, Sousa AG, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. *Circulation.* 2001 Oct 23;104(17):2007-11. PMID: 11673337.
29. Sousa JE, Costa MA, Sousa AG, Abizaid AC, Seixas AC, Abizaid AS, Feres F, Mattos LA, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Two-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up after implantation of sirolimus-eluting stents in human coronary arteries. *Circulation.* 2003 Jan 28;107(3):381-3. PMID: 12551858.
30. Liu MW, Parks JM, Cox DA et al. Intervencional cardiovascular medicine, principles ando practice. In:Vascular biology of mechanical intervention. 2<sup>nd</sup> ed 2002. Phipladelphia: Churchill Livingstone.
31. Tanabe, K, Regar, E, Lee, CH, Hoye A, Giessen WJ, Serruys PW. Local Drug Delivery Using Coated Stents: New Developments and Future Perspectives. *Current Pharmaceutical Design.* 2004 Feb 01;10(4):357-67.



32. Marx SO, Marks AR. Bench to bedside: the development of rapamycin and its application to stent restenosis. *Circulation*. 2001 Aug 21;104(8):852-5. PMID: 11514367.
33. Sousa JE, Serruys PW, Costa MA. New frontiers in cardiology: drug-eluting stents: Part I. *Circulation*. 2003 May 6;107(17):2274-9. PMID: 12732594.
34. Sousa JE, Serruys PW, Costa MA. New frontiers in cardiology: drug-eluting stents: Part II. *Circulation*. 2003 May 13;107(18):2383-9. PMID: 12742968.
35. Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubman MB, Marks AR. Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *J Clin Invest*. 1996 Nov 15;98(10):2277-83. PMID: 8941644; PMCID: PMC507677.
36. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*. 1979 Feb 22;277(5698):665-7. PMID: 423966.
37. Sollott SJ, Cheng L, Pauly RR, Jenkins GM, Monticone RE, Kuzuya M, Froehlich JP, Crow MT, Lakatta EG, Rowinsky EK, et al. Taxol inhibits neointimal smooth muscle cell accumulation after angioplasty in the rat. *J Clin Invest*. 1995 Apr;95(4):1869-76. PMID: 7706494; PMCID: PMC295730.
38. Scheller B, Speck U, Abramjuk C, Bernhardt U, Böhm M, Nickenig G. Paclitaxel balloon coating, a novel method for prevention and therapy of restenosis. *Circulation*. 2004 Aug 17;110(7):810-4. PMID: 15302790.
39. Unverdorben M, Vallbracht C, Cremers B, Heuer H, Hengstenberg C, Maikowski C, Werner GS, Antoni D, Kleber FX, Bocksch W, Leschke M, Ackermann H, Boxberger M, Speck U, Degenhardt R, Scheller B. Paclitaxel-coated balloon catheter versus paclitaxel-coated stent for the treatment of coronary in-stent restenosis. *Circulation*. 2009 Jun 16;119(23):2986-94. PMID: 19487593.
40. Scheller B, Hehrlein C, Bocksch W, Rutsch W, Haghi D, Dietz U, Böhm M, Speck U. Treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter. *N Engl J Med*. 2006 Nov 16;355(20):2113-24. PMID: 17101615.
41. Scheller B, Hehrlein C, Bocksch W, Rutsch W, Haghi D, Dietz U, Böhm M, Speck U. Two year follow-up after treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter. *Clin Res Cardiol*. 2008 Oct;97(10):773-81. PMID: 18536865.
42. Olson ME. Combining data from DNA sequences and morphology for a phylogeny of Moringaceae (Brassicales). *Syst. Bot*. 2002 Jan-Mar;27(1):55-73.

43. Ramachandran C, Peter KV, Gopalakrishnan PK. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. *Econ. Bot.* 1980; 34(3), 276–83.
44. Anwar F, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytother Res.* 2007 Jan;21(1):17-25.
45. Kumar PS, Mishra D, Ghosh G, Panda GS. Medicinal uses and pharmacological properties of *Moringa oleifera*. *Int. J. Phytomed.* 2010; 2, 210–6.
46. Bennett RN, Mellon FA, Foidl N, Pratt JH, Dupont MS, Perkins L, Kroon PA. Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (horseradish tree) and *Moringa stenopetala* L. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51(12), 3546–53.
47. Aslam M, Anwar F, Nadeem R, Rashid U, Kazi TG, Nadeem M. Mineral Composition of *Moringa oleifera* Leaves and Pods from Different Regions of Punjab, Pakistan *Asian Journal of Plant Sciences* 2005; 4(4), 417-21.
48. Manguro LO, Lemmen P. Phenolics of *Moringa oleifera* leaves. *Nat. Prod. Res.* 2007; 21, 56–68.
49. Amaglo NK, Bennett RN, Lo Curto RB, Rosa EAS, Lo Turco V, Giuffrida A, Lo Curto A, Crea F, Timpo GM. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. *Food Chemistry* 15 October 2010; 122(4), 1047-54.
50. Gowrishankar R, Kumar M, Menon V, Divi SM, Saravanan M, Magudapathy P, Panigrahi BK, Nair KG, Venkataramaniah K. Trace element studies on *Tinospora cordifolia* (Menispermaceae), *Ocimum sanctum* (Lamiaceae), *Moringa oleifera* (Moringaceae), and *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae) using PIXE. *Biol. Trace Elem. Res.* 2010; 133(3), 357–63.
51. Thurber MD, Fahey, JW. Adoption of *Moringa oleifera* to combat under-nutrition viewed through the lens of the “diffusion of innovations” theory. *Ecol. Food Nutr.* 2009 May-Jun; 48(3), 212–25.
52. Torimiro DO, Odeyinka SM, Okorie VO, Akinsuyi MA. Gender analysis of socio-cultural perception of *Moringa oleifera* amongst farmers in southwestern Nigeria. *J. Int. Womens Stud.* 2009 Jun ;10, 188–202.
53. Fuglie LJ. The Miracle Tree: *Moringa oleifera* Natural Nutrition for the tropics. Church World Service. 1999. Dakar, Senegal.
54. Fahey JW. *Moringa oleifera*: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. *Tree for Life Journal.* 2005 Dec 01;01;1-5.

55. Dillard CJ, German JB. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J. Sci. Food Agric.* 2000 Sep 15;80(12):1744–56.
56. Siddhuraju P, Becker K. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J Agric Food Chem.* 2003 Apr 9;51(8):2144-55. PMID: 12670148.
57. Estrella MCP, Mantarin JBV, David GZ, Taup MA. A double-blind, randomized controlled trial on the use of malunggay (*moringa oleifera*) for augmentation of the volume of breastmilk: among non-nursing of preterm infants. *Phil J Pediatrics* 2000 Jan-Mar; 49 (1) 3-6
58. Tahiliani P, Kar A. Role of *Moringa oleifera* leaf extract in the regulation of thyroid hormone status in adult male and female rats. *Pharmacol Res.* 2000 Mar;41(3):319-23. PMID: 10675284.
59. Pal SK, Mukherjee PK, Saha K, Pal M, Saha BP. Antimicrobial action of the leaf extract of *moringa oleifera* lam. *Anc Sci Life.* 1995 Jan;14(3):197-9. PMID: 22556699; PMCID: PMC3331240.
60. Luqman S, Srivastava S, Kumar R, Maurya AK, Chanda D. Experimental Assessment of *Moringa oleifera* Leaf and Fruit for Its Antistress, Antioxidant, and Scavenging Potential Using In Vitro and In Vivo Assays. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:12p. PMID: 22216055; PMCID: PMC3247066.
61. Cáceres A, Saravia A, Rizzo S, Zabala L, De Leon E, Nave F. Pharmacologic properties of *Moringa oleifera*. 2: Screening for antispasmodic, antiinflammatory and diuretic activity. *J Ethnopharmacol.* 1992 Jun;36(3):233-7. PMID:1434682.
62. Faizi S, Siddiqui BS, Saleem R, Siddiqui S, Aftab K, Gilani AH. Isolation and structure elucidation of new nitrile and mustard oil glycosides from *Moringa oleifera* and their effect on blood pressure. *J Nat Prod.* 1994 Sep;57(9):1256-61. PMID: 7798960.
63. Cáceres A, Cabrera O, Morales O, Mollinedo P, Mendia P. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* 1991 Jul;33(3):213-6. PMID: 1921416.
64. Murakami A, Kitazono Y, Jiwajinda S, Koshimizu K, Ohigashi H. Niaziminin, a thiocarbamate from the leaves of *Moringa oleifera*, holds a strict structural requirement for inhibition of tumor-promoter-induced Epstein-Barr virus activation. *Planta Med.* 1998 May;64(4):319-23. PMID: 9619112.
65. Guevara AP, Vargas C, Sakurai H, Fujiwara Y, Hashimoto K, Maoka T, Kozuka M, Ito Y, Tokuda H, Nishino H. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. *Mutat Res.* 1999 Apr 6;440(2):181-8. PMID: 10209341.

66. Bharali R, Tabassum J, Azad MR. Chemomodulatory effect of *Moringa oleifera*, Lam, on hepatic carcinogen metabolising enzymes, antioxidant parameters and skin papillomagenesis in mice. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2003 Apr-Jun;4(2):131-9. PMID: 12875626.
67. Ndabigengesere A, Narasiah KS, Talbot BG. Activeagents and mechanism of coagulation of turbidwaters using *Moringaoleifera*. *Water Research* 1995 Feb;29(2):703-10.
68. Ghebremichael KA, Gunaratna KR, Henriksson H, Brumer H, Dalhammar G. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Water Res*. 2005 Jun;39(11):2338-44. PMID: 5921719.

## ARTIGO EM PORTUGUÊS

### **Diferença da hiperplasia miointimal em coelhos submetidos a angioplastia e tratados com *Moringa oleifera*.**

Jânio Cipriano Rolim<sup>1</sup>; Manoel Ricardo Sena Nogueira<sup>2</sup>; Paulo Roberto da Silva Lima<sup>3</sup>; Francisco Chavier Vieira Bandeira<sup>4</sup>; Mizael Pordeus Bezerra<sup>5</sup>; Aldemar Araújo Castro<sup>6</sup>; Guilherme Benjamin Pitta<sup>7</sup>; Adamastor Humberto Pereira<sup>8</sup>; Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz<sup>9</sup>

1. Cirurgião vascular, pós graduando do mestrado acadêmico em Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
2. Cirurgião vascular, pós graduando do mestrado acadêmico em Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
3. Cirurgião vascular, pós graduando do doutorado Renorbio, Universidade Federal de Alagoas, Brasil.
4. Cirurgião vascular, pós graduando do doutorado Renorbio, Universidade Federal de Alagoas, Brasil.
5. Cirurgião vascular
6. Cirurgião vascular, professor assistente. Universidade Estadual de Ciências do estado de Alagoas, Brasil.
7. Cirurgião vascular, professor adjunto. Orientador, Departamento de Cirurgia, curso de pós-graduação em Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
8. Cirurgião vascular, professor adjunto. Orientador, Departamento de Cirurgia, curso de pós-graduação em Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
9. Médica e farmacêutica, Professora associada IV da Universidade Federal da Paraíba, Brasil.

Correspondência:

Jânio Cipriano Rolim

Rua Projetada Qd 08 Lt 03 – Condomínio Villas do Lago – Patos – Paraíba.

Brasil CEP: 58700-000

e-mail: janio\_rolim@hotmail.com

## RESUMO

**1.Contexto.** A hiperplasia miointimal é caracterizada pelo acúmulo de células e de matrix extracelular na camada íntima de artérias, veias, que sofreram lesão endotelial, e ainda em enxertos vasculares autólogos ou heterólogos. É uma das principais causas de falha de enxertos e suturas vasculares, angioplastias e colocação de stents no primeiro ano pós-cirurgia. Existem trabalhos mostrando atividades anti-inflamatória, antitumoral e antilipêmica da *Moringa oleifera*.

**2.Objetivo.** Determinar a diferença da média de hiperplasia miointimal pós-angioplastia na artéria ilíaca de coelhos tratados com extrato das folhas de *Moringa oleifera*.

**3.Método.** Ensaio aleatório em animais de laboratório por 5 semanas de seguimento, desenvolvido no Biotério do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) do Campus I da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB. Utilizamos Coelhos fêmeas (*Oryctolagus cuniculus*), da raça Nova Zelândia, submetidos a dieta hipercolesterolêmica e a angioplastia da artéria ilíaca externa direita, randomizados em dois grupos: Grupo M 200 (n=10), coelhos tratados com 200 mg/kg de extrato de folhas de *Moringa oleifera*, em doses diárias, por via oral. Grupo SF (n= 10), coelhos tratados com soro fisiológico 0,9%, por via oral. Após 5 semanas, os animais foram sacrificados, e as artérias ilíacas preparadas para análise histológica. Os cortes histológicos foram digitalizados e analisados por morfometria digital. A análise estatística foi realizada com o teste *t* de Student. O nível de significância foi de 0,05.

**4. Resultados.** Comparando as artérias ilíacas submetidas a angioplastia do grupo M 200 com as do grupo SF, não houve diferença significativa da hiperplasia médio-intimal ( 1392797 pixels +/- 242287 versus 1335467,2 +/- 402824,58 ; p = 0.33).

