

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
FACULDADE DE MEDICINA**

**LUANA MARIA RELVAS D'OLIVEIRA  
THAÍS TAPAJÓS GONÇALVES**

**MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DE  
HIPERCOLESTEROLEMIA, COM FORMAÇÃO DE PLACAS  
ATEROSCLERÓTICAS EM AORTA DE COELHOS**

Belém  
2009

**LUANA MARIA RELVAS D'OLIVEIRA  
THAÍS TAPAJÓS GONÇALVES**

**MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DE  
HIPERCOLESTEROLEMIA, COM FORMAÇÃO DE PLACAS  
ATEROSCLERÓTICAS EM AORTA DE COELHOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado para obtenção do grau em  
Medicina pela Universidade Federal do  
Pará.

Orientadora: Profa. Msc. Claudine Maria  
Alves Feio

Belém  
2009

**LUANA MARIA RELVAS D'OLIVEIRA  
THAÍS TAPAJÓS GONÇALVES**

**MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DE  
HIPERCOLESTEROLEMIA, COM FORMAÇÃO DE PLACAS  
ATEROSCLERÓTICAS EM AORTA DE COELHOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do grau em Medicina  
pela Universidade Federal do Pará.

BANCA EXAMINADORA:

\_\_\_\_\_  
Profa. Claudine Maria Alves Feio

\_\_\_\_\_  
Examinador 2

\_\_\_\_\_  
Examinador 3

AVALIADO EM: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

CONCEITO: \_\_\_\_\_

Aos meus pais e irmão por sempre apoiarem incondicionalmente minha jornada acadêmica, sempre me incentivando e encorajando. À minha parceira neste projeto Luana Relvas, uma grande pessoa além de grande amiga, uma irmã que Deus me permitiu escolher.

Thaís Tapajós

Aos meus pais e irmãos pelo incitamento e compreensão no decorrer desta caminhada. Ao meu namorado, Fabrício, pelo incentivo e colaboração. Aos amigos que estiveram presentes, me apoiando incondicionalmente e em especial a minha parceira nesta jornada, Thaís Tapajós, que só ratificou sua amizade e companheirismo ao longo deste projeto

Luana Relvas

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup> Msc. Claudine Feio pela honrável orientação deste trabalho, pelas sugestões sempre pertinentes, pela disponibilização sempre feita, pela paciência desprendida e pelo conhecimento compartilhado. O resultado deste trabalho árduo não seria o mesmo sem sua preciosa colaboração;

Ao Prof. Msc. Max Feio por suas sugestões sempre embasadas, pelas observações importantes e pelo companheirismo durante o curso deste projeto;

Ao Prof. Paulo Azevedo e à biomédica Dra. Ligia Gomes, pela imensurável contribuição na análise laboratorial das amostras sangüíneas tornando real todo esforço e dedicação no decorrer desta empreitada;

Ao Prof. Dr. Paulo Amorim, Coordenador da Unidade Multidisciplinar de Experimentação (UME) por ter cedido o espaço para a pesquisa e por ser sempre tão solícito às nossas dúvidas e questionamentos;

À Patologista e Prof<sup>a</sup> Marialva pela enorme colaboração no processo de sudanilização das aortas. Aprendemos muito durante as horas passadas no setor de patologia sob sua orientação;

À Dr<sup>a</sup> Silvia, patologista da UNIFESP, por ter realizado a histomorfometria e relação íntima-média desde trabalho, obrigada por tamanha presteza e, sobretudo, por ter sido não hábil em suas funções, seus resultados foram não apenas importantes como fundamentais para esta monografia.

À Dr<sup>a</sup>. Gilmara Abreu, médica veterinária, por sua colaboração no decorrer do projeto, sempre disposta a dividir o conhecimento de sua área.

Ao amigo e companheiro de jornada acadêmica Marcelo d'Oliveira pela colaboração na elaboração do abstract e pela amizade;

À técnica Andréia Carvalho da Silva, sua habilidade em punção venosa nos foi muito útil na hora das coletas laboratoriais, diminuindo o tempo do procedimento bem como o estresse dos animais, nosso muito obrigada;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Eliete Cunha, diretora do ICS, por possibilitar a realização deste trabalho com disponibilização de espaço e equipamentos, sem os quais tal pesquisa seria inviável;

Ao Prof. Dr. Francisco Antônio Helfstein Fonseca, da UNIFESP, pela coordenação deste projeto;

Aos nossos pais, irmãos e amigos, por compreenderem nossa ausência durante esta empreitada e por sempre nos receberem com palavras positivas, tornando muito agradável o retornar para casa.

*“O homem não teria alcançado o possível se, repetidas vezes, não tivesse tentado o impossível.”*

*Max Weber*

## RESUMO

**Introdução:** A hipercolesterolemia e sua relação com a aterosclerose, em particular a doença coronária, continuam sendo motivo de grande interesse do conhecimento científico. **Objetivo:** apresentar um modelo experimental satisfatório de indução e manutenção de hipercolesterolemia em coelhos, com formação de placa aterosclerótica. **Material e métodos:** 10 coelhos Nova Zelândia sadios foram submetidos a dieta suplementada de colesterol 0,5% por 3 meses para indução da hipercolesterolemia e 0,1% por mais 3 meses para manutenção desta. Foi dosado o perfil lipídico em 3 etapas do experimento, adotando-se os níveis basais como controle-negativo. Após eutanásia, a artéria aorta foi retirada para análise de áreas sudanofílicas e realizada morfohistometria em 3 regiões da aorta. **Resultados:** Foi observado aumento do colesterol total, chegando a  $1203,7 \pm 76,9$  e  $206,7 \pm 69,7$  posteriormente; LDL-c, com média de  $458 \pm 277,7$  e final de  $62,4 \pm 26,2$ ; e triglicerídios que se elevou para  $372 \pm 417,3$  e diminuiu para valores próximos aos basais. O HDL-c permaneceu em níveis próximos aos basais:  $34,7 \pm 10,1$  e  $27,2 \pm 8,0$ . A análise macroscópica mostrou extensas áreas sudanofílicas, correspondentes a placas ateroscleróticas, com média de  $68 \pm 27,9 \text{ mm}^2$ . A Histomorfometria mostrou relação íntima-média de  $1,35 \pm 0,54$  na crossa da aorta,  $1,54 \pm 0,55$  na porção torácica e  $0,93 \pm 1,01$  na porção abdominal. **Conclusão:** o modelo experimental utilizado apresentou alterações no perfil lipídico condizentes com aterogênese, áreas correspondentes à placas ateroscleróticas e espessamento intimal observado na relação íntima-média das artérias aórticas.

**Palavras-chave:** Perfil Lipídico, aterosclerose, modelo experimental, relação íntima-média

## ABSTRACT

**Introduction:** The hypercholesterolemia and its relation to atherosclerosis, especially the coronary disease, are an important subject for the scientific community. **Objective:** to present a satisfactory experimental model to induce hypercholesterolemia and atherosclerosis in rabbits. **Methods:** ten *New Zealand* rabbits were submitted to supplemented diet (cholesterol 0,5 %) for three months to induction and for other three months (cholesterol 0,1 %) to maintain the hypercholesterolemia. The lipid profile was dosed in three stages of the experiment, adopting basal levels as negative control. After euthanasia, the aortic tissue was obtained for analysis of sudanofilic areas and submitted to morfohistometry at three different aortic areas. **Results:** it was observed elevation of total cholesterol, reaching  $1203,7 \pm 76,9$  and  $206,7 \pm 69,7$ , later; LDL – c with average  $458 \pm 277,7$  and  $62,4 \pm 26,2$  at the end; and triglycerides elevated to  $372 \pm 417,3$  and returned to values closed to basal levels. The HDL – c remained in values closed to basal levels:  $34,7 \pm 10,1$  and  $27,2 \pm 8,0$ . The macroscopic analysis showed extensive sudanofilic areas, corresponding to atherosclerotic plaques (average:  $68 \pm 27,9 \text{ mm}^2$ ). The morfohistometry revealed values of intima-media thickness relation:  $1,35 \pm 0,54$  in transverse arch,  $1,54 \pm 0,55$  in thoracic segment and  $0,93 \pm 1,01$  in abdominal segment. **Conclusion:** the experimental model presented alterations in the lipid profile compatible to atherosclerosis, areas related to atherosclerotic plaques and intimal thickness observed in the intima-media thickness relation of aortic tissue.

**Key-words:** Lipid profile, atherosclerosis, experimental model, intima-media thickness relation.

## LISTA DE ABREVIATURAS

CETP – proteína de transferência de ésteres de colesterol.

CT – colesterol total.

CV's – eventos cardiovasculares.

DAC – doença arterial coronariana.

DCV – doenças cardiovasculares.

EIM – espessura íntima-média.

HAS – hipertensão arterial sistêmica.

HDL – lipoproteína de alta densidade.

HDL-c – colesterol ligado a lipoproteína de alta densidade.

ICS – Instituto de Ciências da Saúde

IDL – lipoproteína de densidade intermediária.

LDL – lipoproteína de baixa densidade.

LDL-c – colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade.

LDL-m – lipoproteína de baixa densidade modificada.

LDL-ox – lipoproteína de baixa densidade oxidada.

PAS – pressão arterial sistólica.

SBC – sociedade brasileira de cardiologia

TG – triglicérides.

UFPA – Universidade Federal do Pará

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo.

UME – Unidade Multidisciplinar de Experimentação.

US – Ultra-som.

VCAM-1 – molécula de adesão ao endotélio

VHDL – lipoproteína de muito alta densidade;

VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade;

VLDL-c – colesterol ligada à lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	11
1.1 OBJETIVOS	12
1.1.1 Objetivo Geral	12
1.1.2 Objetivos Específicos	12
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	13
2.1 EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES ATEROSCLERÓTICAS	13
2.2 METABOLISMO LIPÍDICO	14
2.3 ATEROGÊNESE E DOENÇA ATEROSCLERÓTICA	17
2.4 O COELHO COMO MODELO EXPERIMENTAL	20
2.5 RELAÇÃO ÍNTIMA-MÉDIA E PREVISÃO DE RISCO CARDIOVASCULAR	22
2.5.1 USO DO US NA MEDIDA DA ESPESSURA ÍNTIMA-MÉDIA	25
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	27
3.1 Tipo de Estudo	27
3.2 Local do estudo	27
3.3 Amostra	27
3.4 Preparo da Dieta	29
3.5 Indução da Hipercolesterolemia – 1ª fase	29
3.6 Manutenção da hipercolesterolemia – 2ª fase	29
3.7 Procedimentos	31
3.8 Análise Laboratorial	31
3.9 Análise Macroscópica	32
3.10 Análise Morfométrica	32
3.11 Aspectos Éticos	32
3.12 Análise Estatística	33
<b>4. RESULTADOS</b>	33
<b>5. DISCUSSÃO</b>	38
<b>6. CONCLUSÃO</b>	44
<b>REFERÊNCIAS</b>	45
APÊNDICE A	51
ANEXO A	52

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) ocupam o topo da lista das maiores causas de mortalidade mundial, com aproximadamente 12 milhões de óbitos ao ano. Estudos experimentais e clínico-epidemiológicos comprovam que a aterosclerose é uma doença multifatorial, sendo comprovada a influência da hipercolesterolemia na doença arterial coronária, problema de saúde pública do mundo ocidental. Os níveis séricos de colesterol dependem de fatores genéticos e dietéticos, bem como por fatores ambientais. Dentre os principais fatores de risco envolvidos na doença arterial coronariana, temos: a dislipidemia, o tabagismo, a diabetes, a hipertensão arterial, a obesidade, o sedentarismo e a história familiar positiva para doença arterial coronária (KOLANKIEWICZ; GIOVELLI e BELLINASSO, 2008; POZZAN; POZZAN e BRANDÃO, 2005).

O perfil lipídico corresponde ao dado laboratorial recomendado pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) para acompanhamento de dislipidemias e prevenção de aterosclerose (SPOSITO et al, 2007). Atualmente, outros métodos de investigação têm sido descritos como parâmetro de avaliação da doença aterosclerótica, como é o caso da Ultrassonografia (US) de artéria carótida, que estima a relação íntima-média como fator preditivo da doença (TORRES et al, 2007).

Diversos modelos experimentais foram descritos na literatura com a finalidade de estudar a aterogênese e observar o comportamento do perfil lipídico e das placas ateroscleróticas mediante diferentes dietas e administração de drogas.

Perante à importância desta doença no âmbito mundial, bem como em nosso país, torna-se pertinente o estabelecimento de um modelo experimental que contemple as alterações do perfil lipídico e espessamento intimal de forma semelhante ao que ocorre em humanos.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo do presente trabalho é comprovar a eficácia de um modelo experimental de indução e manutenção de hipercolesterolemia, com formação de placas ateroscleróticas em artérias aorta de coelhos a partir de dieta apropriada para a espécie, acrescida de colesterol purificado sintético.

### **1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar o perfil lipídico dos animais antes de oferecer a dieta hipercolesterolêmica (amostra basal para controle-negativo);

- Induzir hipercolesterolemia nos animais normocolesterolêmicos, com dieta padrão acrescida de colesterol purificado em pó 0,5% por três meses;

- Verificar o perfil lipídico dos coelhos para confirmação de hipercolesterolemia;

- Promover manutenção de hipercolesterolemia com dieta padrão acrescida de colesterol purificado 0,1% por mais três meses;

- Verificar manutenção de hipercolesterolemia através do perfil lipídico;

- Analisar estatisticamente esta variância dos resultados laboratoriais obtidos durante as dosagens do perfil lipídico;

- Realizar exérese da artéria aorta ao final do seguimento, após eutanásia dos animais; analisar macroscopicamente a peça com o uso do corante Sudan IV e histologicamente através da histomorfometria de três seguimentos (crossa, aorta torácica e aorta abdominal).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES ATEROSCLERÓTICAS**

O grupo de DCV assume importante destaque na morbimortalidade mundial, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (LIBBY, 2002). No Brasil, essa classe de doenças representa a principal causa de óbito (32%) globalmente e em cada região isolada. Isso se deve por vários fatores, dentre eles o declínio da mortalidade por doenças infectocontagiosas, devido à melhora de condições de saneamento, ampliação do sistema de imunização e políticas públicas afins (GUS, 2003). Outro fator responsável por esse predomínio atual de DCV como principal causa de mortalidade no Brasil é processo de transição demográfica. Considerando que DCV têm sua prevalência aumentada com o decorrer da idade, o envelhecimento da população, derivado do aumento da expectativa de vida, tem papel importante nesse contexto (STEFFENS, 2003; ACHUTTI et al, 2003).

O conhecimento de fatores de risco tem grande importância no controle clínico e epidemiológico dessa classe de doenças. Estes podem ser divididos em modificáveis e não-modificáveis. No primeiro grupo se encontram a idade, o sexo, a raça, etnia e história familiar. No segundo grupo, temos: a dislipidemia, o tabagismo,

a hipertensão arterial, o diabetes mellitus, o sedentarismo e a obesidade (ACHUTTI et al, 2003).

No Brasil observou-se uma prevalência de 24% de tabagistas na população acima de 5 anos, estando na faixa etária entre 30 e 40 anos a maior concentração; 15% hipertensos; 7,6% de diabéticos na população entre 30 e 69 anos e 8% de obesos e 32% da população na faixa de sobrepeso (IBGE, 1991). Quanto às dislipidemias, estudos específicos para regiões mostram prevalências em torno de 25%, sendo maiores no sexo feminino (KOLANKIEWICZ; GIOVELLI e BELLINASO, 2008; POZZAN; POZZAN e BRANDÃO, 2005).

A SBC preconiza que se utilize o perfil lipídico como dado laboratorial para acompanhamento de dislipidemias e prevenção de aterosclerose (SPOSITO et al, 2007).

## **2.2 METABOLISMO LIPÍDICO**

As alterações dos lípidos sanguíneos, particularmente a hipercolesterolemia e sua relação com a aterosclerose, principalmente no que diz respeito à doença coronária continuam sendo motivo de grande interesse do conhecimento científico. O colesterol é um lipídeo que está presente amplamente no organismo, tanto nos tecidos como nas lipoproteínas plasmáticas, seja sob a forma livre ou esterificada com ácidos graxos formando ésteres de colesterol. Sua importância fisiológica reside no amplo papel que desempenha dentro do organismo, seja como precursor de ácidos biliares (necessários para a absorção de gorduras da dieta), de hormônios glicocorticóides e mineralocorticóides, seja na síntese dos hormônios sexuais como os andrógenos, estrógenos e progestágenos e também na formação de vitamina D. Ressaltamos também seu relevante papel estrutural, como componente das membranas celulares, incluindo as do sistema nervoso central, onde está presente de forma abundante, assim como também é um dos constituintes das lipoproteínas

que transportam triglicérides e fosfolipídios. O colesterol presente diariamente no intestino tem duas origens: o encontrado na bile formando os ácidos biliares (600-1000 mg) e o da dieta (250-500 mg) (ILIB, 2000).

Todo o colesterol consumido é de origem animal, pois as plantas não o contêm. Cerca de metade do colesterol que penetra na luz intestinal é absorvida e o restante é eliminado com a matéria fecal como coprostanol. O colesterol livre é insolúvel e para ser transportado dentro da corrente sanguínea necessita estar unido às lipoproteínas, que são moléculas que contêm um núcleo interno hidrofóbico constituído por triglicérides e colesterol esterificado e uma capa externa formada por compostos antipáticos como fosfolípidos e colesterol não esterificado, além de diversas proteínas chamadas apoproteínas, que de acordo com sua densidade são classificadas em vários grupos: quilomícrons (sintetizados no intestino, transportam o colesterol da dieta do intestino ao fígado); as VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), produzidas no fígado; as IDL (lipoproteínas de densidade intermediária); as LDL (lipoproteínas de baixa densidade), produzidas à partir do catabolismo das VLDL e IDL e no fígado; e finalmente as HDL (lipoproteínas de alta densidade), sintetizadas no fígado e em menor quantidade no intestino. O LDL é a principal molécula transportadora de colesterol no plasma e atualmente é considerada como fator independente de risco para doença coronária (GRUNDY et al, 1998).

A proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) contribui para a remoção do colesterol dos tecidos periféricos de volta ao fígado, e uma condição pró-aterogênica se estabelece quando sua ação está aumentada, como na resistência à insulina: triglicérides (TG) são transferidos das VLDLs para as LDLs e HDLs em troca de ésteres de colesterol. Então, a lipase hepática, cuja atividade também está aumentada, hidrolisa as LDLs e HDLs, gerando LDLpd (partículas pequenas e densas), além de resultar em hipertrigliceridemia e diminuição da HDL2, a subpopulação de HDLs com maior atividade antiaterogênica no plasma (SIQUEIRA; ABDALLA e FERREIRA, 2006).

As lipoproteínas plasmáticas são partículas constituídas por uma parte central de lipídios hidrofóbicos, circundados por uma monocamada de lipídios polares e apoproteínas. São sintetizadas e secretadas pelo fígado (VLDL) ou intestino (quilomícrons), ou resultam de transformações sofridas por estas partículas, como é o caso da IDL, LDL e HDL. Têm duas funções principais: solubilizar os lipídios no plasma e regular o movimento destes em sua entrada e saída de células-alvo e tecidos específicos. Classificam-se de acordo com sua densidade, sendo que a LDL encontra-se na faixa entre 1019 a 1063 g/ml (MAHLEY; WEISGRABER e FARESE, 2003).