**5. Conclusão:** Não houve diferença da hiperplasia miointimal nos grupos tratados com soro fisiológico e *Moringa Oleifera* após angioplastia

**6. Descritores.** Hiperplasia. Miointimal. *Moringa*. Angioplastia. Coelhos.

## 1. INTRODUÇÃO

A Cirurgia Vascular reconstrutiva tem enfrentado, na sua história, um fenômeno biológico complexo, comprometendo os resultados, que é a hiperplasia miointimal e fibroplasia da anastomose, desenvolvido na anastomose vascular ou em seguida à angioplastia por balão, levando muitas vezes a uma oclusão vascular e insuficiência da revascularização. Diversas pesquisas têm sido dedicadas, ao longo dos anos, ao estudo dos mecanismos da íntima e tentativas de controlar o fenômeno por agentes farmacoterapêuticos, mas os resultados ainda estão longe de serem considerados satisfatórios. (1)

A hiperplasia miointimal é uma importante característica morfológica de várias patologias arteriais, tais como aterosclerose, restenose pós-angioplastia e arteriopatia pós-transplante (2).

Hiperplasia miointimal é a proliferação e migração de células musculares lisas da camada média arterial, além de células da medula óssea que migram para a camada íntima, diminuindo, dessa forma, o lúmen vascular (3).

Em virtude da necessidade do bloqueio desse fenômeno, existem, no momento, várias pesquisas em busca de novas substâncias que possam impedir tal resposta e, conseqüentemente, a falha dos tratamentos de revascularização, sejam eles por cirurgias convencionais ou por terapias minimamente invasivas.

Moringa oleifera, Lam (M. oleifera), também conhecido como Moringa pterygosperma Gaertn, é um membro da família de plantas Moringaceae

angiospermas perenes, que inclui 12 outras espécies (4). Nativa das partes sub-Himalaia do norte da Índia, é cultivado em todas as áreas tropicais e subtropicais do mundo, onde é conhecido por vários nomes populares (5): árvore de baqueta, árvore de rábano e malunggay, este o mais comumente encontrado na literatura.

Moringa oleifera é uma planta comestível. Uma grande variedade de virtudes nutricionais e medicinais tem sido atribuída às suas raízes, cascas, folhas, flores, frutos e sementes (5-7). Análises fitoquímicas têm mostrado que as folhas são particularmente ricas em potássio, cálcio, fosfato phorous-ferro, vitaminas A e D, aminoácidos essenciais, bem como conhecidos antioxidantes, como  $\beta$ -caroteno, vitamina C, e flavonóides (8-12).

A flor da moringa tem alto valor medicinal como estimulante, afrodisíaco, abortivo, anti-inflamatório; age em doenças musculares, tem ação antitumoral, diminui o colesterol sérico, triglicérides, VLDL, LDL, melhora o índice aterogênico, diminui o perfil lipídico no coração, no fígado e na aorta de colehos hipercolesterolêmicos, aumenta a excreção fecal de colesterol. Já a folha tem atividades purgativas, aplicada como cataplasma para feridas; foi usada nos templos para dores de cabeça, bem como para hemorróidas, febre, dor de garganta, bronquite, olhos e infecções de ouvido, escorbuto e catarro. Acredita-se que o suco da folha é eficiente para controlar os níveis de glucose. (13).

Existe realmente um apelo científico crescente para a solução desse problema que é a hiperplasia miointimal, sendo que várias substâncias são pesquisadas com o intuito de avaliar o efeito sobre essa consequência negativa da angioplastia. Na nossa linha de pesquisa, há trabalhos avaliando,



também, o efeito da Curcuma longa e do Alho na redução desse efeito indesejado.

Dados experimentais (14) e as primeiras experiências clínicas mostraram que a inibição da hiperplasia miointimal pode ser obtida por administração local de drogas antiproliferativos (como paclitaxel) carregados sobre a superfície de balões de angioplastia (15-17). Por conseguinte, os balões eluidores de medicamentos são uma ferramenta promissora para prevenir a restenose e evitar a persistência indesejável dos polímeros dos STENTS Eluidores de Drogas na parede do vaso, aumentando assim potencialmente a segurança da intervenção coronariana percutânea.

Dessa forma é relevante responder a seguinte pergunta de pesquisa: qual a diferença de frequência de hiperplasia miointimal pós-angioplastia na artéria ilíaca de coelhos com aterosclerose experimental tratados e não tratados com extrato das folhas da *Moringa oleifera* ?

A hipótese é que haja uma diferença de 30% entre os grupos, em favor da *Moringa oleifera*, para comprovarmos a eficácia dessa planta no tratamento da hiperplasia miointimal.

## **2. MÉTODOS**

O projeto da pesquisa foi encaminhado, para avaliação, ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacológica (CEPA / LTF) da Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, PB, cadastrado pelo CONEP. O projeto foi aprovação pelo CEPA/LTF em 15 de março de 2011 com o número 602/2011. Foi desenvolvido no Biotério do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) do Campus I da Universidade

Federal da Paraíba, João Pessoa – PB. O Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba, criado em 13 de dezembro de 1968, desenvolve atividades de ensino, pesquisa e produção de medicamentos, atendendo a rede hospitalar da Universidade além de outras unidades de saúde do estado. O LTF é um órgão suplementar da UFPB, subordinado diretamente à Reitoria, localizado no Campus I, João Pessoa, PB, possuindo uma área de 4200 m<sup>2</sup> construída.

Respeitamos as leis:

- Lei 6638, de 08 de maio de 1979 - Normas para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais;
- Declaração Universal dos Direitos do Animal, UNESCO, 15 de Outubro de 1978;
- Lei de crimes ambientais (Lei nº 9.605/1998);
- As normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA, em 1991, sobre os Princípios Éticos na Experimentação Animal.

## **2.1 Tipo de estudo**

Ensaio clínico aleatório em animais de experimentação por 5 semanas de seguimento.

## **2.2 Amostra**

### **2.2.1 Critérios de inclusão**

Foram incluídos 20 (vinte) coelhos fêmeas adultos jovens (12 meses de idade e pesando mais de 2 Kg de peso corporal) da espécie *Oryctolagus cuniculus* da linhagem Nova Zelândia, submetidos a processo de hiperplasia intimal da artéria ilíaca comum esquerda pós aterosclerose experimental por gema de ovo (19).

### **2.2.2 Critérios de exclusão**

Foram excluídos os coelhos com idade superior a 6 meses, peso corporal inferior a 2 Kg e superior a 4Kg, portadores de doença prévia ou com alterações anatômicas das estruturas abordadas

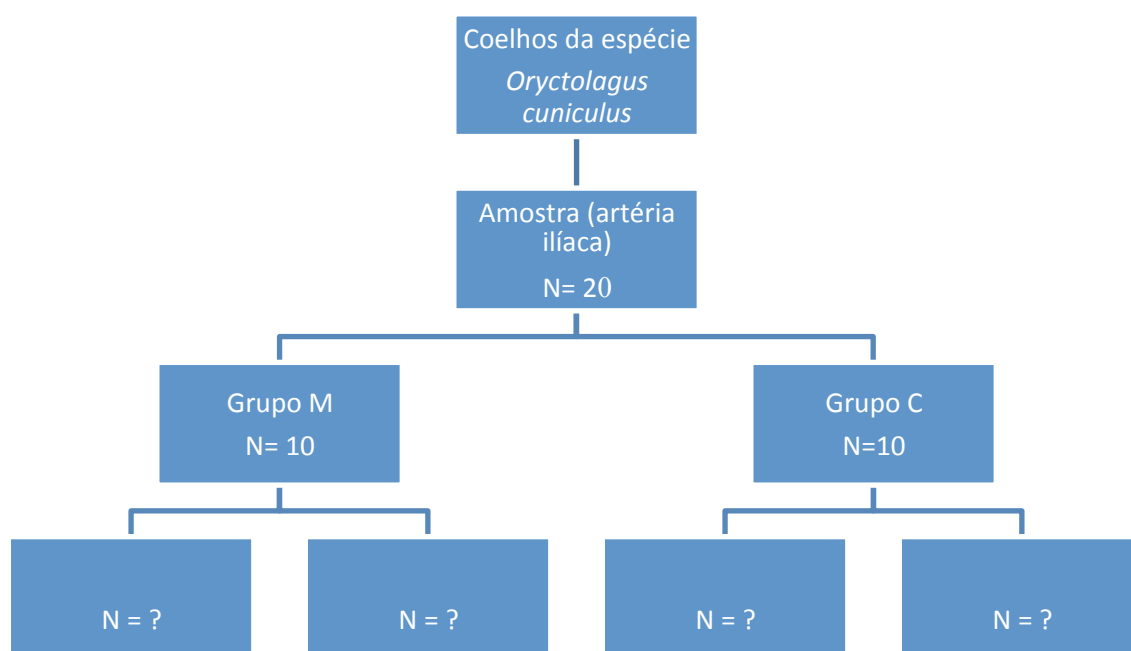
### **2.2.3 Amostragem**

Foram estudados os coelhos selecionados, que formaram uma amostra não probabilística por conveniência.

### **2.2.4 Randomização**

O sorteio dos animais para cada grupo foi feito aleatoriamente (18) por permutação de bloco com o auxílio de um programa gratuito Research Randomizer, no site <http://www.randomizer.org/form.htm>, sendo dois blocos com 10 números. Cada bloco corresponderá a um grupo e os números gerados aos animais. Constituíram 2 (dois) grupos com 10 coelhos cada.

Os animais receberam uma letra e um número correspondente ao grupo de administração e para identificação do animal (exemplo: M1 – animal 1 do grupo Moringa; C2 – animal 2 do grupo controle). Essa marcação será por meio de escrita feita por tinta azul indelével na face interna da base da orelha com caneta tipo piloto permanente (*permanent mark*).



**Quadro 1. Fluxograma da pesquisa**

Optamos pelo manejo fechado dos animais e a experimentação será realizada no próprio biotério de origem, existe um ambiente propício para os mesmos, com sistema de ventilação exaustão forçado, períodos de luminescência natural, temperatura média de 20°C, ruído mínimo e umidade em torno de 50%. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais apropriadas com área de 0,64 m<sup>2</sup>, eles não tiveram contato com suas

secreções naturais, uma vez que as gaiolas são adaptadas para que se mantenha a devida higiene. A dieta foi constituída de água e ração comercial granulada *ad libitum*, antes e durante o experimento.

A aterosclerose foi induzida pelo modelo descrito na dissertação de mestrado de Santos em 2008 (19), que utilizou uma dieta hipercolesterolêmica a base de gema de ovo; 20 mL/dia por via oral num período de 100 dias.

Induzimos a hiperplasia miointimal pela seguinte técnica: os coelhos foram anestesiados com Xilazina na dose de 10 mg/kg e Ketamina na dose de 40 mg/kg, por via intramuscular, na coxa, segunda técnica descrita na literatura (20). A oxigenação foi mantida por entubação orotraqueal seguindo a técnica de visão direta (21), acoplada à fonte de O<sup>2</sup>, com o auxílio de anestesista. Após indução anestésica, foram realizadas tricotomias nas regiões inferior do abdome e inguinal, seguidas de limpeza adequada do local, assepsia e antissepsia com álcool iodado. Procedeu-se, então, a incisão na pele com 2 a 3 cm de extensão no sentido longitudinal na prega inguinal com bisturi lâmina 15, para exposição da artéria femoral direita, que foi reparada com sutura simples de Nylon 3.0, ao final do procedimento. Foi colhida amostra de sangue para dosagem de colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicérides. Este sangue foi enviado a laboratório de bioquímica do Biotério para a respectiva dosagem. Foi realizada pequena arteriotomia transversal com bisturi lâmina 11, através da qual foi introduzida uma guia metálica número 0,014" (polegadas), pela qual foi introduzido um cateter-balão de 3 (três) mm de diâmetro por 20 (vinte) mm de comprimento (raio balão/artéria de 2,5 a 3,0:1), que foi inserido no lúmen da artéria ilíaca

direita(AID). Em cada artéria, o cateter-balão foi insuflado pelo tempo de um minuto, na pressão nominal, levando a distensão da parede arterial. Após desinsuflação do balão, foi realizada ligadura das artérias com fio algodão 3.0. Por fim, a pele foi suturada com fio de Nylon 3-0. Foram administrados analgésicos (ibuprofeno 10 mg/Kg por via oral, por 5 dias) e antibióticos (Cefaclor 20mg/kg/dia dividido em 2 tomadas) para ambos os grupos no pós-operatório para evitar sofrimento do animal. Vinte e quatro horas após a realização da lesão arterial, iniciou-se a administração das drogas de nossa pesquisa nos dois grupos. (22)

O grupo M (Moringa) recebeu 200mg/kg de extrato etanólico bruto das folhas de *Moringa oleífera* por gavage por 5 semanas e o grupo C (controle negativo) receberá soro fisiológico 0,9% 10 ml/dia por 5 semanas por gavage.