Os níveis sanguíneos de colesterol total e da fração LDL-c (colesterol ligado à LDL) podem tornar-se elevados por consumo excessivo de calorias, gorduras saturadas, colesterol e também de proteína animal. Estes níveis podem ser reduzidos por diminuição do peso corpóreo, substituição de ácidos graxos saturados por ácidos graxos poliinsaturados e aumento de fibra alimentar, principalmente a fração solúvel da fibra que apresenta importantes efeitos hipocolesterolemiantes, consequentemente reduzindo o risco de doenças coronárias (PLAAMI, 1997; GRUNDY et al,1998).

Desde a disfunção endotelial até a ruptura de lesões na parede vascular, pode-se observar a participação ativa da LDLm como um agente pró-aterogênico. Inicialmente, os lipídios oxidados da partícula atuam como agressores ao endotélio e a resposta compensatória à injúria altera sua homeostase. A primeira lesão observada na parede arterial é a *estria gordurosa*, composta principalmente de macrófagos, transformados em células espumosas após a internalização da LDLox (LDL oxidada). A seguir, as células musculares lisas começam a migrar da camada média para a íntima, se proliferam e secretam colágeno, dando origem à *lesão intermediária*. Nesta fase, o espessamento da íntima provoca o remodelamento, ou seja, uma dilatação da artéria compensatória ao estreitamento do lúmen. Ciclos repetidos de acúmulo e ativação de células mononucleares, migração e proliferação das células musculares lisas com produção de colágeno, levam ao aumento progressivo da lesão, até que se estruture uma capa fibrosa ao redor de um núcleo

lipídico e de tecido necrótico, a chamada *lesão avançada*. Quando a artéria já não consegue se dilatar adequadamente, a lesão pode então alterar o fluxo sanguíneo, manifestando-se clinicamente por síndromes coronarianas estáveis (ROSS, 1999).

O HDL-c possui propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, anticoagulante, pró-fibrinolítica e de proteção endotelial (ASHEIKH; KUVIN e KARAS, 2005). Estas propriedades o tornam uma substância anti-aterogênica por diversos fatores como a inibição da infiltração de LDLox, protegendo o endotélio; inibição da expressão de moléculas de adesão ao endotélio, diminuindo *rollings* e diapedese; diminuição da produção de endotelina e aumento de gênese de prostaciclina; modular produção de peptídeo natriurético C; promoção de vasodilatação; estimulação de produção de células musculares lisas; e prevenção do dano celular e necrose por ativação do sistema complemento (FORTI; DIAMENT, 2006).

O perfil lipídico é definido pelas determinações bioquímicas do CT, HDL-c, TG e do LDL-c após jejum de 12 a 14 horas. O LDL-c pode ser calculado pela equação de Friedewald ( $LDL-c = CT - HDL-c - TG/5$ ), onde  $TG/5$  representa o VLDL-c (colesterol ligado à VLDL), ou diretamente mensurado no plasma. Em pacientes com hipertrigliceridemia ( $TG > 400\text{mg/dL}$ ), hepatopatia colestática crônica, diabetes melito ou síndrome nefrótica, a equação é imprecisa. Nestes casos, o valor do LDL-c pode ser obtido por dosagem direta (SPOSITO et al, 2007).

### **2.3 ATEROGÊNESE E DOENÇA ATEROSCLERÓTICA**

A aterosclerose representa uma degeneração das grandes e médias artérias, se caracterizando pela presença de ateromas (depósito de lipídios, principalmente colesterol, carboidratos, plaquetas, tecido fibroso, cálcio), no endotélio. A placa de ateroma é o término de um processo complexo, lento e insidioso, que pode acometer qualquer território arterial, todavia a aorta e os sítios coronariano e cerebral, são os mais prevalentes (ARAÚJO, 2007).

A lesão básica da aterosclerose é denominada ateroma (ou placa fibrogordurosa) e consiste em uma placa focal elevada no interior da íntima que possui um núcleo lipídico (principalmente colesterol e seus ésteres) e uma capa fibrosa que o recobre. Inicialmente, os ateromas distribuem-se esparsamente, porém aumentam de tamanho e se projetam cada vez mais na luz arterial, comprometendo o fluxo sanguíneo. Os ateromas também podem enfraquecer a parede dos vasos mais calibrosos, gerando aneurismas ou ruptura e favorecendo a trombose. Além disso, os mais extensos são friáveis e podem liberar êmbolos para a circulação distal (ateroêmbolos) (CONTRAN; KUMAR e COLLINS, 2000).

O termo ateroma foi primeiramente sugerido por Von Haller em 1755, porém foi Marchand, em 1904, quem criou a terminologia aterosclerose, para a degeneração gordurosa e hiperplasia do tecido conjuntivo na parede arterial (LASTORIA, 1987).

Com relação a sua patogenia, a aterosclerose se inicia como uma reposta inflamatória celular e molecular a algum tipo de lesão ao endotélio arterial, como as provocadas pelos fatores de risco já citados. O endotélio é responsável pela manutenção da integridade e função vasculares, modulando o tônus da musculatura lisa vascular e inibindo vários processos pró-aterogênicos, como a aderência de monócitos e plaquetas, a oxidação da LDL, a síntese de citocinas inflamatórias, a proliferação e migração de células musculares lisas e a agregação plaquetária. O principal mediador da função endotelial é uma substância vasodilatadora produzida no próprio endotélio, o óxido nítrico (NO) (ROSS, 1999).

A formação da placa de ateroma segue uma seqüência de eventos. Os fatores de risco agem sobre o endotélio vascular, e este responde de duas maneiras. Em uma delas ocorre diminuição da produção de anticoagulante, aumento da produção de pró-coagulante, aumento de moléculas vasoativas, e aumento de citocinas e fatores de crescimento. A outra resposta apresenta aumento da permeabilidade, e aumento da aderência de leucócitos e plaquetas. Esta primeira

fase pode ser definida como *estado inflamatório*. A partir do estado inflamatório há liberação de monócitos e linfócitos T, onde ocorrerá proliferação de células musculares lisas levando à chamada *lesão intermediária*. A lesão intermediária levará ao espessamento da parede arterial com conseqüente processo de remodelação, sendo um processo que visa melhorar a luz do vaso para melhor irrigação distal a lesão. Com isso, mais macrófagos e linfócitos serão liberados, seguindo o aparecimento de enzimas hidrolíticas e fatores de crescimento. O fenômeno entrará em ciclos repetidos com reestruturação da lesão apresentando uma cápsula fibrosa com núcleo de tecidos necrosados e lipídios levando assim à *lesão avançada ou complicada* (AZIZI et al, 2003).

A arteriosclerose abrange três variantes morfológicas distintas: (a) aterosclerose, caracterizada por espessamento e acúmulo de lipídio na camada íntima arterial; (b) esclerose medial calcificada de Monckeberg, onde se observa calcificação da camada média das artérias musculares; e (c) arteriolosclerose, caracterizada por um espessamento proliferativo ou hialino das paredes das pequenas artérias e arteríolas (ROSS, 1999).

A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular devido a diversos fatores de risco como elevação de lipoproteínas aterogênicas (LDL, IDL, VLDL, remanescentes de quilomícrons), hipertensão arterial ou tabagismo. Como conseqüência, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial. Retidas, as partículas de LDL sofrem oxidação, causando a exposição de diversos neo-epítomos, tornando-as imunogênicas. O depósito de lipoproteínas na parede arterial, processo-chave no início da aterogênese, ocorre de maneira proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma (SPOSITO et al, 2007).

Lesões ateroscleróticas se iniciam quando as LDL se acumulam na parede arterial, primeiro passo na evolução do ateroma, sendo a geração de uma estria

gordurosa acompanhando a retenção de LDL na matriz extracelular subintimal (BLASI, 2007; HANSSON, 2009).

As estrias gordurosas podem ser precursoras da placa, são pouco elevadas com aspecto de manchas planas de cor amarela com medida que pode ser menor que 1 mm até 1 cm; composta de células espumosas, lipídios e linfócitos T, porém em menor quantidade do que a placa de ateroma. Acomete a aorta abaixo de 1 ano e acima de 10 anos de idade, e as artérias coronárias na adolescência (CONTRAN; KUMAR e COLLINS, 2000).

As artérias carótidas e subclávias são artérias elásticas, com um componente muscular muito pequeno e predomínio da camada íntima. Em contraste, nas artérias periféricas como a artéria femoral, observa-se predomínio da camada muscular média. Portanto, o EMI nas artérias carótidas e subclávias representa principalmente o espessamento da camada íntima, o qual está relacionado com a presença de doença aterosclerótica. A EMI da artéria carótida superior a 1,3 mm já é considerado placa aterosclerótica (ZANCHETTI, 1998).

Placa é uma estrutura focal protruído para a luz arterial por pelo menos 5 mm ou 50% do valor adjacente da EMI ou se demonstrar um espessamento superior a 1,5 mm da medida da interface da media-adventícia até a interface do lúmen intimal (TOUBOUL et al, 2007).

## **2.4 O COELHO COMO MODELO EXPERIMENTAL**

O coelho é o animal mais utilizado em experimentação envolvendo aterosclerose, em especial a linhagem Nova Zelândia. Foi citado pela primeira vez por Ignatowski (1908). Isso se deve pelo fato desta espécie desenvolver hipercolesterolemia administrando-se dieta acrescida de colesterol entre 0,1 a 2%

por poucos dias. São tidos como parâmetros de normalidade a variação de 10 a 80 mg/dL para valores de CT e de 243 a 290 mg/dL para lípides totais. (BOCAN et al, 1993; YANNI, 2004).

As alterações no perfil lipídico ocorrem precocemente, cerca de duas semanas após a introdução da dieta hipercolesterolêmica. Já as lesões nas aortas de coelhos dependem da concentração do colesterol, assim como também da duração da dieta, sendo que uma baixa concentração de colesterol quando administrada por um longo período provoca lesões na artéria aorta bastante semelhantes às lesões que ocorrem em humanas (AIKAWA et al, 1998; KOLODGIE et al, 1996; FINKING; HANKE, 1997). Estudos mostram que outra vantagem deste animal como modelo experimental é o fato das lesões ateroscleróticas mais lentamente após a interrupção da dieta hipercolesterolêmica, isto quando comparados, por exemplo, a macacos e ratos. Motivo pelo qual se tem utilizado bastante estes animais para realizar pesquisas experimentais em aterosclerose (YANNI, 2004).

A aterogênese induzida por dieta com colesterol exógeno se inicia com a expressão de moléculas de adesão ao endotélio (VCAM-1), provocando agregação leucocitária (*rolling*), principalmente linfócitos T e monócitos, com conseqüente lesão endotelial. Os monócitos migram para o espaço subendotelial e se diferenciam em macrófagos, que expressam receptores para partículas de LDLox, partículas potencialmente aterogênicas, sem *feedback* negativo para o controle de níveis de colesterol intracelular. Com esta alteração, os citoplasmas dos macrófagos acumulam gotículas de gordura, dando origem às células espumosas. O aglomerado dessas células dá origem às estrias gordurosas, importante alteração da parede do vaso (GLASS; WITZTUM, 2001; LIBBY, 2002).

## 2.5 RELAÇÃO ÍNTIMA-MÉDIA E PREVISÃO DE RISCO CARDIOVASCULAR

Estudos experimentais em primatas não humanos e em humanos indicam que as lesões ateroscleróticas podem progredir sem a redução no tamanho luminal devido a dilatação da artéria. A estimação correta do tamanho das lesões requer, portanto a mensuração simultânea da espessura da parede arterial e o tamanho do resíduo luminal. As lesões ateroscleróticas nas artérias periféricas e nas carótidas são geralmente avaliadas pela mensuração do tamanho luminal por métodos invasivos tais como angiografia contrastada ou por técnicas não invasivas como a ultrassonografia. O exame bruto e de patologia microscópica apenas é possível em tecidos de espécimes (PIGNOLI et al, 1986).

A camada íntima dos vasos sanguíneos é definida como a porção que se estende desde (e incluindo) a superfície endotelial em contato com o lúmen até a lâmina elástica da camada média. Porém, a lâmina elástica pode não ser bem individualizada em regiões como bifurcações e curvaturas, onde as camadas íntima e média são indistinguíveis. A espessura da camada íntima não é uniforme, podendo ocorrer espessamentos focais (excêntricos) ou mais extensos (difusos) em algumas regiões, representando adaptações fisiológicas a mudanças no fluxo sanguíneo e na tensão na parede arterial (STARY et al, 1996).

O processo de espessamento médio-intimal é complexo. Este pode ser reativo à um aumento na pressão sanguínea e mudança no padrão de força de cisalhamento. O estudo Rotterdam mostra que, em baixos graus de EIM, o espessamento parece refletir um estado de equilíbrio onde os efeitos de pressão e fluxo nas artérias estão em balanço, dando um relacionamento característico entre força de cisalhamento e a pressão transmural local. Acima de certo nível EIM pode então representar aterosclerose (BOST; HOFMAN e GROBER, 1997).

A medida da EIM das artérias foi inicialmente demonstrada como um bom

método para avaliar alterações conseqüentes à aterosclerose, já que havia boa correlação entre o que se encontrava à US e achados histológicos característicos de lesão aterosclerótica na aorta (SIMON et al 2002).

O espessamento médio-intimal da artéria carótida, medido pela ultrasonografia vascular de alta resolução, é considerado atualmente um marcador de doença aterosclerótica generalizada, principalmente da doença arterial coronariana precoce. O aumento do complexo médio-intimal da artéria carótida está relacionado com a maioria dos fatores de risco cardiovasculares: sexo masculino, história familiar de acidente vascular cerebral ou infarto agudo do miocárdio, tabagismo, diabete mellito, dislipidemia, hipertrofia do ventrículo esquerdo, hiperhomocisteinemia e idade. O EMI da artéria carótida ajuda a estabelecer com mais precisão o risco cardiovascular em pacientes hipertensos sem lesão em órgão-alvo evidenciada pelos exames de rotina, como o eletrocardiograma (ENGELHORN et al, 2005).

Mais recentemente, a mensuração ultrasonográfica da espessura das camadas íntima e média das artérias carótidas (EIMC) tem surgido como uma ferramenta na monitorização da aterosclerose e é utilizada como desfecho substituto de eventos cardiovasculares, ante a associação com fatores de risco para doença arterial coronariana (DAC) e com eventos cardiovasculares (CVs) incidentes. A EIMC aumenta com a idade, é maior nos homens e apresenta pequenas diferenças entre grupos étnicos diversos. A pressão arterial sistólica (PAS) encontra-se associada de forma importante com a EIMC e alguns autores sugerem que a hipertensão arterial sistêmica (HAS) seja o principal fator de risco para o aumento da EIMC (TORRES et al, 2007).

A doença arterial coronariana é uma entidade de evolução longa e lenta, normalmente só detectada quando vem a provocar lesões lumbais obstrutivas, alterando perfusão e causando sintomas. A coronariografia é incapaz de detectar fases precoces da doença arterial coronariana, pelo fato de estas caracterizarem-se

como lesões não obstrutivas, não alterando, portanto, a silhueta angiográfica dos vasos. O ultra-som intravascular é um recurso útil na detecção de mudanças qualitativas que podem indicar desenvolvimento insidioso da aterosclerose coronariana. A mais precoce destas mudanças detectável ao ultra-som intravascular é o espessamento intimal presente de forma universal na doença arterial coronariana e mesmo no envelhecimento arterial normal. É proposta uma diferenciação empírica entre a placa aterosclerótica e o espessamento intimal fisiológico como sendo patológica a espessura do complexo íntima – média > 0,3mm (VELICAN; VELICAN, 1981).

O aumento da EIM da artéria carótida medidas pelo US é considerada um tipo de marcador de aterosclerose mais generalizada e repetidamente tem demonstrado preditor da ocorrência de eventos cardiovasculares (BORTEL, 2005).

Com a progressão da aterosclerose, podem-se identificar diferentes tipos de placa, de acordo com sua composição: 1) placas ditas “moles”, com baixa ecodensidade (menor do que a da adventícia), são compostas por infiltração lipídica difusa e/ou células fibromusculares; 2) placas fibrosas com ecodensidade igual ou superior à da camada adventícia, que produzem ecos brilhantes e heterogêneos; e 3) placas calcificadas, que produzem reflexões brilhantes intensas e sombreamento acústico (BARTORELLI et al, 1990).

A calcificação pode ser graduada de acordo com o arco da matriz fibrocálcica, sendo necessário um arco de 180° para se adquirir uma massa de cálcio que possa ser identificada pela angiografia. O cálcio pode estar distribuído na placa de várias maneiras: como um depósito profundo no limite íntima – média (15% dos casos), como um arco superficial na face luminal (50%), uma combinação de ambas (35%), ou como um foco inserido em uma placa fibrosa (MINTZ et al, 1992).

In vivo, a espessura íntima por si não pode ser medida de maneira não invasiva, mas o complexo íntima-média pode ser medido por ultrassonografia. Um aumento da EIM pode ser por espessamento íntima e/ou muscular (GROBBE; BOTZ, 1994).

### **2.5.1 USO DO US NA MEDIDA DA ESPESSURA ÍNTIMA-MÉDIA**

O estudo angiográfico dos vasos coronarianos é, desde a década de 50, o padrão para a detecção e para a caracterização anatômica da doença arterial coronariana. Porém, suas limitações são conhecidas e derivam do fato de a angiografia estudar, somente, o aspecto luminal do vaso (luminograma), o que pode ocultar detalhes sutis e importantes da artéria coronária. Sabe-se que a aterosclerose é uma doença predominantemente da parede arterial, havendo, portanto, a necessidade de um método que a avalie especificamente (MEDEIROS et al, 2001; GROOT et al, 2004).

Recentemente estudos com ultra-som B-mode de alta resolução tem mostrado que as medidas da EIM de artérias carótidas são bastante úteis no estudo da aterosclerose. A artéria femoral é um tipo predominantemente muscular e de acesso fácil e confiável pelo ultra-som modo B, a qual tem recebido pouca atenção quando comparada com a artéria carótida. Aterosclerose femoral tem sido associada a fatores de risco tradicionais e tem previsto a presença de extensa calcificação coronária, um sinal de aterosclerose coronariana (LEKAKIS et al, 2000; BAE et al, 2003).

A primeira anormalidade morfológica nas paredes das artérias podem ser visualizadas pelo modo B de ultrasonografia. Essa alta resolução, técnica não invasiva, é um dos melhores métodos para a detecção de estágios precoces da doença aterosclerótica pois é aplicada facilmente e demonstra a estrutura da parede em melhor resolução que qualquer outra técnica similar (TOUBOUL et al,

2007).

Nas artérias carótidas, o US permite a visualização de duas linhas ecogênicas (brilhantes) criadas pela interface entre a luz arterial e a camada íntima e entre a camada média e a adventícia. O espaço compreendido entre essas duas linhas corresponde à soma das camadas íntima e média e pode ser identificado tanto na parede anterior (mais próxima ao transdutor) quanto na posterior (mais afastada do transdutor) do vaso examinado (TORRES et al, 2007).

As medidas obtidas pelo ultra-som intravascular vieram confirmar as observações feitas no final da década passada acerca de um fenômeno conhecido como “remodelamento geométrico coronariano”. Esse fenômeno, que aparentemente trata-se de um mecanismo compensatório intrínseco coronariano e surge em fases precoces da doença aterosclerótica, consiste na expansão circunferencial da artéria coronária no local de uma placa de ateroma (área total do vaso no local da lesão torna-se maior do que nas referências), na tentativa de acomodar o volume da placa e assim preservar o fluxo sanguíneo (remodelamento positivo) (GE et al, 1993).

A área da interface do lúmen intimal da jugular e a margem média-adventicial da carótida consiste predominantemente de artéria adventicial e supera as limitações ultrasonográficas definindo o limite externo da adventícia. Outro componente dessa região “média-extra” incluindo o tecido intersticial, parede venosa, a qual é, contrariamente alterado pelos fatores de risco e gordura perivascular, que pode ser alterado pela obesidade (SILKON et al, 2009).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Tipo de Estudo

Experimental descritivo.