As drogas foram administradas por um período de 5 semanas e, com o término do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia sob dose letal do anestésico, e foram coletadas as artérias ilíacas comuns com o seguimento que foi submetido à lesão pelo balão entre as excisões; além disso, foi coletada nova amostra de sangue para dosagem de colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicérides. Os blocos arteriais foram fixados em formalina a 10% por no mínimo 24h e, em seguida, levados para o preparo rotineiro de lâminas histológicas para microscopia óptica: desidratação gradativa e crescente de álcool a 70% até o álcool absoluto – diafanização em xilol e embebição em parafina líquida a 60°C, preparação dos blocos de parafina. Os blocos de parafina foram cortados no micrótomo com espessura de 3 µm e os cortes montados em lâminas de vidro extrafinas (76 x 25 mm).

Em seguida foram coradas em HE (hematoxilina-eosina); depois, montadas com lamínulas e resina natural. As lâminas foram preparadas e examinadas por patologista devidamente credenciado com aumentos de 10 e 40 vezes.

O sangue foi enviado para laboratório onde foi realizada a dosagem padrão dos parâmetros acima.

O mascaramento para a microscopia foi realizado pela troca da letra na marcação inicial por uma outra, conhecida apenas por aquele que realizará a marcação das orelhas (pesquisador principal). A nova identificação foi guardada em envelope selado, que só foi aberto no momento da análise dos dados, após a mensuração da variável primária. O patologista não soube qual método foi utilizado no vaso alvo.

Após análise histológica, as lâminas foram fotografadas com câmera fotográfica digital em aumento óptico de 4x associado a aumentos óptico do microscópio de 2x e 10x.

Os segmentos arteriais coletados foram encaminhados à patologia, onde foram fixados em formalina a 10% por no mínimo 24h e, em seguida, levados para o preparo rotineiro de lâminas histológicas para microscopia óptica. Foi realizada a desidratação gradativa e crescente com álcool a 70% até a álcool absoluto; diafanização em xilol e embebição em parafina líquida a 60°C para preparação dos blocos de parafina. Os blocos de parafina foram cortados no micrótomo com espessura de 3 µm, e os cortes transversais montados em lâminas de vidro extrafinas (76 x 25 mm); em seguida, foram coradas em HE (hematoxilina-eosina) e PAS. As lâminas foram montadas com lamínulas e resina natural, preparadas e examinadas nas objetivas de

2X, 10X, por patologista credenciado e mascarado (mascaramento descrito a seguir).

As imagens dos cortes histológicos, coradas pelo método de HE (hematoxilina-eosina), foram digitalizadas para análise morfológica a partir da microscopia óptica convencional: microscópio Nykon®, com objetiva de 2X, com lentes plano-acromáticas, câmera de circuito fechado colorida (Canon Power Shot A640) com zoom óptico de 4.0x, gerando arquivos de imagem com 3648 x 2736 pixels. As imagens foram digitalizadas com aumento microscópico de 2 vezes. As medidas morfológicas foram realizadas através de sistema de processamento e análise digital "ImageJ64 NIH Image", disponível o site (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>), sem a interferência do observador, mantido "cego" na mensuração. Para cada segmento analisado, foram medidas a área da luz e a área interna das lâminas elásticas interna e externa. Com base nesses resultados, foram calculados: a área da camada médio intimal subtraindo-se a área do lúmen da área delimitada pela lâmina elástica interna, a área da camada média subtraindo-se a área delimitada pela lâmina elástica interna da área delimitada pela lâmina elástica externa e o índice da hiperplasia médio intimal dividindo-se a área da camada íntima pela soma da área da camada íntima e da camada média.

### **2.2.5 Variável Primária**

A diferença de frequência da média de hiperplasia miointimal.



Para a eficácia do tratamento, a hiperplasia miontimal foi avaliada por morfometria; os valores foi em área e, em seguida, realizada a média de cada grupo. A diferença dessas médias da área é que foi utilizada para afirmar qual tratamento é mais eficiente.

### **2.2.6 Variáveis Secundárias**

Colesterol total

HDL

LDL

VLDL

Triglicérides

### **2.2.7 Dados complementares**

Peso corporal do animal: Massa ou quantidade de peso de um indivíduo, expresso em unidades de quilogramas ou libras (23). O quilograma é a quantidade de massa (e não de peso, nem força); ele é igual à massa do protótipo internacional do quilograma. Este protótipo internacional em platina iridiada é conservado no Bureau Internacional, nas condições que foram fixadas pela 1ª. CGPM em 1889. (24).

Idade: É a idade calculada, em meses completos, no último dia do mês de referência da pesquisa, com base no dia, mês e ano do nascimento do animal

Microscopia: técnica laboratorial utilizada para visualizar estruturas e objetos minúsculos impossíveis de serem vistos ao olho nu.

Coloração: técnica histológica que consiste em utilizar corantes para destacar e facilitar a visualização das estruturas a serem estudadas.

Volume da substância administrada: é a quantidade de substância administrada num corpo ou em determinada área.

## **2.3 Método estatístico**

### **2.3.1 Cálculo do tamanho da amostra**

O tamanho da amostra foi arbitrado em 20 coelhos, baseado na literatura, onde há trabalhos que comprovam resultados estatísticos aceitáveis com número menor de animais no experimento com modelo animal semelhante (19, 25, 26) e para respeitar as normas da COBEA. A análise estatística foi realizada com o teste U de Man Whitney e calculando o intervalo de confiança (IC) de 95% para cada ponto estimado. Foi utilizada uma calculadora eletrônica, disponível na Internet no URL: [http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/di\\_2\\_pro.html](http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/di_2_pro.html), na qual os dados foram inseridos para o cálculo do tamanho da amostra; para os cálculos estatísticos, o programa estatístico GraphPad InStat® Prism 5 (2012) Versão para Mac.

### **2.3.2 Análise estatística**

Os dados foram coletados em um formulário padronizado (anexo 2) e os dados armazenados em uma planilha eletrônica de dados (Microsoft Excel® 2011, for Mac. EUA).

A análise descritiva foi realizada calculando o intervalo de confiança de 95% (28) para cada ponto estimado. Os cálculos foram realizados com o auxílio do aplicativo estatístico GraphPad InStat® Prism 5 (2012) Versão para Mac.

Os dados são apresentados como média e desvio padrão. A comparação entre os grupos foi realizada através do teste T Student, para os dados histomorfométricos. Foi realizado no aplicativo estatístico GraphPad InStat® Prism 5 (2012) Versão para Mac, e o nível de significância foi de 0,05.

### **3. RESULTADOS**

Comparando-se a média do complexo médio intimal dos grupos estudados (Média SF= 35,74% da artéria) e (Média M 200= 38,66% da artéria), não houve diferença estatística quando aplicamos o teste U de Mann Whitney; P igual a 0,33. Ver Tabela 1 e Gráfico 1.

Quando comparamos os valores dos colesterol total, HDL, LDL e Triglicérides, esses valores também não foram estatisticamente significativos.

Em relação ao peso, houve diferença nas médias de ambos os grupos quando comparamos os períodos pré e pós experimento.

### **4. DISCUSSÃO**

A pesquisa foi realizada em coelhos uma vez que yanni, (2004) mostrou que os coelhos New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*) são muito

sensíveis à indução de lesões ateroscleróticas e cita como um dos mais importantes modelos de estudo de aterosclerose. A construção de modelos induzindo a aterosclerose, farmacologicamente ou através de dietas aterogênicas, associado à lesão por balão de angioplastia, resulta em formação de placas similares às aquelas encontradas em artérias coronárias humanas (29).

A análise das artérias ilíacas de coelhos contrapôs a predominância das lesões ateroscleróticas que se encontram, mais frequentemente, no arco aórtico e aorta torácica de coelhos submetidos à aterosclerose experimental, segundo Thaylor and Fan (1997) (30), no entanto há estudos como os de Brasselet (2008) (26) que também, assim como este, utilizaram as artérias ilíacas de coelhos, submetidos à aterosclerose experimental com dieta com alto teor de colesterol. O território ilíaco foi escolhido pela existência de dados que demonstram que esse sítio é um território em que a angioplastia pode ser realizada com o implante seletivo de Stent Kudo (2005). Há estudos que utilizaram cateter de Fogarty para provocar a lesão endotelial (26); outros utilizando o balão de angioplastia para simular com maior fidedignidade o stress induzido pela angioplastia (31) e ainda os que utilizaram o Fogarty e o balão na elaboração de um modelo de hiperplasia intimal (28) . O presente estudo foi realizado com insuflação de um balão de angioplastia 3,0 x 20mm na artéria ilíaca de coelho, utilizando pressão nominal máxima (Pressão de ruptura) do balão por um período de 1 minuto e obedecendo a uma proporcionalidade (balão:artéria) de 2,5 – 3,0:1, enquanto o estudo de Taylor obedeceu à razão de 1,0 - 1,2:1.

O resultado da pesquisa não apresentou efeito significativo na redução de peso, colesterol ou triglicérides; variáveis secundárias do nosso estudo, em contradição com o trabalho de Metha (2003), que mostrou haver efeito hipolipidêmico e influiu na diminuição do peso dos coelhos(32); no entanto, no trabalho citado, o período de intervenção foi de 120 dias; neste, contudo, a intervenção foi feita em 35 dias, uma vez que o objetivo principal dele era a avaliação do efeito do extrato de folha Moringa na hiperplasia intimal e que, nesse caso, o tempo de intervenção para atingir o alvo, a hiperplasia intimal, seria de até 4 semanas, já que as fases da hiperplasia intimal giram em torno de 4 semanas, segundo literatura, Liu (1989) e Indolfi (2000).

A reestenose após angioplastia com cateter balão é causada pelo remodelamento elástico negativo e pela proliferação e migração das CMLV . No modelo citado, utilizando carótidas de ratos, a resposta da parede arterial ao dano provocado pela angioplastia é a liberação de fatores de crescimento e outros fatores, biologicamente ativos, que mudam a composição da matriz extracelular e promovem a mudança fenotípica das CMLV de contráteis para sintéticas (desdiferenciação), levando à proliferação das células na camada média e migração para a camada íntima, formando a neointima (33).

Alguns trabalhos citam o modelo suíno como modelo ideal para a reprodução de hiperplasia (34). Entretanto, um bom modelo de reestenose necessita de animais mais baratos, acessíveis e fáceis de manusear (35). Assim como Le Tourneau (1999) (36) e Knopfholz (2006) (22), optou-se por utilizar as artérias ilíacas de coelhos hipercolesterolêmicos como modelo animal para aterosclerose e hiperplasia mio intimal.

A presente pesquisa, assim como Metha utilizou a dosagem de 200mg/kg/dia, sendo que Metha utilizou os frutos. Existem trabalhos que já utilizaram até 600mg/Kg/dia como Jain (2010), quando avaliou a atividade hipolipidêmica da *Moringa oleífera Lam.* Dessa forma, outras concentrações maiores podem ser testadas.

Em relação aos níveis de lipídios, não se obteve, também, diferença estatística com a literatura, talvez porque a dieta aterogênica foi suspensa no período avaliado, que sucedeu à angioplastia, uma vez que se pensou utilizar a dieta aterogênica para realizar a angioplastia em uma artéria atingida pela aterosclerose, simulando mais fidedignamente a realidade.

Por fim o trabalho não apresentou diferença significativa em relação à área miointimal quando se comparou o grupo controle, em que se utilizou o soro fisiológico e o grupo em que se administrou o extrato de folhas de moringa na dosagem de 200mg/kg/dia. É possível que se tenha utilizado uma baixa dosagem do extrato de moringa e, dessa forma, não se obteve uma redução significativa da hiperplasia miointimal.

Essa pesquisa abre um leque de opções para testar outras concentrações do extrato folha de moringa, podendo ainda submeter outras partes da planta a testes, uma vez que há uma série crescente de trabalhos mostrando efeitos benéficos quando se utiliza com intuitos medicinais.

Uma hipótese para a ausência de diferença estatística é o tamanho da amostra, apesar de termos trabalhos na literatura provando que estudos, conduzidos com esse número, já podem apresentar diferença estatística.

## **5. CONCLUSÃO**

Não houve diferença de frequência de hiperplasia miointimal nos grupos tratados com soro fisiológico e *Moringa Oleifera* após angioplastia.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Dinis da Gama A. New trends in the prevention of myointimal hyperplasia and anastomotic fibroplasia. *Rev Port Cir Cardiorac Vasc.* 2007 Oct-Dec;14(4):211-5. Review. Portuguese. PubMed PMID: 18408819.
2. Il'inskaia OP, Antropova IuG, Kalinina NI, Mishina VA, Tararak M, Smirnov VN. A new concept of development of neointimal hyperplasia. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 2004 Oct;90(10):1203-14. PMID: 15628176.
3. Liu MW, Roubin GS, King SB 3rd. Restenosis after coronary angioplasty potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation.* 1989 Jun;79(6):1374-87. PMID: 2524293.
4. Olson ME. Combining data from DNA sequences and morphology for a phylogeny of Moringaceae (Brassicales). *Syst. Bot.* 2002 Jan-Mar;27(1):55-73.
5. Ramachandran C, Peter KV, Gopalakrishnan PK. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. *Econ. Bot.* 1980; 34(3), 276-83.
6. Anwar F, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytother Res.* 2007 Jan;21(1):17-25.
7. Kumar PS, Mishra D, Ghosh G, Panda GS. Medicinal uses and pharmacological properties of *Moringa oleifera*. *Int. J. Phytomed.* 2010; 2, 210-6.
8. Bennett RN, Mellon FA, Foidl N, Pratt JH, Dupont MS, Perkins L, Kroon PA. Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (horseradish tree) and *Moringa stenopetala* L. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51(12), 3546-53.