#### 3.2. Local do Estudo

O experimento foi realizado no laboratório de cirurgia experimental, na UME, Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal do Pará (UFPA), em parceria com o Laboratório de Análises Clínicas Paulo Azevedo e os Laboratórios de Patologia do ICS-UFPA e Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

#### 3.3. Amostra

Foram utilizados 10 coelhos Nova Zelândia (Figura 1), machos, com 3 meses de idade, pesando entre 2,5 Kg e 3,0 kg, provenientes da empresa CRIEX Ltda/SP, especializada em Cunicultura. Os animais foram alojados em gaiolas individuais medindo 50cm x 50cm x 50cm, com fundo fenestrado removível para que os animais não fiquem em contato com as fezes, em biotério apropriado, com água *ad libitum*, oferta de 100g de ração diariamente, temperatura de aproximadamente 22°C, iluminação controlada com foto-período claro-escuro de 12h por *timer*. As gaiolas eram higienizadas diariamente por bioterista. Antes do início do experimento, os animais passaram 2 semanas em adaptação ao biotério (Figura 2) , nas condições descritas anteriormente.



Fonte: Arquivo Pessoal de Thaís Tapajós

Figura 1 – Coelho da linhagem Nova Zelândia utilizado no estudo



Fonte: Arquivo Pessoal de Thaís Tapajós

Figura 2 – Biotério da Unidade Multidisciplinar de Experimentação, ICS, UFPA

### **3.4. Preparo da dieta**

A ração padrão para a espécie era triturada, sendo adicionada a esta colesterol purificado em pó (Sigma-aldrich), com concentração de 0,5 % na primeira fase do experimento e 0,1% na segunda fase. Era adicionada água a esta mistura em quantidade suficiente para se obter uma massa mais consistente. Em seguida, era peletizada em máquina de moer. Após esse processo, a ração era colocada em estufa (Figura 3) a 60°C, por um período de 24h para secagem. O aspecto final da ração é observado na Figura 4.

### **3.5. Indução da hipercolesterolemia – 1ª fase**

Os animais foram submetidos à dieta hipercolesterolêmica (100g de ração padrão + colesterol puro a 0,5% para cada animal diariamente) por um período de 90 dias. Após esse período, foi dosado laboratorialmente o perfil lipídico desses animais para confirmação do estado hipercolesterolêmico.

### **3.6. Manutenção da hipercolesterolemia – 2ª fase**

Nesta fase foi ofertada a dieta de manutenção de hipercolesterolemia (100g de ração padrão + colesterol puro a 0,1% para cada animal diariamente) por um período de 90 dias para todos os coelhos.



Fonte: Arquivo Pessoal de Thaís Tapajós

Figura 3 – Estufa (especificação) utilizada no processo de produção da dieta hipercolesterolêmica



Fonte: Arquivo Pessoal de Thaís Tapajós

Figura 4 – Aspecto final da ração ofertada aos animais

### **3.7. Procedimentos**

A coleta de sangue foi realizada após o período de adaptação dos animais ao biotério, constituindo o grupo controle-negativo, ao final do terceiro mês de dieta de indução e ao final do 3º mês de dieta de manutenção, estando os animais em jejum por 12 horas. Foram coletadas amostras sanguíneas de 3 ml de cada animal a partir da veia marginal da orelha direita, com agulha de 0.06mm de diâmetro e seringa plástica de 3 ml não heparinizadas, colocadas em tubos de gel separador, onde permaneceram por 20 minutos. Em seguida foram centrifugadas por 10 minutos e levadas para dosagem em laboratório de análises clínicas.

Ao final do terceiro mês de dieta de manutenção, os animais foram submetidos a eutanásia através de exsanguinação por punção cardíaca, estando previamente anestesiados com injeção intra-muscular de associação de cloridrato de ketamina (35 mg/kg) e cloridrato de xilazina 2 % (5 mg/Kg). Em seguida foi realizada uma toraco-laparotomia para exérese da artéria aorta desde a sua inserção no ventrículo esquerdo até a bifurcação em artérias ilíacas.

### **3.8. Aspectos Laboratoriais**

Foram verificados os seguintes parâmetros: CT, HDL-c, LDL-c e VLDL e TG através de método enzimático com a utilização de kits comerciais (Biodiagnóstica), no Laboratório de Análises Clínicas Paulo Azevedo.

### **3.9. Análise Macroscópica**

Após a exérese da artéria aorta, foi realizada cuidadosamente a diérese de todos os planos desta, longitudinalmente, para exposição da superfície luminal e mergulhadas em formol tamponado a 10% por 24h. Após esse período, foi corada por Sudam IV (HOLMAN et al, 1958) e realizadas fotos das peças, com câmera digital Mitsuca 7.0 megapixels. As fotos foram analisadas em software KS300 para quantificação das áreas coradas pelo Sudam IV, no Laboratório de Patologia do ICS-UFPA.

### **3.10 Análise Morfométrica**

Foram retirados fragmentos da artéria na crossa e regiões torácica e abdominal, para confecção de lâminas histológicas e realização da histomorfometria, sendo medidas as espessuras das camadas íntima e média, para o cálculo da relação íntima/média através de divisão, estando o valor da íntima no numerador e o valor da média no denominador, no Laboratório de Patologia da UNIFESP.

### **3.11 Aspectos Éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas utilizando animais do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (ANEXO A). O manejo dos animais foi realizado de acordo com todas as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, tendo sempre o auxílio de bioterista experiente e visitas frequentes de médica veterinária.

### 3.12 Análise Estatística

Os dados coletados e anotados no protocolo de pesquisa (APÊNDICE A) foram plotados no programa Excel 2007 para análise estatística descritiva, como o cálculo de médias e desvios-padrão.

Para a estatística comparativa, foi utilizado o teste ANOVA um critério, com o auxílio do teste Tukey quando necessário, para análise de variância dos resultados laboratoriais, comparando os valores de indução e de manutenção com os valores basais (controle) e para a comparação histológica da relação íntima-média nas três regiões da aorta estudadas, através do *software* Bioestat 5.0. Para significância estatística foi adotado  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

Dos 10 animais utilizados na amostra, 2 foram a óbito durante o processo de indução da hipercolesterolemia e 1 durante o processo de manutenção do estado hipercolesterolêmico, chegando ao final do estudo 7 animais.

A Tabela 1 mostra a variância dos níveis de colesterol total nas três etapas de dosagem. É observado um nível basal dentro da normalidade, com média de  $47,2 \pm 18,1$ , seguido de níveis bastante elevados após o período de indução, ficando a média em  $1203,7 \pm 76,9$  e após o período de manutenção observamos níveis ainda hipercolesterolêmicos, porém mais baixos, com média de  $206,7 \pm 69,7$ . Ambos os valores (após indução e após manutenção) obtiveram significância estatística, com  $p < 0,01$  quando comparados aos níveis basais.

**TABELA 1** – Níveis de colesterol total, em mg/dL, dos animais nas 3 etapas do experimento.

<b>Animal</b>	<b>Basal</b>	<b>Após Indução</b>	<b>Após Manutenção</b>
01	81	1202	180
05	40	1228	155
06	40	1040	314
07	52	1236	191
08	32	1219	213
09	58	1215	280
10	28	1286	114
<b>Média ± Desvio Padrão</b>	<b>47,2 ± 18,1</b>	<b>1203,7 ± 76,9*</b>	<b>206,7 ± 69,7*</b>

Fonte: Protocolo de pesquisa

\*  $p < 0,01$  quando comparados aos valores basais, pelo Teste ANOVA um critério, confirmado pelo Teste de Tukey.

Os níveis da fração LDL-c durante o estudo são mostrados na Tabela 2. A tendência, assim como do colesterol total, foi de aumento acentuado na fase após indução, com média de  $458 \pm 277,7$  e  $p < 0,01$  e diminuição durante a manutenção (média  $62,4 \pm 26,2$ ).

**TABELA 2** – Níveis de LDL-c, em mg/dL, dos animais nas 3 etapas do experimento.

<b>Animal</b>	<b>Basal</b>	<b>Após Indução</b>	<b>Após Manutenção</b>
01	31	297	47
05	11	390	77
06	11	403	103
07	16	303	46
08	10	470	47
09	24	276	86
10	9	1068	31
<b>Média ± Desvio Padrão</b>	<b>16 ± 8,4</b>	<b>356,5 ± 76,2 *</b>	<b>62,4 ± 26,2</b>

Fonte: Protocolo de pesquisa

\*  $p < 0,01$  quando comparados aos valores basais, pelo Teste ANOVA um critério, confirmado pelo Teste de Tukey.

A fração HDL-c inicial teve média de  $25,5 \pm 8,7$  mg/dL e sofreu discreta elevação após o período de indução (média de  $34,7 \pm 10,1$  mg/dL) com diminuição para níveis próximos aos basais na fase de manutenção (média de  $27,2 \pm 8,0$ ), o

que pode ser observado na Tabela 3. Não houve diferença estatística significativa entre as fases, com  $p = 0,1581$ .

**TABELA 3** – Níveis de HDL-c, em mg/dL, dos animais nas 3 etapas do experimento.

<b>Animal</b>	<b>Basal</b>	<b>Após Indução</b>	<b>Após Manutenção</b>
01	41	31	28
05	19	30	44
06	24	28	25
07	29	38	29
08	18	55	24
09	31	24	28
10	17	37	44
<b>Média ± Desvio Padrão</b>	<b>25,5 ± 8,7</b>	<b>34,7 ± 10,1</b>	<b>27,2 ± 8,0</b>

Fonte: Protocolo de pesquisa

Os níveis de TG de cada animal, nas 3 etapas do experimento estão expostos na Tabela 4. Podemos observar uma elevação após a indução, com média de  $372 \pm 417,3$  e  $p < 0,01$  em relação aos níveis basais (média de  $56,7 \pm 19,4$ ) pelo Teste ANOVA um critério, confirmado pelo Teste de Tukey e após a manutenção teve média de  $65,85 \pm 41,9$ .

**TABELA 4** – Níveis de TG, em mg/dL, dos animais nas 3 etapas do experimento.

<b>Animal</b>	<b>Basal</b>	<b>Após Indução</b>	<b>Após Manutenção</b>
01	47	341	36
05	95	328	70
06	48	67	42
07	59	257	50
08	61	194	51
09	32	131	158
10	55	1292	54
<b>Média ± Desvio Padrão</b>	<b>56,7 ± 19,4</b>	<b>219,6 ± 109,2 *</b>	<b>65,85 ± 41,9</b>

Fonte: Protocolo de pesquisa

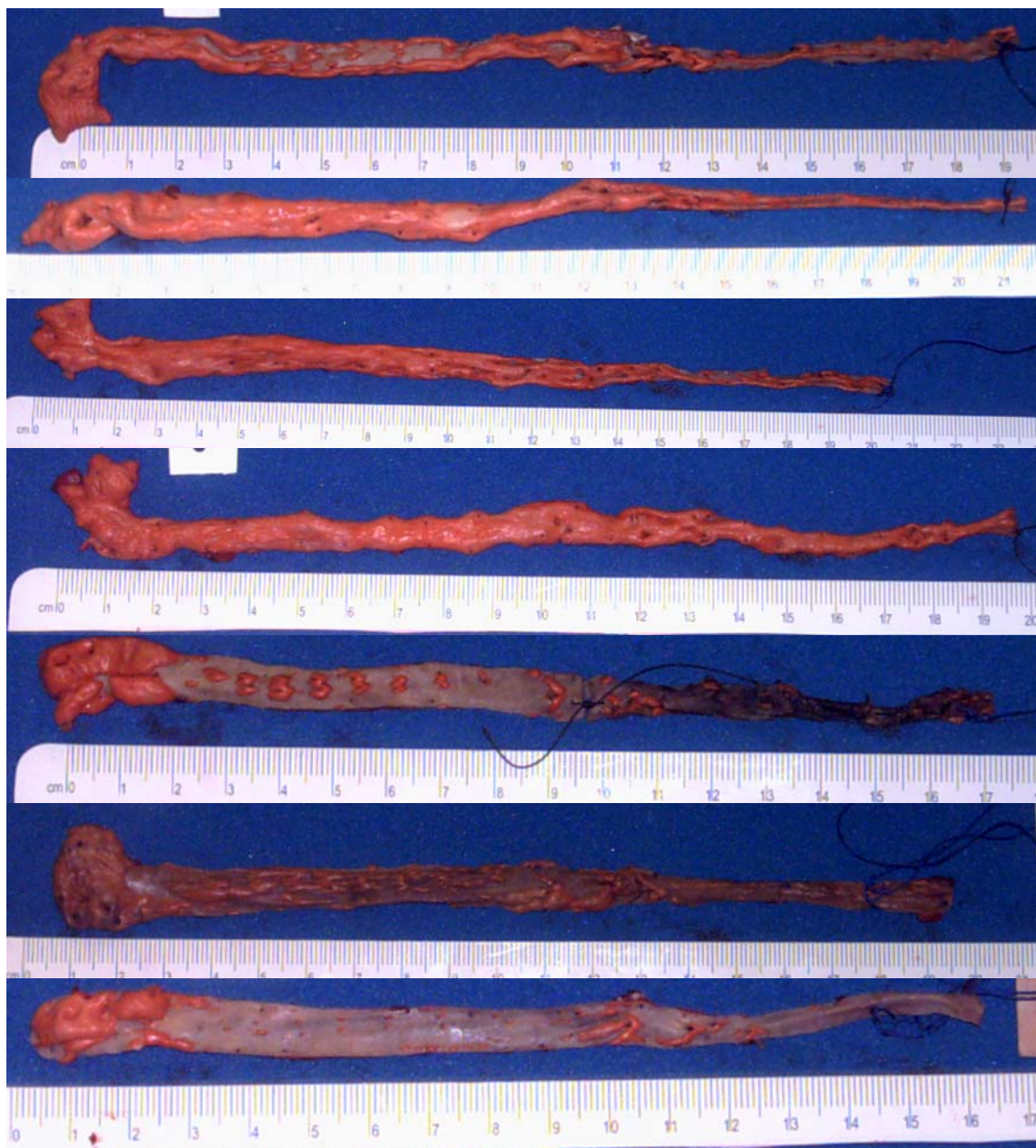
\*  $p < 0,01$  quando comparados aos valores basais, pelo Teste ANOVA um critério, confirmado pelo Teste de Tukey.

As áreas coradas pelo Sudam IV, durante a análise macroscópica das peças de aorta, foram medidas e expressas na Tabela 5, correspondendo a placas ateroscleróticas no endotélio. A média foi de  $68 \pm 27 \text{ mm}^2$ . Podemos observar na Figura 5 o aspecto macroscópico das placas.

**TABELA 5** – Valor da área, em  $\text{mm}^2$ , corada por Sudam IV em toda a extensão da artéria aorta de cada animal

<b>Animal</b>	<b>Área</b>
01	71,8
05	96,7
06	92,25
07	91,1
08	38,4
09	59,7
10	25,88
<b>Média <math>\pm</math> Desvio Padrão</b>	<b>68 <math>\pm</math> 27,9</b>

Fonte: Protocolo de pesquisa



Fonte:Arquivo Pessoal de Claudine Feio, 2008

Figura 5 – Foto digital das artérias aorta, coradas por Sudam IV, dos 7 animais estudados.

A relação íntima/média foi calculada em três regiões da artéria aorta desses animais, sendo esses valores expressos na Tabela 6. Foram observadas relações acima de 0,8 em todas as regiões, sendo mais expressivas na região torácica, onde a média ficou em  $1,54 \pm 0,55$ . Não foi observada diferença estatística significativa entre as três regiões, com  $p = 0,3066$  pelo Teste ANOVA um critério.

**TABELA 6** – Relação íntima/média em três regiões diferentes da artéria aorta de cada animal

<b>Animal</b>	<b>Crossa</b>	<b>Torácica</b>	<b>Abdominal</b>
01	0,81	1,76	0,5
05	1,66	2,45	2,16
06	2,05	1,51	0,74
07	1,16	1,96	2,6
08	0,94	1,29	0,12
09	2,01	0,84	0,18
10	0,86	1,03	0,24
<b>Média ± Desvio Padrão</b>	<b>1,35 ± 0,54</b>	<b>1,54 ± 0,55</b>	<b>0,93 ± 1,01</b>

Fonte: Protocolo de pesquisa

## 5. DISCUSSÃO

Modelos experimentais de hipercolesterolemia e aterosclerose são de grande importância na investigação de novas opções terapêuticas e dependendo da concentração do colesterol purificado utilizado, bem como da duração da dieta, pode-se alcançar diferentes tipos de lesões na parede dos vasos (KOLODZIE et al, 1996).

O coelho é um animal amplamente utilizado para esta finalidade por desenvolver hipercolesterolemia em poucos dias através de dieta suplementada com colesterol purificado, que por sua vez é responsável pelo desenvolvimento de lesões endoteliais que culminarão em aterogênese (GLASS; WITZTUM, 2001; LIBBY, 2002).

Dietas por longos períodos, com concentração elevada de colesterol purificado na dieta estão relacionadas com aumentado número de óbitos por conta do potencial efeito hepatotóxico desta dieta (YANNI, 2004). Durante o estudo 3 animais foram a óbito, correspondendo a 30% da amostra, sendo 2 destes na fase de indução e o 3º óbito ocorreu no início da fase de manutenção. Todos os óbitos

ocorreram entre a 11<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> semana de dieta, sendo que até a 12<sup>a</sup> semana, os animais recebiam dieta acrescida de colesterol purificado 0,5%.

A avaliação do perfil lipídico é o parâmetro laboratorial recomendado pela SBC, através da IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, para controle e prevenção de aterosclerose. Os parâmetros incluídos no perfil lipídico são o colesterol total, LDL-c, HDL-c e TG (SPOSITO et al, 2004).

O colesterol total dosado no início do experimento (grupo controle-negativo) teve média de  $47,2 \pm 18,1$  mg/dL, estando dentro da normalidade para a espécie, que tem média em 50 mg/dL e limite de 80 mg/dL (FINKING; HANKE, 1997). Ao término da primeira fase do experimento (dieta suplementada com colesterol purificado 0,5%) os animais apresentaram elevada hipercolesterolemia, com níveis de colesterol total ultrapassando 1000 mg/dL. Ao final da segunda fase (dieta suplementada com colesterol purificado 0,1%), os animais mantinham o estado hipercolesterolêmico, com níveis médios de CT de  $206,7 \pm 69,7$ . Resultado semelhante foi obtido por Tropea et al (2000), que ofertou dieta acrescida de colesterol purificado 1% e óleo de milho 4% por 3 semanas para coelhos Nova Zelândia normocolesterolêmicos, obtendo ao final do estudo uma média de  $1349 \pm 89$  mg/dL, mas não houve acompanhamento posterior desses animais. Jaldin et al (2006) obtiveram níveis inferiores ao deste estudo com dieta suplementada com 0,15% de colesterol proveniente de gema de ovo chegando a aproximadamente 200 mg/dL em 90 dias.

A elevação da fração LDL-c está intimamente envolvida com lesão endotelial e posterior aterogênese (SPOSITO et al, 2007). O LDLox penetra de maneira mais eficaz nos macrófagos, que acumulam gordura em seu interior, transformando-se em células espumosas, precursoras das estrias e das placas ateromatosas. Neste estudo, a média do valor basal de LDL-c foi de  $16 \pm 8,4$ , elevando-se para  $356,5 \pm 76,2$  após o período de indução de hipercolesterolemia e para  $62,4 \pm 26,2$  após a fase de manutenção. Jaldin et al (2006) e Bocan et al (1993) obtiveram média de

200 mg/dL da fração LDL-c em seus estudos, com dietas enriquecidas com colesterol a 0,15% por 90 dias e 0,1% por 60 dias, respectivamente, valores estes aquém dos obtidos neste estudo.