9. Aslam M, Anwar F, Nadeem R, Rashid U, Kazi TG, Nadeem M. Mineral Composition of *Moringa oleifera* Leaves and Pods from Different Regions of Punjab, Pakistan Asian Journal of Plant Sciences 2005; 4(4), 417-21.
10. Manguro LO, Lemmen P. Phenolics of *Moringa oleifera* leaves. Nat. Prod. Res. 2007; 21, 56–68.
11. Amaglo NK, Bennett RN, Lo Curto RB, Rosa EAS, Lo Turco V, Giuffrida A, Lo Curto A, Crea F, Timpo GM. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. Food Chemistry 15 October 2010; 122(4), 1047-54.
12. Gowrishankar R, Kumar M, Menon V, Divi SM, Saravanan M, Magudapathy P, Panigrahi BK, Nair KG, Venkataramaniah K. Trace element studies on *Tinospora cordifolia* (Menispermaceae), *Ocimum sanctum* (Lamiaceae), *Moringa oleifera* (Moringaceae), and *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae) using PIXE. Biol. Trace Elem. Res. 2010; 133(3), 357–63.
13. Anwar F, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. *Moringa oleifera*: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. Phytother Res. 2007 Jan;21(1):17-25.
14. Scheller B, Speck U, Abramjuk C, Bernhardt U, Böhm M, Nickenig G. Paclitaxel balloon coating, a novel method for prevention and therapy of restenosis. *Circulation* 2004 Aug 17; 110(7):810–4.
15. Unverdorben M, Vallbracht C, Cremers B, Heuer H, Hengstenberg C, Maikowski C, Werner GS, Antoni D, Kleber FX, Bocksch W, Leschke M, Ackermann H, Boxberger M, Speck U, Degenhardt R, Scheller B. Paclitaxel-coated balloon catheter versus paclitaxel-coated stent for the treatment of coronary in-stent restenosis. *Circulation* 2009 Jun 16; 119(23):2986–94
16. Scheller B, Hehrlein C, Bocksch W, Rutsch W, Haghi D, Dietz U, Böhm M, Speck U. Treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter. *N Engl J Med* 2006 Nov 16; 355(20):2113–24.
17. Scheller B, Hehrlein C, Bocksch W, Rutsch W, Haghi D, Dietz U, Böhm M, Speck U. Two year follow-up after treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter. *Clin Res Cardiol* 2008 Oct, 97(10):773–81.
18. Vieira S. Metodologia científica para a área de saúde. São Paulo: Sarvier; 1984. p. 98.
19. Santos JABd. Estudo da aterosclerose induzida por diferentes tipos de dieta hiperlipídica em coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*)[Dissertação de mestrado]. Macéio: Universidade Federal de Alagoas; 2008



20. Harkness JE, Wagner JE. Procedimentos clínicos. In: Harkness JE, editor. *Biologia e clínica de coelhos e roedores*. 3a ed. São Paulo: Roca; 1993. p. 57 - 85.
21. Fonseca NM, Goldenberg S, Gomes PdO, Lima CAdP. Anestesia em Coelhos. *Acta Cirurgica Brasileira*. [Artigo de Revisão]. 1996 Abr/Mai/Junh;11(2):85-104.
22. Knopfholz J, Précoma DB, Brofman PRS, Bier GE, Silva RFKcd, Silva APK, et al. Efeito da L-arginina na Neoproliferação Intimal e no Remodelamento Arterial após Lesão por Balão, em Ilíacas de Coelhos hipercolesterolêmicos. *Arq Bras Cardiol*. [Original]. 2006;87:520-4.
23. DeCs - Descritores em Ciências da Saúde. 2007 [cited 2008]; Available from: <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decsserver/>.
24. INMETRO. Unidades Legais de Medida. Rio de Janeiro: Resolução nº 12 de 1988 do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - Conmetro; 1988 [updated 2007]; 8a. (revisada):[O Sistema Internacional de Unidades - SI]. Available from: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/unidLegaisMed.asp>.
25. Cortelekoglu T, Bozkurt A, Ustundag N, Koksall C, Sayin A. The effects of clopidogrel and calcium dobesilate on intimal hyperplasia following vascular injury. *Acta Chir Belg*. 2006 Mar-Abr;106(2):206-10.
26. Brasselet C, Durand E, Addad F, Vitry F, Chatellier G, Demerens C, et al. Effect of local heating on restenosis and in-stent neointimal hyperplasia in the atherosclerotic rabbit model: a dose-ranging study. *Eur Heart J*. 2008 Feb;29(3):402-12.
27. Yanni AE. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Lab Anim*. 2004 Jul;38(3):246-56.
28. Braitman LE. Confidence intervals assess both clinical significance and statistical significance. *Ann Intern Med*. 1991 Mar 15;114(6):515-7.
29. Peng S, Guo W, Morrisett JD, Johnstone MT, Hamilton JA. Quantification of cholesteryl esters in human and rabbit atherosclerotic plaques by magic-angle spinning (13)C-NMR. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000. Dec;20(12):2682-8.
30. Taylor JM, Fan J. Transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis. *Front Biosci*. 1997 Jun 15;2:d 298-308.
31. Kudo T, Chandra FA, Ahn SS. Long-term outcomes and predictors of iliac angioplasty with selective stenting. *Journal of vascular surgery : official*

publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter. 2005 Sep;42(3):466-75.

32. Mehta K, Balaraman R, Amin AH, Bafna PA, Gulati OD. Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. *J Ethnopharmacol*. 2003 Jun;86(2-3):191-5.

33. Indolfi C, Torella D, Coppola C, Stabile E, Esposito G, Curcio A, et al. Rat carotid artery dilation by PTCA balloon catheter induces neointima formation in presence of IEL rupture. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002 Aug;283(2):H760-7.

34. Mongiardo A, Curcio A, Spaccarotella C, Parise S, Indolfi C. Molecular mechanisms of restenosis after percutaneous peripheral angioplasty and approach to endovascular therapy. *Current drug targets Cardiovascular & haematological disorders*. 2004 Sep;4(3):275-87.

35. Karas SP, Gravanis MB, Santoian EC, Robinson KA, Anderberg KA, and King IISB. Coronary intimal proliferation after balloon injury and stenting in swine: an animal model of restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1992 20: 467–74.

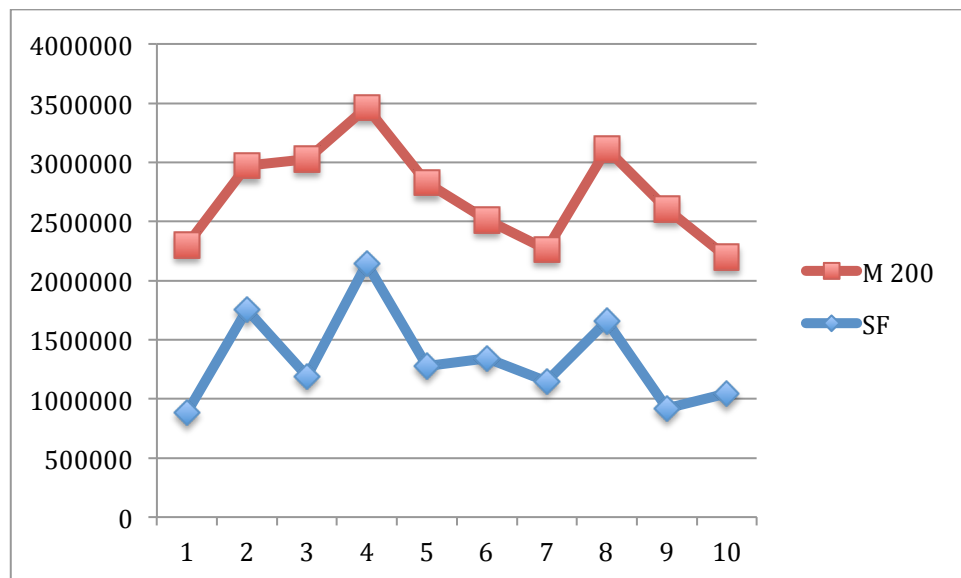
36. Le Tourneau T, Van Belle E, Corseaux D, et al. Role of nitric oxide in restenosis after experimental balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit: effects on neo-intimal hyperplasia and vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 1999 Mar; 33(3): 876-82.

## ANEXOS

Tabela 1 – Complexo Médio Intimal das Artérias Iílicas

Grupo	Média %	Desvio Padrão (+/-)	IC 95%	Min	Max
SF 0,9%	35,74	5,56	31,76 a 39,71	29,23	45,46
M 200	38,66	7,39	33,37 a 43,94	24,1	47,02

P = 0,33



P=0,33

Gráfico 1 – Medida em pixels do complexo mio intimal

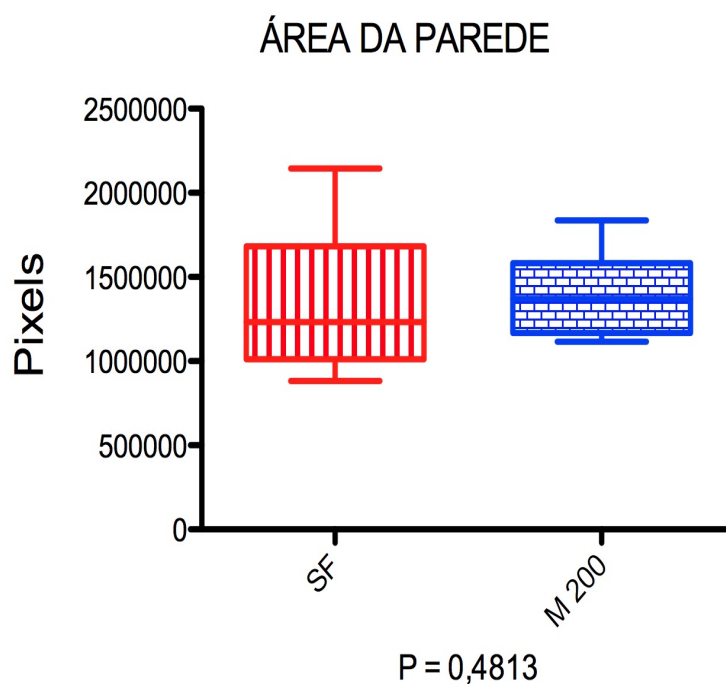


Gráfico 2 – Comparação das áreas das paredes das artérias dos coelhos

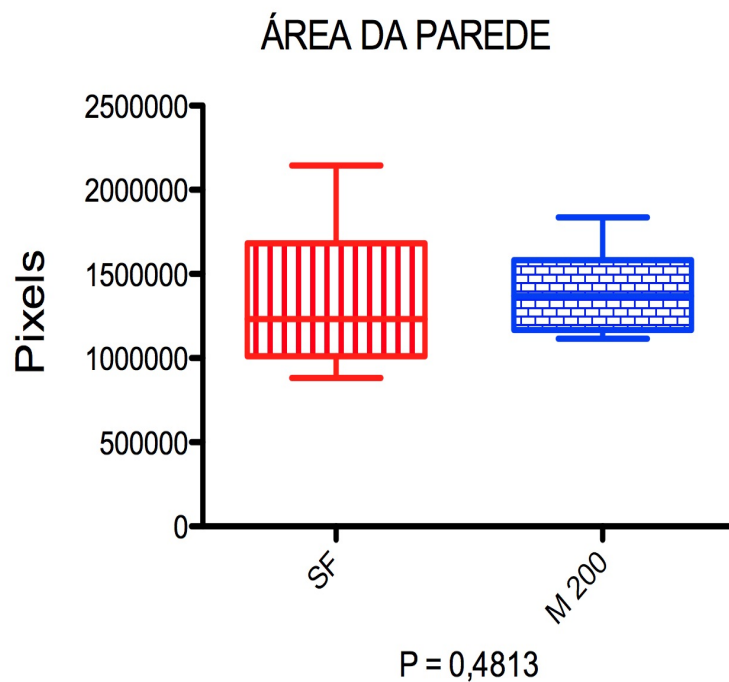


Gráfico 3 - Comparação das áreas totais das artérias dos coelhos

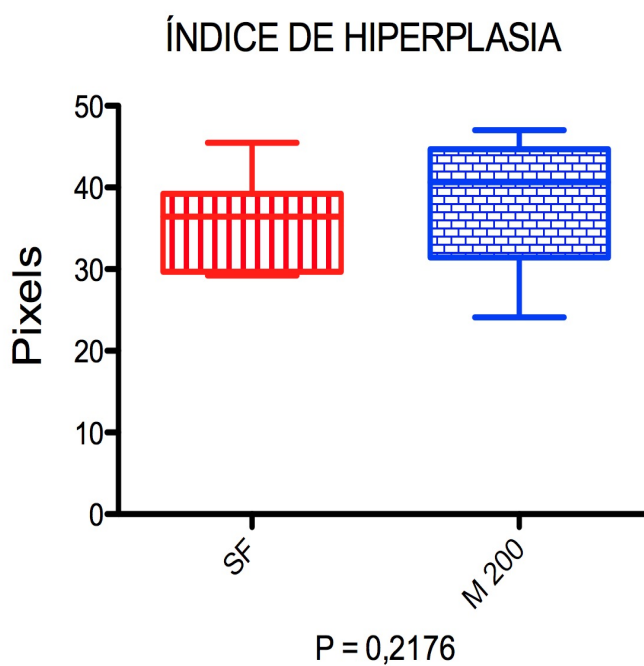


Gráfico 4 – Comparação dos índices de hiperplasia das artérias dos coelhos

## VARIÁVEIS SECUNDÁRIAS

Tabela 2 - Lipidograma pré medicação – Grupo SF

SF 0,9%					
	Média	Desvio Padrão (+/-)	IC 95%	Max	Min
Colesterol Total (mg/dl)	53,1	50,11	17,26 a 88,94	194	25
HDL (mg/dl)	20,87	6,966	15,887 a 25,853	32,8	3,9
LDL (mg/dl)	14,8	37,37	11,93 a 41,53	120	-6
VLDL (mg/dl)	17,5	18,65	4,16 a 30,54	70	9
Triglicérides (mg/dl)	88,5	95,44	20,22 a 156,78	269	39