Foi observada média inicial de HDL-c em  $25,5 \pm 8$ , elevando-se para  $34,7 \pm 10,1$  após a 1ª fase do experimento e diminuindo para  $27,2 \pm 8,0$  ao término da 2ª fase, valor muito próximo do nível basal, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre as fases, mostrando que a dieta em questão em pouco influenciou nos valores desta fração de colesterol, mantendo-se os níveis habituais para a espécie, o que já era esperado. Passarelli e Quintão (2005) observaram retardo na formação de placas ateroscleróticas em camundongos transgênicos após indução de elevação de HDL-c. Asheikh, Kuvin e Karas (2005) observaram diminuição de estrias gordurosas e injúrias por balões, após injeção de HDL-VHDL, o que vem reforçar dados de alguns estudos que consideram o HDL-c antiaterogênico, possuindo propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, anticoagulante, pró-fibrinolítica e de proteção endotelial (ASHEIKH; KUVIN e KARAS, 2005). Essas propriedades são decorrentes do HDL-c inibir a infiltração de LDLox, com proteção vascular; inibir a expressão de moléculas de adesão ao endotélio, diminuindo *rollings* e diapedese; diminuir produção de endotelina e aumentar de gênese de prostaciclina; modular produção de peptídeo natriurético C; promover vasodilatação; estimular produção de células musculares lisas; e prevenir dano celular e necrose por ativação do sistema complemento (FORTI; DIAMENT, 2006).

Observou-se também média de TG de  $56,7 \pm 19,4$  para o valor basal, elevando-se para  $219,6 \pm 109,2$  ao final da 1ª fase, com  $p < 0,01$  e diminuindo para  $65,85 \pm 41,9$  ao final do seguimento, o que vem a divergir de Asai et al (1988), que obteve valores de TG semelhantes aos iniciais utilizando dieta suplementada com colesterol 1% por 30 dias e Jaldin (2006), que observou uma diminuição dos níveis de triglicerídeos após 90 dias de dieta com dieta acrescida de colesterol a 0,15%. A ingestão de uma refeição rica em gorduras causa aumento de TG plasmáticos. A elevação pós-prandial de lipoproteínas ricas em TG resulta em disfunção endotelial.

O mecanismo para que isto ocorra está provavelmente relacionado com o aumento do estresse oxidativo, que torna o LDL-c mais aterogênico, levando a sua deposição e oxidação no espaço sub-endotelial (MAKIMATILLA et al, 1999)

O Sudan IV representa um corante lipossolúvel que reage com a molécula lipídica, exibindo na região uma coloração amarelo-avermelhada (HOLMAN, 1958). São largamente utilizadas laboratorialmente para corar gorduras, triglicerídeos e lipoproteínas presentes em tecidos. Neste estudo, a média da área sudanofílica presente no lúmen da artéria aorta foi de  $68 \pm 27 \text{ mm}^2$ , correspondendo a formações de placas ateroscleróticas observadas macroscopicamente. Jaldin et al (2006) obteve lesão do tipo estria gordurosa isolada em artérias com superfície endotelial preservada, com dieta complementada com 015% de colesterol por 3 meses. Bocan et al (1993), observou estrias gordurosas confluentes após 1 mês de dieta com colesterol 1%. Portanto, observa-se neste estudo alterações mais avançadas, quando comparadas a Jaldin et al (2006) e Bocan et al (1993), porém, compatíveis com Valiente et al (2001), que observou formação de placas fibrosas em artérias aortas de coelhos sob dieta acrescida de colesterol 1% por 12 semanas.

O presente estudo apresenta a possibilidade de visualização real das camadas média e íntima, assim como do complexo médio-intimal. A relação íntima/média foi calculada em três regiões da aorta dos coelhos: crossa da aorta, aorta torácica e aorta abdominal. Foram observadas relações acima de 0,8 em todas as regiões, sendo mais expressivas na região torácica, onde a média ficou em  $1,54 \pm 0,55$ . Não foi observada diferença estatística significativa entre as três regiões. Existe uma diferença empírica entre a placa aterosclerótica e o espessamento intimal fisiológico, sendo patologia a espessura do complexo íntima média maior que 0,3mm (MEDEIROS et al, 2001).

Revignan et al (2005) realizaram um estudo com 30 fêmeas de coelhos para utilização de radiação externa da parede da aorta distal desses animais para verificação de hiperplasia da camada íntima. Esse estudo mostrou a

histomorformetria inicial do grupo controle, e não radiado, então normal. Os resultados foram de espessura intimal variando  $0,038 \pm 0,020$  mm, espessura da camada média de  $0,217 \pm 0,041$  mm e espessura íntima média de  $0,193 \pm 0,131$ .

Quando analisadas carótidas em humanos, valores acima de 0,8 mm de relação médio-intimal indicam espessamento precoce, não necessariamente com presença de placa aterosclerótica (ENGELHORN et al, 2006).

Zanchetti et al (1998) relatam que as artérias carótidas e subclávias são artérias elásticas, com um componente muscular muito pequeno e predomínio da camada íntima. Em contraste, nas artérias periféricas como a artéria femoral, observa-se predomínio da camada muscular média. Portanto a EMI nas carótidas e subclávias representariam principalmente o espessamento intimal, o que está relacionado com a doença aterosclerótica. O EMI da artérias carótida superior a 1,3 mm já é considerado placa aterosclerótica.

Contran; Kumar e Collins (2000) relatam um grupo de artérias ditas elásticas ou de grande calibre, incluindo aorta e seus grandes ramos, particularmente tronco-braquiocéfáico, subclávia, carótida comum e ilíaca e artérias pulmonares. Dessa maneira o presente estudo realizado em aortas pode ser enquadrado nos critérios de análise para carótidas.

Vários estudos apontam uma falta de critério no cálculo da espessura íntima-média no tocante a inclusão ou não da placa de ateroma neste. De acordo com o Mannheim Intima-media thickness Consensus de 2004-2006 foi proposto que: é considerada placa aterosclerótica como qualquer alteração focal que protruí para luz arterial em pelo menos 0,5 mm ou 50% do valor adjacente da espessura íntima-média ou ainda uma medida de EIM maior que 1,5 mm (TOUBOUL et al, 2007).

Os valores encontrados para aorta torácica adequa-se em todas as proposições para doença aterosclerótica, estando com um valor médio de 1,54 mm de EIM. No que tange a aorta e aorta abdominal, os valores médios foram inferiores à 1,5mm ficando em 1,35 mm e 0,93mm respectivamente, mesmo assim adequando-se ao valores de 0,8mm de predição de espessamento precoce.

Dessa forma, é válido ressaltar que a espessura íntima-média reflete não apenas aterosclerose mas também um alargamento não aterosclerótico compensatório, anterior a formação de placas, às custas de hipertrofia de íntima ou mesmo medial.

A maioria dos estudos que utilizam US para medir EIM usam como escolha a artéria carótida. O ponto primordial para essa escolha está no acesso difícil pelo probe ultrassonográfico à aorta principalmente em sua porção abdominal. Os segmentos da parede arterial devem ser acessados de uma visão longitudinal e perpendicular ao feixe de ultra-som, com ambas as paredes claramente visualizadas a fim de alcançar as medições de espessura. A incidência lateral do probe é recomendada por oferecer melhor visão do campo medial, onde a resolução é conhecidamente melhor do que nos campos mais próximos ou distantes (TOUBOUL et al, 2007).

Bortel (2005) relata que a espessura íntima-média da artéria carótida não é constante. Ela está continuamente mudando durante o ciclo cardíaco, ela diminui durante a sístole devido maior diâmetro do vaso e aumenta durante a diástole. É sabido, no entanto que as regiões aos arredores de bifurcações a EIM é constante, embora a compressibilidade da íntima-média devido maior pressão na sístole, ainda não tenha sido estudada tão bem.

## 6. CONCLUSÕES

O modelo experimental apresentado mostrou-se eficaz, com alterações estatisticamente significantes no que diz respeito ao CT, fração LDL-c e TG. A fração HDL-c, como já era esperado, não sofreu modificações estatisticamente significantes, configurando-se laboratorialmente como um modelo satisfatório de indução a 0,5% e manutenção a 0,1% de hipercolesterolemia em coelhos da raça Nova Zelândia.

Quando analisadas as artérias aorta macroscopicamente, foram observadas e quantificadas extensas áreas sudanofílicas, correspondentes a formações de placas ateroscleróticas.

Microscopicamente, observou-se aumento na relação íntima-média, às custas de espessamento intimal incluindo-se em todos os parâmetros conhecidos para doença aterosclerótica, principalmente evidenciando-se em porção torácica da artéria aórtica, muito embora não tenha sido estatisticamente significante.

## REFERÊNCIAS

ACHUTTI et al. Epidemiologia das ateroscleroses coronária e cerebrovascular. Programa de Educação Continuada da SBC. Módulo II, Fascículo 3, p. 17-27, 2003.

AIKAWA, M. et al. Na HGM-CoA reductase inhibitor cerivastatin, supresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue fator *in vivo* and *in vitro*. **Circulation**. v. 103, p. 276-283, 2001.

AIKAWA, M.; LIBBY, P. The vulnerable atherosclerotic plaque: Pathogenesis and therapeutic approach. **Cardiovascular Pathology**. v.13, p.125-138, 2004.

ARAÚJO, A.L. Correlação entre dieta lipídica polisaturada e aterogênese. **Revista de angiologia e cirurgia vascular**. v.5, p.15-22, 2007.

ASAI et al. effects of splenectomy on serum lipids and experimental atherosclerosis. **Angiology**. v. 39, p. 497-504, 1988.

ASHEIKH, A. A.; KUVIN, J. T. e KARAS, R. H. High-density lipoprotein cholesterol in the cardiovascular equation: Does "good" still count: **Atherosclerosis**. v. 180, p. 217-223, 2005.

AZIZI, M. A. A. Formação da Placa de Ateroma. **Rev. Angiol. Cir. Vasc.**, v. 12, p. 69-72, 2003.

BAE, J.H. et al. Significance of the intima-media thickness of the thoracic aorta in patients with coronary atherosclerosis. **Clin. Cardiol**. v.26, p.574-578, 2003.

BARTORELLI, A.L. et al. Plaque characterization of atherosclerotic coronary arteries by intravascular ultrasound. **Echocardiography**. v.7, p.389-95, 1990.

BLASI, C. The autoimmune origino f atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 201, p. 17-32, 2008.

BOCAN, T. M. et al. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in rabbit and atherosclerotic lesion formation. **Atherosclerosis**. v. 102, p. 9-22, 1993.

BORTEL, L.M.V. What does intima-media thickness tell us? **J. Hypertens.** v.23, p.37-9, 2005.

BOTS, M.L.; HOFMAN A.; GROBBEE, D.E. Increased common carotid intima-media thickness: adaptive response or a reflection of atherosclerosis? Findings from the Rotterdam Study. **Stroke** v.28, p.2442–2447, 1997

CASELLA-FILHO, A.; CHAGAS, A. C. P. Inflamação e Aterosclerose: Integração de Novas Teorias e Valorização dos Novos Marcadores. **Rev Bras de Cardiol Invasiva**, Brasil, v. 11, n. 3, p. 14-19, 2003.

CONTRAN, S. R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 445- 461, 2000.

ENGELHORN, C. A. et al. Espessamento médio-intimal na origem da artéria subclávia direita como marcador precoce de risco cardiovascular. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 87, p. 609-614, 2006.

FIKING, G.; HANKE, H. Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. **Atherosclerosis.** v. 135, p. 1-7, 1997.

FORTI, N; DIAMENT, J. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. **Arq. Bras de Cardiol.** v. 87, p. 672-679, 2006.

GE, J. et al. Coronary artery remodeling in atherosclerotic disease: an intravascular ultrasonic study in vivo. **Coron. Artery. Dis.** v.4, p.981-986, 1993.

GLASS, C. K.; WITZTUM, J. L. Atherosclerosis: the road ahead. **Cell.** v. 104, p. 503-516, 2001

GROBBEE, D.E.; BOTS, M.L. Carotid artery intima-media thickness as an indicator of generalized atherosclerosis. **J. Int. Med.** v. 236, p.567–573, 1994.

GROOT, E. et al. Measurement of arterial wall thickness as a surrogate marker for atherosclerosis. **Circulation.** v.109, supl. III, p.33-38, 2004.

GRUNDY, M. S. et al. Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham. **Circulation**, v.97, p.1876 - 87, 1998.

GRUNDY, M.S.; BEARN, A.G. The Role of Cholesterol in Atherosclerosis . **Hanley & Belfur**, Philadelphia , p.5-21.; 1987.

HANSSON, G.K. Atherosclerosis - An immune disease: Tha Anitschkov Lectures 2007. **Atherosclerosis**. v.202, p.2-10, 2009.

HOLMAN, R. L. et al. Technics for studying atherosclerotic lesions. **Lab Invest**. v. 7, p.42, 1958

ILIB, *International Lipid Information Bureau*. The ILIB lipid handbook for clinical practice: blood lipids and coronary heart disease. 2nd ed. New York: ILIB, 2000.

JALDIN, R. G. et al. O processo aterosclerótico em artérias de coelhos submetidos a dieta suplementada com gema de ovo: modelo experimental de baixo custo. **J. Vasc. Bras**. v. 5, n. 4, p.247-256, 2006.

KOLANKIEWICZ, F.; GIOVELLI, F. M. H. e BELLINASSO, M. F. Estudo do perfil lipídico e da prevalência de dislipidemias em adultos. **RBAC**. v. 40, n. 4, p. 317-320, 2008.

KOLODGIE, F. D. et al. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**. v. 16, p. 1454-1464, 1996.

LASTORIA, S. Etiopatogenia, fisiopatologia, patologia e diagnóstico da aterosclerose obliterante periférica. In: **Doenças Vasculares Periféricas**. 1ª ed. Rio de Janeiro. Medsi, 1987. p. 323-338.

LELAKIS, J. P. et al. Atherosclerotic changes of extra-coronary arteries are associated with the extent of coronary atherosclerosis. **Am J Cardiol**. 2000; 85: 949-52.

LIBBY, P. A. Patogenia da aterosclerose. In: BRAUNWALD, E.; FAUCI, A. S. e KASPER, D. L. Harisson: Medicina Interna. 15ª ed. Mac Graw Hill: Rio de Janeiro, 2002, p. 1456-1461.

LIBBY, P. Inflammation in the atherosclerosis. **Nature**. v. 420, p. 868-874, 2002

MAHLEY, R.W.; WEISGRABER, K.H.; FARESE, R.V. Disorders of lipid metabolism. In: **Williams textbook of endocrinology**, 10<sup>th</sup> edition. New York: Elsevier Science, 2003, p.1646-52.

MAKIMATILLA, S. et al. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in type 2 diabetes. **Diabetes Care**. v. 22, p. 973-981, 1999.

MEDEIROS, C.R. et al. O uso do ultra-som intravascular na cardiologia intervencionista. **Arq. Bras. Cardiol**. v.77, n.1, p.87-94, 2001.

MINTZ, G.S. et al. Target lesion calcification in coronary artery disease: an intravascular ultrasound study. **J Am Coll Cardiol**. v.20, p.1149-55,1992.

PASSARELI, M.; QUINTÃO, E. R. Metabolismo das lipoproteínas de alta densidade. **Ver. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**. v. 6, p. 734-743, 2000

PIGNOLI, P. et al. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. **Circulation**. v. 74, p.1399-1406, 1986.

PLAAMI, S. P. Content of dietary fiber in foods and its physiological effects. **Food Rev. Int**, v. 13, n. 1, p. 29 -76, 1997.

POZZAN, R.; POZZAN, R.; BRANDÃO, A. A. Níveis lipídicos em uma série de casos da cidade do Rio de Janeiro. *Revista da SOCERJ*. v. 18, n. 6, p. 547-548, 2005.

RAVIGNAN, D.C. et al. Chronological changes in morphometry and histology in the rabbit vascular wall after external radiation for the prevention of intimal hyperplasia. **Journal of surgical research**. v.128, p.120-125, 2005.

ROHANI, M. et al. Interrelation between the extent of atherosclerosis in the thoracic aorta, carotid intima-media thickness and the extent of coronary artery disease. **Atherosclerosis**. v.179, n.2, p.311-6, 2005.

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

126, 1999.

SIMON, A. et al. Intima-media thickness: a new tool for diagnosis and treatment of cardiovascular risk. **J Hypertens.** v. 20, p.159-69, 2002.

SIQUEIRA, A.F.A.; ABDALLA, D.S.P.; FERREIRA, S.R.G; LDL: da Síndrome Metabólica à Instabilização da Placa Aterosclerótica. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.50, n.2, p.334-343, 2006.

SKILTON, M.R. et al. Noninvasive measurement of carotid extra-media thickness. **JAAC: cardiovascular imaging.** v.2, n.2, p.176-182, 2009.

SPOSITO et al. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 88, suplemento I, 2007.

STARY, H.C. et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions: a report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, American Heart Association. **Circulation,** v.85, p.391-405, 1992.

STEFFENS, A. A. Epidemiologia das doenças cardiovasculares. **Rev da Soc de Cardiol do Rio Grande do Sul.** v. 3, p. 5-15, 2003.

TORRES et al. Medida da espessura das camadas íntima e média das artérias carótidas para avaliação do risco cardiovascular. **Revista Brasileira de Hipertensão.** v.14, n.3, p.167-171, 2007.

TOUBOUL. P.J. et al. Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004-2006). **Cerebrovasc. Dis.** v.23, p.75-80, 2007.

TROPEA, B. I. et al. Reduction of aortic wall motion inhibits hypertension-mediated experimental atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 20, p. 2127-2133, 2000.

VELICAN, D.; VELICAN, C. Comparative study on age related changes and atherosclerosis involvement of the coronary arteries of male and female subjects up to 40 years of age. **Atherosclerosis.** v. 38, p.39-50, 1981.

YANNI, A. E. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. **Lab Anim.** v. 38, p. 246-256, 2004.

ZANCHETTI, A. et al. Risk factors with alterations in carotid intima-media thickness in hypertension: baseline data from european lacidipine study on atherosclerosis. **J. Hyperten.** v.16, p. 949-961, 1998.

**APÊNDICE A - PROTOCOLO DE PESQUISA****MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DE  
HIPERCOLESTEROLEMIA, COM FORMAÇÃO DE PLACAS  
ATEROSCLERÓTICAS EM AORTA DE COELHOS**

Animal: \_\_\_\_\_

**Perfil Lipídico**

	Basal	Indução	Manutenção
Colesterol Total			
LDL-c			
HDL-c			
Triglicerídeos			

**Macroscopia:**

Descrição: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Área sudanofílica: \_\_\_\_\_

**Microscopia:**

Descrição: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Relação Íntima-média: \_\_\_\_\_

## ANEXO A



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS  
DE EXPERIMENTAÇÃO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

**PARECER MED002/2006**

**Projeto:** Efeitos do açaí no perfil lipídico em coelhos hipercolesterolêmicos

**Coordenador:** Prof. Dr. Francisco Antonio Helfstein Fonseca

**Área Temática:** Medicina

**Vigência:** 05/2006 a 05/2010

**No no CEPAE-UFGA:** MED002/2006

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria No 1568/2005 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Presidente do Comitê de Ética Em Pesquisa  
Com Animais de Experimentação da Universidade  
Federal do Pará