Tabela 3 – Lipidograma pré medicação Grupo M 200

M 200					
	Média	Desvio Padrão (+/-)	IC 95%	Max	Min
Colesterol Total (mg/dl)	44,75	11,23	35,36 a 54,14	61	29
HDL (mg/dl)	23,513	3,702	20,418 a 26,607	55	28
LDL (mg/dl)	5,13	12,02	4,92 a 15,17	25	-9
VLDL (mg/dl)	16,25	3,58	13,26 a 19,24	20	10
Triglicérides (mg/dl)	82,63	18,41	67,24 a 98,01	100	51

Tabela 4 - Lipidograma pós medicação – Grupo SF

SF 0,9%					
	Média	Desvio Padrão (+/-)	IC 95%	Max	Min
Colesterol Total (mg/dl)	46,4	19,66	32,33 a 60,47	97	31
HDL (mg/dl)	19,08	16,189	7,499 a 30,661	53,8	7,8
LDL (mg/dl)	11,17	9,815	4,149 a 18,191	38	4,7
VLDL (mg/dl)	16,15	6,627	11,409 a 20,891	26,7	5,2
Triglicérides (mg/dl)	95,4	80,95	37,49 a 153,31	269	39

Tabela 5 - Lipidograma pós medicação – Grupo M 200

M 200					
	Média	Desvio Padrão (+/-)	IC 95%	Max	Min
Colesterol Total (mg/dl)	42,56	11,2	33,94 a 51,17	55	28
HDL (mg/dl)	22,778	9,101	15,782 a 29,773	37,5	5,1
LDL (mg/dl)	3,889	8,525	2,664 a 10,442	22,7	-5,2
VLDL (mg/dl)	15,9	6,13	11,188 a 20,612	27,2	9,4
Triglicérides (mg/dl)	79,44	30,66	55,87 a 103,01	136	47

## Dados Complementares

Tabela 6 – Comparação dos pesos do coelhos pré e pós experimento

Grupos	Média (g)	Desvio Padrão (+/-)	N	
SF pré	3153	633,39	10	
SF pós	2978,3	588,77	10	
M 200 pré	3392,6	326,93	10	
M 200 pós	3276,1	367,01	10	

P < 0,0001 Peso M 200

P < 0,0001 Peso SF

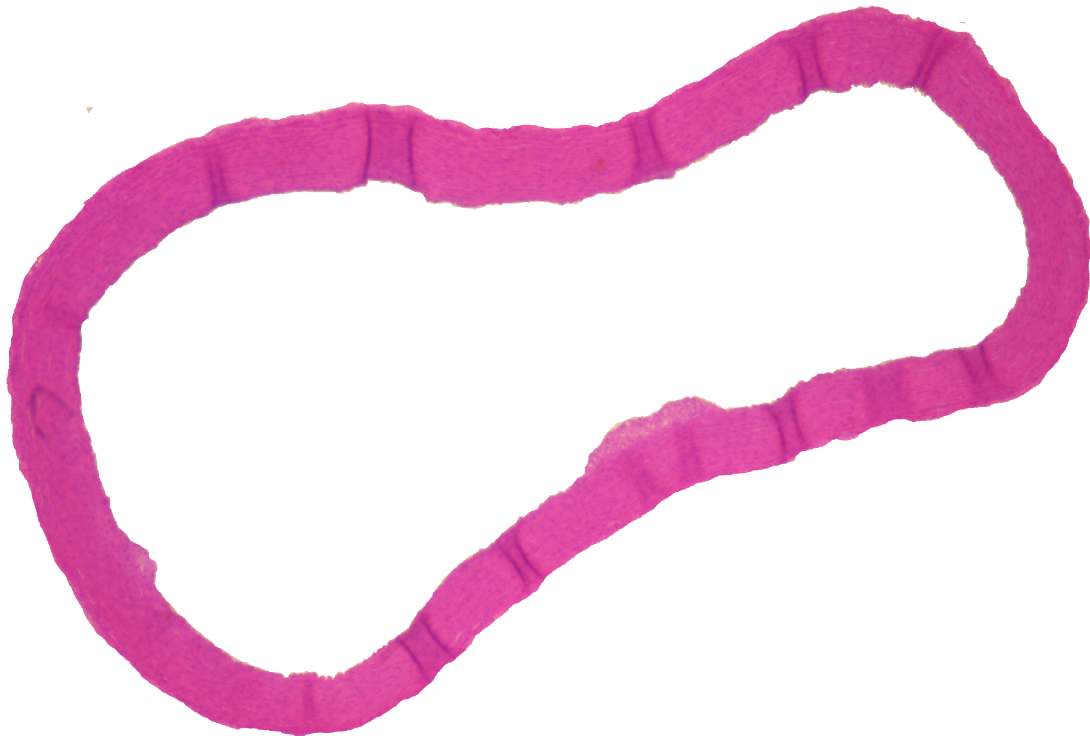


Fig 7 - Complexo Mio Intimal de Artéria Ilíaca de Coelho Tratado com M 200

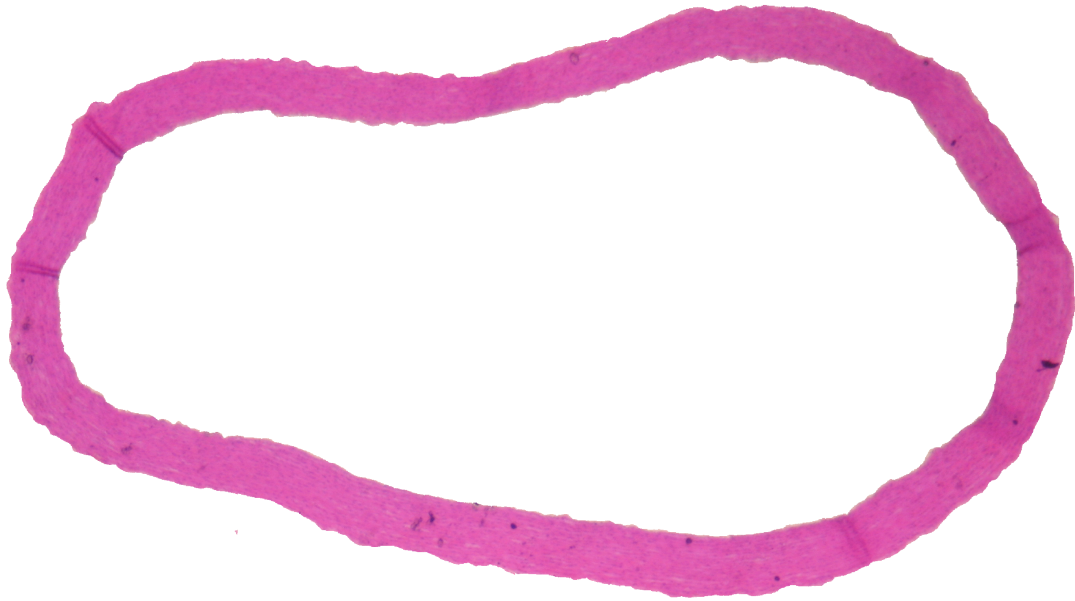


Fig 8 – Complexo mio Intimal da Artéria Ilíaca Tratado com SF

## ARTICLE IN ENGLISH

### **Evaluation of myointimal hyperplasia in rabbits submitted to angioplasty and treated with *Moringa oleifera***

Jânio Cipriano Rolim<sup>a</sup>; Manoel Ricardo Sena Nogueira<sup>b</sup>; Paulo Roberto da Silva Lima<sup>c</sup>; Francisco Chavier Vieira Bandeira<sup>d</sup>; Mizael Pordeus Bezerra<sup>e</sup>; Aldemar Araújo Castro<sup>f</sup>; Guilherme Benjamin Pitta<sup>g</sup>; Adamastor Humberto Pereira<sup>h</sup>; Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz<sup>i</sup>

<sup>a</sup> Vascular surgeon. Master's student in Surgical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Vascular surgeon. Master's student in Surgical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Vascular surgeon, doctoral student, *Rede Nordeste de Biotecnologia* (Renorbio), Federal University of Alagoas, Maceió, AL, Brazil.

<sup>d</sup> Vascular surgeon, doctoral student, *Rede Nordeste de Biotecnologia* (Renorbio), Federal University of Alagoas, Maceió, AL, Brazil.

<sup>e</sup> Vascular surgeon, Master's student in Surgical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Sousa, PB, Brazil.

<sup>f</sup> Vascular surgeon, Assistant Professor, Alagoas State University of Science, Maceió, AL, Brazil.



<sup>g</sup> Vascular surgeon. Adjunct Professor and Supervisor. Surgical Department, Postgraduate Course in Surgical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>h</sup> Vascular surgeon. Adjunct Professor and Supervisor. Surgical Department, Postgraduate Course in Surgical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>i</sup> Physician and Pharmacist. Associate Professor, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

**Number of figures and/or tables: 5**

***Corresponding author:***

Jânio Cipriano Rolim

Rua Projetada Qd 08 Lt 03

Condomínio Villas do Lago,

58700-000 Patos, Paraíba, Brazil

Telephone: 55 83 9686 0808

E-mail: [janio\\_rolim@hotmail.com](mailto:janio_rolim@hotmail.com)

## **Abstract**

**Objective:** Establish the difference in myointimal thickness following angioplasty in the iliac artery of rabbits treated with *Moringa oleifera* leaf extract compared to a control group. The hypothesis is that there is a 30% difference between groups in favor of *Moringa oleifera*, to prove to the effectiveness of this plant in the treatment of myointimal hyperplasia.

**Methods:** A randomized trial was conducted over a follow-up period of five weeks in laboratory animals at the Pharmaceutical Technology Laboratory of the Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil. Female New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were submitted to a hypercholesterolemic diet and to angioplasty of the right external iliac artery. The animals were then randomized into two groups. In the treatment group (n=10), the rabbits were given 200 mg/kg of *Moringa oleifera* leaf extract in daily doses administered orally; and in the control group (n=10), the rabbits were treated with 0.9% saline solution, also administered orally. After 5 weeks, the animals were sacrificed and the iliac arteries prepared for histology. The histological sections were digitized and analyzed by digital morphometry. Statistical analysis was conducted using Student's t-test. Significance level was 0.05.

**Results:** Comparing the iliac arteries submitted to angioplasty in the treatment group with those of the control group, no significant differences were found in intima-media thickness ( $1392797 \pm 242287$  pixels versus  $1335467.2 \pm 402824.58$  pixels;  $p = 0.33$ ).

**Conclusion:** There was no difference in myointimal hyperplasia between the group treated with saline solution and that treated with *Moringa oleifera* following angioplasty.

**Keywords:** hyperplasia; myointimal; *Moringa*, angioplasty; rabbits.

## **Introduction**

Reconstructive vascular surgery is dogged by a complex biological phenomenon that compromises its results. Myointimal hyperplasia and anastomotic fibroplasia develop in vascular anastomosis or following balloon angioplasty, often leading to vascular occlusion and revascularization failure. The mechanisms of the intimal layer have been investigated and attempts have been made to control the phenomenon using pharmacotherapeutic agents; however, results remain far from satisfactory (1).

Myointimal hyperplasia is an important morphological characteristic of various arterial pathologies such as atherosclerosis, restenosis after angioplasty and transplantation arteriopathy (2). It consists of the proliferation and migration of smooth muscle cells from the media layer, in addition to cells from the bone marrow, that relocate to the intima layer, thus reducing the size of the vascular lumen (3). In view of the need to control this phenomenon, studies are currently being undertaken to identify new substances that may prevent the failure of revascularization therapy, either when conducted by conventional surgery or by minimally invasive techniques.

*Moringa oleifera* Lam (*M. oleifera*), also known as *Moringa pterygosperma* Gaertn, is a member of the perennial angiospermic plant of the Moringaceae family that includes twelve other species (4). Native of the sub-Himalayan parts of northern India, it is cultivated in all tropical and subtropical areas of the world, where it is known popularly by different names (5): drumstick tree, horseradish tree, and malunggay, the latter being the name most commonly found in the literature. A great number of nutritional and medicinal benefits have been attributed to the roots, bark, leaves, sap, flowers, fruit and seeds of this edible plant (5-7). Phytochemical analyses have shown that its leaves are particularly rich in potassium, calcium, iron, phosphate, vitamins A and D and essential amino acids, as well as known antioxidants such as beta-carotene, vitamin C and flavonoids (8-12).

The medicinal properties of the flower of the moringa tree include its effect as a stimulant and its aphrodisiac, abortive and anti-inflammatory properties. It is used to treat muscle ailments, has an anti-tumor effect, reduces the levels of serum cholesterol, triglycerides, very-low-density lipoprotein (VLDL) and low-density lipoprotein (LDL), improves the atherogenic index and the lipid profile in the heart, liver and aorta of hypercholesterolemic rabbits, and increases fecal cholesterol excretion. The leaf of this plant has a purgative effect and is used as a poultice on wounds. It is applied to the forehead to treat headaches and is also used to treat hemorrhoids, fever, sore throat, bronchitis, eye and ear infections, scurvy and catarrh. The sap from the leaf is believed to be effective in controlling glucose levels (6).

Of several substances that are currently being evaluated for their effect on myointimal hyperplasia following angioplasty, the present line of research has also looked at the effect of turmeric (*Curcuma longa*) and garlic on this undesired effect. Experimental data (13) and initial clinical experiences show that myointimal hyperplasia can be prevented through the local administration of antiproliferative drugs such as paclitaxel loaded onto the surface of angioplasty balloons (14-16). Therefore, drug-eluting balloons represent a promising tool for the prevention of restenosis and to prevent polymers of drug-eluting stents from remaining in the wall of the vessel, thus potentially increasing the safety of this percutaneous coronary intervention.

It is therefore important to answer the following research question: what is the difference in the frequency of myointimal hyperplasia following angioplasty in the iliac artery of rabbits with experimental atherosclerosis treated or not with an extract of the *Moringa oleifera* leaf?

The hypothesis is that there is a 30% difference between groups in favor of *Moringa oleifera*, to prove to the effectiveness of this plant in the treatment of myointimal hyperplasia.

### **Materials and Methods**

The study protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research at the Pharmacological Technology Laboratory of the Federal University of Paraíba under reference number 602/2011. The study was conducted at the animal house of the Pharmaceutical Technology Laboratory

and complied with the 1991 regulations of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) on the ethical principles of animal experimentation.

Sample size was estimated and established at 20 rabbits based on reports of acceptable statistical results obtained with the use of a small number of animals in an experiment with a similar animal model (18,22,23). This sample size also respects COBEA regulations.

This was a randomized clinical trial conducted with New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), with a follow-up time of 5 weeks. The sample included 20 young adult female rabbits (12 months old and weighing over 2 kg). The animals were submitted to balloon-induced arterial injury in order to cause intimal hyperplasia of the right common iliac artery following experimental atherosclerosis provoked by an egg yolk diet (17). Rabbits weighing < 2 kg or > 4 kg and those with any previous disease or anatomical alterations in the structures to be evaluated were excluded. The rabbits selected formed a non-probabilistic convenience sample.

The animals were randomized into two groups (18) using permutation blocks generated by the freely available Research Randomizer program. Each block contained 10 numbers corresponding to 10 rabbits in each group. The animals were identified by a letter (M or C), corresponding to the group to which they were randomized, and a number corresponding to their identification within the group (e.g. M1: animal #1 in the Moringa group; C2: animal #2 in the control group). This identification was marked in indelible

blue ink applied with a permanent marker to the internal surface at the base of the animal's ear.

The study was entirely conducted within the closed environment of the animal house, with a mechanical exhaust ventilation system, periods of natural light, a mean temperature of 20° C, minimum noise and humidity of around 50%. The animals were adequately maintained in individual cages, with a total area of 0.64 m<sup>2</sup> each. Catch pans under the cages collected urine and fecal pellets. Diet prior to and during the experiment consisted of water and commercial granulated feed provided ad libitum.

Atherosclerosis was induced using the model described by Santos (17), which consists of a hypercholesterolemic diet based on 20 mL of egg yolk administered orally every day for 100 days. Myointimal hyperplasia was induced using the following technique: the rabbits were anesthetized with 10 mg/kg xylazine and 40 mg/kg ketamine, administered intramuscularly into the thigh as previously described (19). Oxygenation was maintained by an endotracheal tube connected to an oxygen source, using the direct visualization technique (20). After anesthesia was induced, the lower abdomen and inguinal region were shaved, cleaned and disinfected with iodinated alcohol. A 2-3 cm incision was then made longitudinally into the skin at the inguinal fold using a scalpel blade #15 to expose the right femoral artery. A blood sample was taken to measure total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, very low-density lipoprotein (VLDL), cholesterol and triglyceride levels.

Measurements were performed at the biochemical laboratory of the animal facility. A small transverse arteriotomy was made using a scalpel blade #11 into which a 0.014" metal guidewire was inserted. A balloon catheter measuring 3 mm in diameter and 20 mm in length was inserted (radius of the balloon/artery of 2.5-3.0:1) and inflated for one minute at nominal pressure, thus distending the arterial wall. After the balloon was deflated, the arteries were ligated using 3.0 cotton sutures. Finally, the skin was sutured using 3-0 nylon suture. Analgesics (ibuprofen 10 mg/kg, orally for five days) and antibiotics (Cefaclor, 20 mg/kg/day in two equal doses) were administered to the animals in both groups following surgery to avoid suffering. Twenty-four hours after the balloon-induced arterial injury, the study drugs were administered to the two groups for five weeks by gavage (21). The treatment group received 200 mg/kg of the crude ethanol extract of the *Moringa oleifera* leaf, while the control group received saline solution 0.9% (10 ml/day).

Following the 5-week period of the study drug administration, the animals were sacrificed using a lethal dose of anesthesia. The common iliac arteries were then harvested, including the segment with the balloon-induced injury. In addition, a blood sample was once again taken to measure total cholesterol, HDL, LDL, VLDL and triglycerides. The arterial segments were fixed in 10% formalin for at least 24 hours and then submitted to routine histological preparation for optical microscopy: dehydrated gradually from a 70% ethanol concentration up to absolute ethanol, cleared in xylol, and embedded in liquid paraffin at 60°C. The paraffin blocks were cut into 3-µm thick sections using a microtome and then transferred onto extra-thin glass



slides (76 x 25 mm). Next, the slides were stained with hematoxylin-eosin (HE), mounted in natural resin and covered with a coverslip. The slides were prepared and examined by a qualified pathologist using magnification of 10-40x.

Masking for microscopy was achieved by changing the letter used in the initial marking for another, known only to the person who marked the ears (the principal investigator). The new identification was kept in a sealed envelope that was only opened at the time of data analysis, after the primary variable had been measured. The pathologist was unaware which treatment had been used in the case of each target vessel.

Following histological analysis, the slides were photographed using a digital camera with an optical zoom of 4x, associated with an optical microscope with magnification of 2x and 10x. The images of the histological, HE stained sections were digitized for morphometric analysis using a conventional optical microscope (Nikon) with objective magnification of 2x, achromatic lenses and a closed-circuit color camera (Canon Power Shot A640) with an optic zoom of 4.0x, generating images of 3648 x 2736 pixels. The morphometric measurements were taken using ImageJ 64-bit software (National Institutes of Health, <http://imagej.nih.gov/ij/index.html>), with no interference from the observer, who remained blinded during all measurements. For each segment analyzed, the lumen area and the internal area of the internal and external elastic laminae were measured. Based on these results, the following were calculated: the area of the intimal-medial layer by subtracting the lumen area

from the area marked by the internal elastic lamina, the area of the medial layer by subtracting the area marked by the internal elastic lamina from the area marked by the external elastic lamina, and neointimal thickness measured by dividing the area of the intima by the sum of the area of the intimal layer and the medial layer.

The primary variable was the difference in the mean measurement of myointimal hyperplasia, which was used to evaluate the efficacy of the treatment in each group. Secondary variables consisted of total cholesterol, HDL, LDL, VLDL and triglyceride measurements.

### **Statistical analysis**

The data were collected on a standardized form and stored on an electronic spreadsheet (Microsoft Excel® 2011 for Mac, USA). Descriptive analysis was performed with the data being presented as means  $\pm$  standard deviations. The Mann-Whitney U test was applied, and 95% confidence intervals (95%CI) were calculated (24). The groups were compared using Student's t-test in the case of the histological and morphometric data. All calculations were made using the GraphPad InStat® Prism (2012) statistical software program, version for Mac. Significance level was established at 0.05.

### **Experimental Results**

No statistically significant difference was found when the mean measurement of the intima-media complex thickness was compared between the study groups (35.74% of the artery in the control group and 38.66% of the artery in the treatment group) (Mann-Whitney U test;  $p = 0.48$ ), (Table 1, Figures 1 and 2). No statistically significant differences were found in total cholesterol, HDL, LDL or triglycerides levels (Table 2). No difference was found in the mean weight of the animals in both groups when weight was compared prior to and following the experiments.

## **Discussion**

The animal model used in this study was chosen based on a study conducted by Yanni (25), who reported that New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) are highly sensitive to induced atherosclerotic lesions, and one of the most important models for the study of this condition. The development of models to induce atherosclerosis either pharmacologically or through atherogenic diets, associated with balloon-induced arterial injury, results in the formation of plaques similar to those found in human coronary arteries (26).

Although Thaylor and Fan (27) reported that atherosclerotic lesions are more frequent in the aortic arch and thoracic aorta of rabbits submitted to experimental atherosclerosis, in the present study the injuries were induced in the iliac arteries of rabbits submitted to experimental atherosclerosis with a

cholesterol-rich diet, in accordance with other studies such as those of Brasselet et al. (23). The iliac artery was selected because at this site angioplasty can be performed using selective stent placement (28). Studies have been conducted using the Fogarty catheter to provoke an endothelial lesion (23); others have used an angioplasty balloon to simulate the stress induced by angioplasty more authentically (28) and others have compared the Fogarty catheter and the balloon in a model of neointimal hyperplasia (29). The present study was conducted by inflating an angioplasty balloon measuring 3.0 x 20 mm inside the iliac artery of the rabbit at maximum nominal pressure (burst pressure) for one minute, following a balloon: artery ratio of 2.5–3.0:1. In contrast, the study conducted by Taylor and Fan (27) used a ratio of 1.0–1.2:1.

No clinically significant reduction was found in weight, cholesterol or triglyceride levels, which were analyzed as secondary variables in the present study. These findings contradict the results reported by Metha et al., who showed a hypolipidemic effect of *Moringa oleifera* and a reduction in the weight of the rabbits (30). Nevertheless, in that study, the intervention period was 120 days, whereas the duration of the present study was 35 days, since its principal objective was to evaluate the effect of the Moringa leaf extract on intimal hyperplasia. In this case, in order to fulfill this objective, the intervention had to occur within four weeks, since the phases of intimal hyperplasia are of this duration, as reported by Liu et al. (3) and Indolfi et al. (29).

Restenosis following angioplasty with a balloon catheter is the result of negative elastic remodeling and the proliferation and migration of the vascular smooth muscle cells (VSMC). In a model using rat carotids, it was shown that in response to the angioplasty-induced injury, the arterial wall releases growth factors and other biologically active factors that change the composition of the extracellular matrix and promote the change of the VSMC from contractile to synthetic phenotype (dedifferentiation), leading to proliferation of the cells in the medial layer and migration to the intimal layer, thus inducing neointima formation (29).

Some studies have recommended the porcine model as being ideal for reproducing hyperplasia (31). Nevertheless, a good restenosis model requires animals that are cheaper, more readily accessible and simple to manipulate (29). As in the studies conducted by Le Tourneau et al. (32) and Knopfholz et al. (21), in the present study it was decided to use the iliac arteries of hypercholesterolemic rabbits as the animal model for atherosclerosis and myointimal hyperplasia.

The present study used a dose of 200 mg/kg/day, as adopted by Metha et al. (30); however, those investigators used the fruits of the tree. Other studies such as that conducted by Jain (2010) (33) used doses of up to 600

mg/kg/day when evaluating the hypolipidemic activity of *Moringa oleifera* Lam. Therefore, other higher concentrations could be tested.

In relation to lipid levels, results were similar to those found in the literature. This may be due to the fact that the atherogenic diet was discontinued during the evaluation period following angioplasty, since the idea was to use the atherogenic diet to enable angioplasty to be performed on an artery affected by atherosclerosis, thus simulating a situation that would be closer to reality.

Finally, no statistically significant difference was found in relation to the myointimal area when the control group that received saline solution was compared with the group that received the Moringa leaf extract at a dose of 200 mg/kg/day. It is possible that the dose of Moringa extract used was too low and this may explain why no significant reduction in myointimal hyperplasia was obtained.

The results of this study open up new possibilities for testing other concentrations of Moringa leaf extract, and other parts of the plant could also be tested, since a growing number of studies are showing beneficial effects when this plant is used for medicinal purposes.

One hypothesis that may explain the lack of statistically significant findings concerns the small sample size; however, articles published in the literature have shown that studies conducted with similar sample sizes were able to produce statistically significant differences.

### **Conclusion**

No difference was found in myointimal hyperplasia between the group treated with saline solution and that treated with *Moringa Oleifera* following angioplasty.

**Source of funding:** This research was founded by the principal author.

**Conflicts of interests:** I declare to have no conflict of interest in this research.

## 6. BIBLIOGRAPHY

1. Dinis da Gama A. New trends in the prevention of myointimal hyperplasia and anastomotic fibroplasia. *Rev Port Cir Cardiorac Vasc* 2007;14(4):211-5.
2. Il'inskaia OP, Antropova IuG, Kalinina NI, Mishina VA, Tararak M, Smirnov VN. A new concept of development of neointimal hyperplasia. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova* 2004;90(10):1203-14.
3. Liu MW, Roubin GS, King SB 3rd. Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation* 1989;79(6):1374-87.
4. Olson ME. Combining data from DNA sequences and morphology for a phylogeny of Moringaceae (Brassicales). *Syst Bot* 2002;27(1):55–73. doi: <http://dx.doi.org/10.1043/0363-6445-27.1.55>
5. Ramachandran C, Peter KV, Gopalakrishnan PK. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. *Econ Bot* 1980;34(3):276–83.
6. Anwar F, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytother Res* 2007;21(1):17-25.
7. Kumar PS, Mishra D, Ghosh G, Panda CS. Medicinal uses and pharmacological properties of *Moringa oleifera*. *Int J Phytomed* 2010;2(3):210–6.
8. Bennett RN, Mellon FA, Foidl N, Pratt JH, Dupont MS, Perkins L, Kroon PA. Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (horseradish tree) and *Moringa stenopetala* L. *J Agric Food Chem* 2003;51(12):3546–53.
9. Aslam M, Anwar F, Nadeem R, Rashid U, Kazi TG, Nadeem M. Mineral composition of *Moringa oleifera* leaves and pods from different regions of



Punjab, Pakistan. Asian J Plant Sci 2005;4(4):417-21. DOI: 10.3923/ajps.2005.417.421

10. Manguro LO, Lemmen P. Phenolics of *Moringa oleifera* leaves. Nat Prod Res 2007;21(1):56–68.

11. Amaglo NK, Bennett RN, Lo Curto RB, Rosa EAS, Lo Turco V, Giuffrida A, Lo Curto A, Crea F, Timpo GM. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. Food Chemistry 2010;122(4):1047-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.073>

12. Gowrishankar R, Kumar M, Menon V, Divi SM, Saravanan M, Magudapathy P, Panigrahi BK, Nair KG, Venkataramaniah K. Trace element studies on *Tinospora cordifolia* (Menispermaceae), *Ocimum sanctum* (Lamiaceae), *Moringa oleifera* (Moringaceae), and *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae) using PIXE. Biol Trace Elem Res 2010;133(3):357–63. doi: 10.1007/s12011-009-8439-1.

13. Scheller B, Speck U, Abramjuk C, Bernhardt U, Böhm M, Nickenig G. Paclitaxel balloon coating, a novel method for prevention and therapy of restenosis. Circulation 2004;110(7):810–4.

14. Unverdorben M, Vallbracht C, Cremers B, Heuer H, Hengstenberg C, Maikowski C, Werner GS, Antoni D, Kleber FX, Bocksch W, Leschke M, Ackermann H, Boxberger M, Speck U, Degenhardt R, Scheller B. Paclitaxel-coated balloon catheter versus paclitaxel-coated stent for the treatment of coronary in-stent restenosis. Circulation 2009;119(23):2986–94. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.839282.

15. Scheller B, Hehrlein C, Bocksch W, Rutsch W, Haghi D, Dietz U, Böhm M,

Speck U. Treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter. *N Engl J Med* 2006;355(20):2113–24.

16. Scheller B, Hehrlein C, Bocksch W, Rutsch W, Haghi D, Dietz U, Böhm M, Speck U. Two year follow-up after treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter. *Clin Res Cardiol* 2008;97(10):773–81. doi: 10.1007/s00392-008-0682-5.

17. Santos JAB. Estudo da aterosclerose induzida por diferentes tipos de dieta hiperlipídica em coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*) [Dissertação de mestrado]. Macéio: Universidade Federal de Alagoas; 2008.

18. Vieira S. Metodologia científica para a área de saúde. São Paulo: Sarvier; 1984. p. 98.

19. Harkness JE, Wagner JE. Procedimentos clínicos. In: Harkness JE, editor. *Biologia e clínica de coelhos e roedores*. 3a ed. São Paulo: Roca; 1993. pp. 57-85.

20. Fonseca NM, Goldenberg S, Gomes PO, Lima CAP. Anestesia em coelhos. *Acta Cirurgica Brasileira* 1996;11(2):82-104.

21. Knopfholz J, Précoma DB, Brofman PR, Bier GE, Silva RF, Silva AP, Lemos AC, Silva PO, Moraes JD. [The effect of L-arginine on neointimal proliferation and artery remodeling on an iliac artery lesion caused by a balloon catheter in hypercholesterolemic rabbits]. *Arq Bras Cardiol* 2006;87(4):520-4. <http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2006001700018>.

22. Cortelekoglu T, Bozkurt AK, Ustundag N, Koksall C, Sayin AG. The effects of clopidogrel and calcium dobesilate on intimal hyperplasia following vascular injury. *Acta Chir Belg* 2006;106(2):206-10.

23. Brasselet C, Durand E, Addad F, Vitry F, Chatellier G, Demerens C, Lemitre M, Garnotel R, Urbain D, Bruneval P, Lafont A. Effect of local heating on restenosis and in-stent neointimal hyperplasia in the atherosclerotic rabbit model: a dose-ranging study. *Eur Heart J* 2008;29(3):402-12. doi: 10.1093/eurheartj/ehm596.
24. Braitman LE. Confidence intervals assess both clinical significance and statistical significance. *Ann Intern Med* 1991;114(6):515-7.
25. Yanni AE. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Lab Anim* 2004;38(3):246-56.
26. Peng S, Guo W, Morrisett JD, Johnstone MT, Hamilton JA. Quantification of cholesteryl esters in human and rabbit atherosclerotic plaques by magic-angle spinning (13)C-NMR. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(12):2682-8.
27. Taylor JM, Fan J. Transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis. *Front Biosci* 1997;2:d298-308.
28. Kudo T, Chandra FA, Ahn SS. Long-term outcomes and predictors of iliac angioplasty with selective stenting. *J Vasc Surg* 2005;42(3):466-75.
29. Indolfi C, Torella D, Coppola C, Stabile E, Esposito G, Curcio A, Pisani A, Cavuto L, Arcucci O, Cireddu M, Troncone G, Chiariello M. Rat carotid artery dilation by PTCA balloon catheter induces neointima formation in presence of IEL rupture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283(2):H760-7.
30. Mehta K, Balaraman R, Amin AH, Bafna PA, Gulati OD. Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. *J Ethnopharmacol* 2003;86(2-3):191-5.
31. Karas SP, Gravanis MB, Santoian EC, Robinson KA, Anderberg KA, King

SB 3rd. Coronary intimal proliferation after balloon injury and stenting in swine: an animal model of restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1992;20:467–74.

32. Le Tourneau T, Van Belle E, Corseaux D, Vallet B, Lebuffe G, Dupuis B, Lablanche JM, McFadden E, Bauters C, Bertrand ME. Role of nitric oxide in restenosis after experimental balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit: effects on neointimal hyperplasia and vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 1999;33(3):876-82.

33. Jain PG, Patil SD, Haswani GN, Girase MV, Surana SJ. Hypolipidemic activity of *Moringa oleifera Lam.* Moringaceae, on high fat diet induced hyperlipidemia in albino rats. *Brasilian Journal of Pharmacology* 2010; 20(6):969-73.

## ANNEXES

Table 1 - Medium Complex Intimal iliac arteries

Group	Mean %	Standard Deviation (+/-)	CI 95%	Min	Max
SF 0,9%	35,74	5,56	31,76 a 39,71	29,23	45,46
M 200	38,66	7,39	33,37 a 43,94	24,1	47,02

P = 0,33

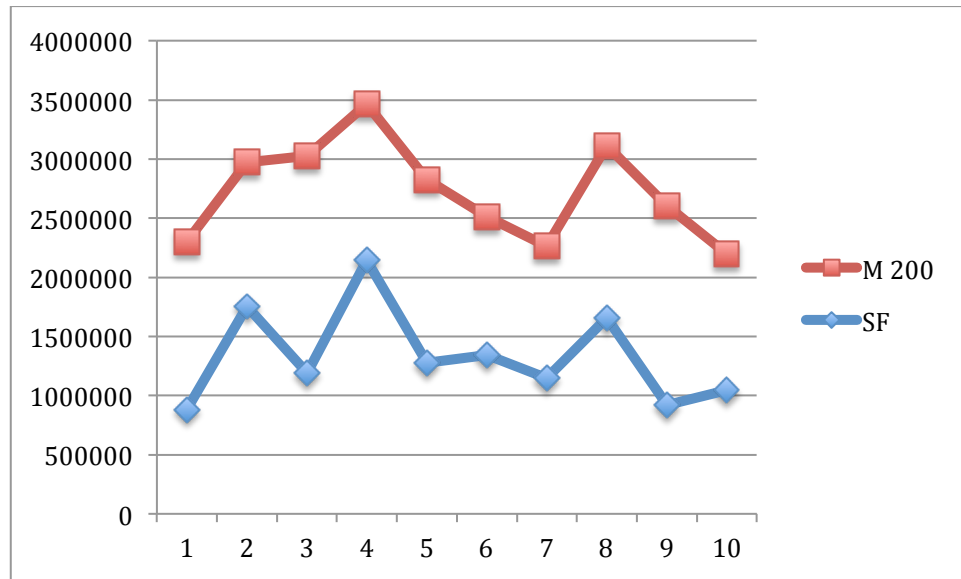


Chart 1 - Measure in pixels of the complex myo intimal Wall Area

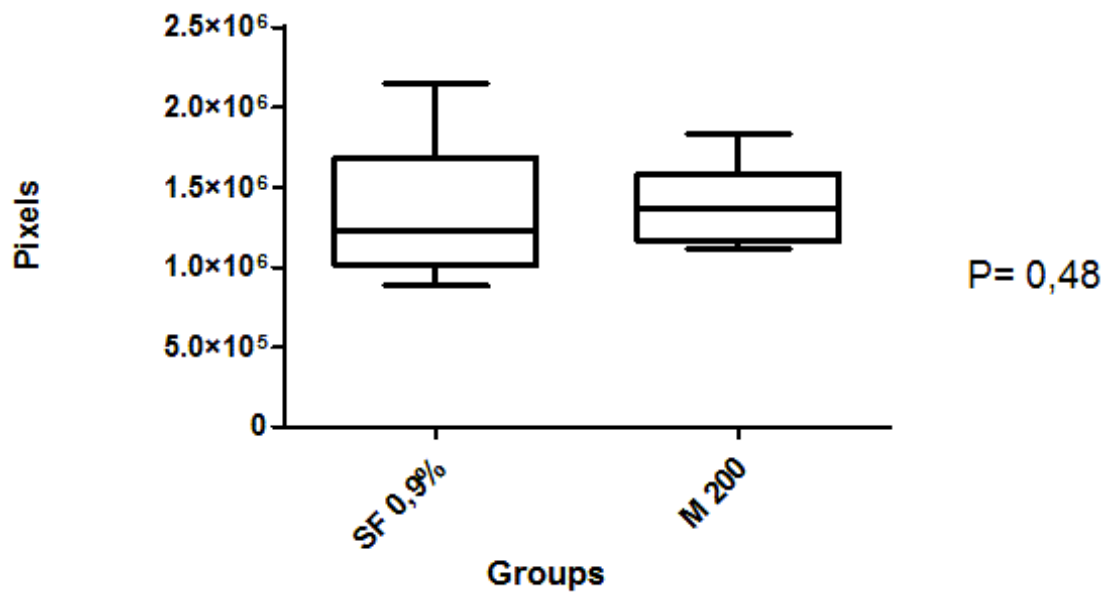


Chart 2 - Comparison of areas of the walls of the arteries of rabbits

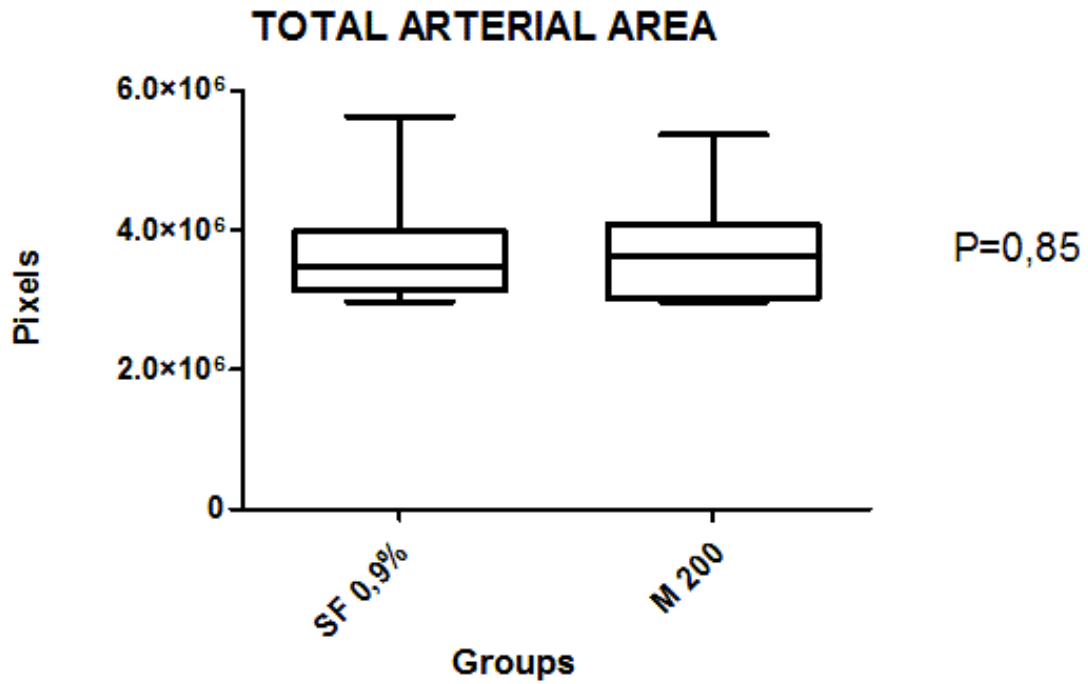


Chart 3 – Comparison of totals áreas of the arteries of rabbits

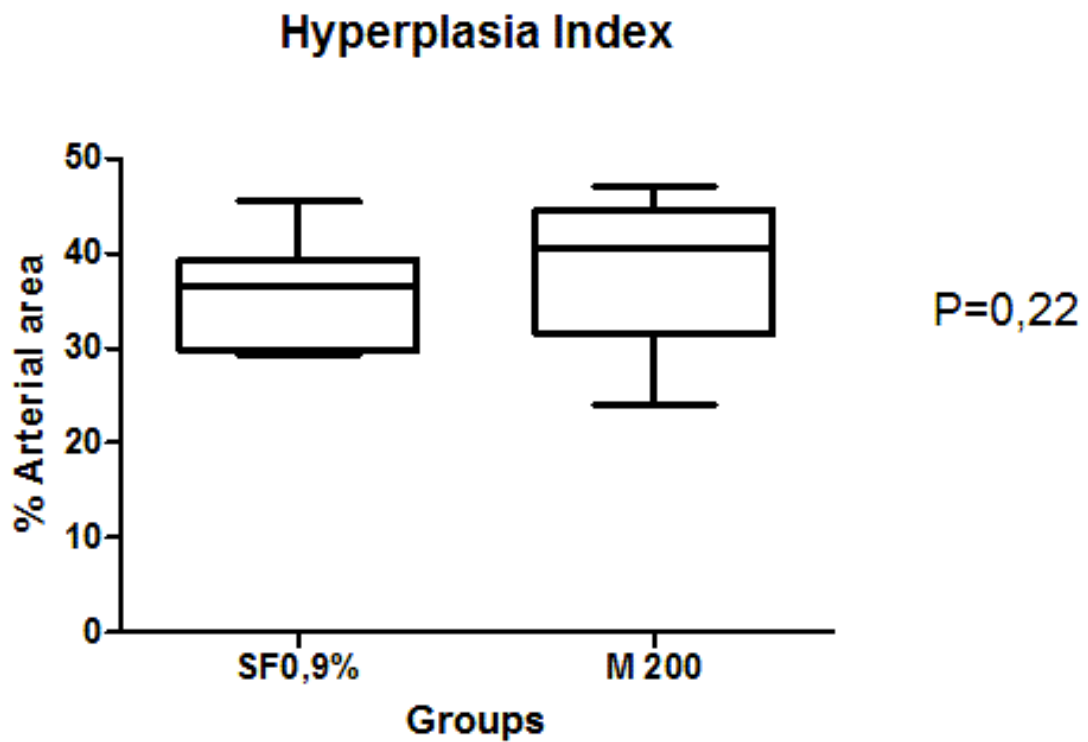


Chart 4 - Comparison of rates of hyperplasia of the arteries of rabbits

## SECUNDARIES VARIABLES

Table 2 - lipid pre medication - SF Group

SF 0,9%						
		Mean	Standard Deviation (+/-)	CI 95%	Max	Min
Total						
Cholesterol(mg/dl)		53,1	50,11	17,26 a 88,94	194	25
HDL (mg/dl)		20,87	6,966	15,887 a 25,853	32,8	3,9
LDL (mg/dl)		14,8	37,37	11,93 a 41,53	120	-6
VLDL (mg/dl)		17,5	18,65	4,16 a 30,54	70	9
Triglycerides (mg/dl)		88,5	95,44	20,22 a 156,78	269	39

Table 3 - Lipid pre medication M 200 Group

M 200						
		Mean	Standard Deviation (+/-)	CI 95%	Max	Min
Total						
Cholesterol(mg/dl)		44,75	11,23	35,36 a 54,14	61	29
HDL (mg/dl)		23,513	3,702	20,418 a 26,607	55	28
LDL (mg/dl)		5,13	12,02	4,92 a 15,17	25	-9
VLDL (mg/dl)		16,25	3,58	13,26 a 19,24	20	10
Triglycerides (mg/dl)		82,63	18,41	67,24 a 98,01	100	51

Table 4 - Lipid after medication - SF Group

SF 0,9%						
		Mean	Standard Deviation (+/-)	CI 95%	Max	Min
Total						
Cholesterol(mg/dl)		46,4	19,66	32,33 a 60,47	97	31
HDL (mg/dl)		19,08	16,189	7,499 a 30,661	53,8	7,8
LDL (mg/dl)		11,17	9,815	4,149 a 18,191	38	4,7
VLDL (mg/dl)		16,15	6,627	11,409 a 20,891	26,7	5,2
Triglycerides (mg/dl)		95,4	80,95	37,49 a 153,31	269	39

Tabela 5 - Lipidograma pós medicação – Grupo M 200

M 200						
		Mean	Standard Deviation (+/-)	CI 95%	Max	Min
Total						
Cholesterol(mg/dl)		42,56	11,2	33,94 a 51,17	55	28
HDL (mg/dl)		22,778	9,101	15,782 a 29,773	37,5	5,1
LDL (mg/dl)		3,889	8,525	2,664 a 10,442	22,7	-5,2
VLDL (mg/dl)		15,9	6,13	11,188 a 20,612	27,2	9,4
Triglycerides (mg/dl)		79,44	30,66	55,87 a 103,01	136	47

### Supplementary data

**Table 6 - Comparison of the weights of the rabbits before and after experiment**

Groups	Mean (g)	Standard Deviation (+/-)	N	
SF pré	3153	633,39	10	
SF pós	2978,3	588,77	10	
M 200 pré	3392,6	326,93	10	
M 200 pós	3276,1	367,01	10	

P < 0,0001 Weight M 200

P < 0,0001 Weight SF

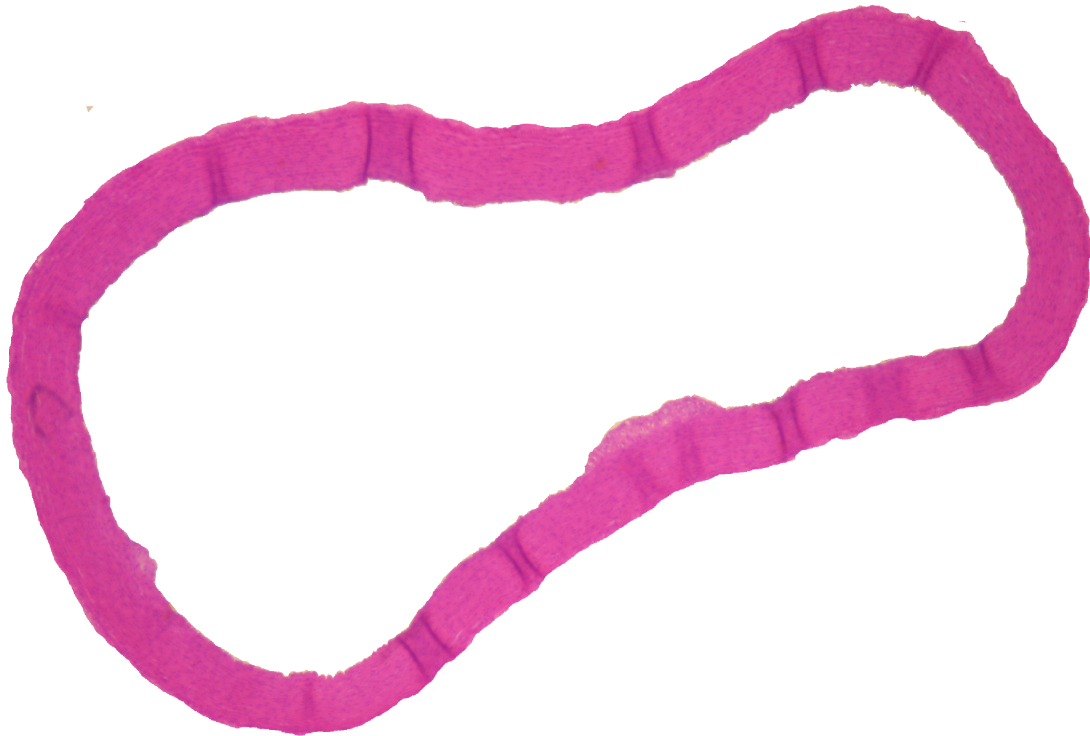


Fig 7 - Complex Iliac Artery Intimal Mio Rabbit treated with 200 M



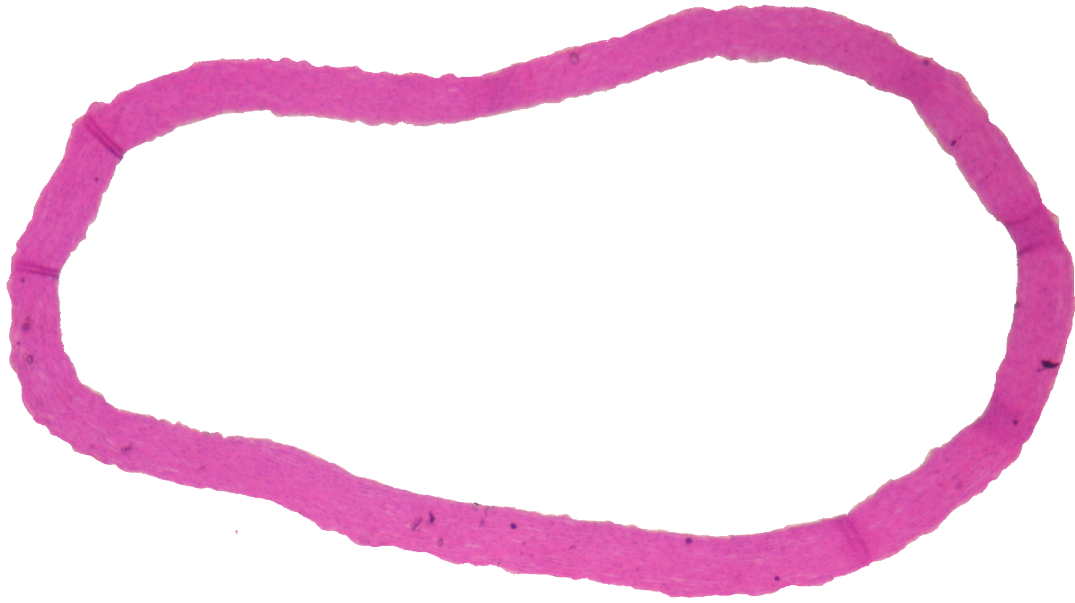


Fig 8 - Complex Iliac Artery Intimal myo treated with SF

## CIP - Catalogação na Publicação

Cipriano Rolim, Janio

Diferença da hiperplasia miointimal em coelhos submetidos a angioplastia e tratados com Moringa Oleifera / Janio Cipriano Rolim. -- 2012.

81 f.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Benjamin Brandão Pitta.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Hiperplasia. 2. Miointimal. 3. Moringa. 4. Coelhos. 5. Angioplastia. I. Benjamin Brandão Pitta, Prof. Dr. Guilherme, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).