

O PROCESSO ATEROSCLERÓTICO EM ARTÉRIAS DE COELHOS SUBMETIDOS À DIETA SUPLEMENTADA COM GEMA DE OVO: MODELO EXPERIMENTAL. Rodrigo Gibin Jaldin, Winston Bonetti Yoshida Hênio Arruda Falcão Filho, Júlio Lopes Sequeira. Subáreas – Medicina – Departamento de Cirurgia e Ortopedia – Faculdade de Medicina – Campus de Botucatu.

A aterosclerose é a principal causa de morte e incapacitação nos países ocidentais. Consiste em processo crônico, progressivo e sistêmico, caracterizado por resposta inflamatória e fibroproliferativa da parede arterial, causada por agressões à superfície arterial. A lesão aterosclerótica pode acometer vários e importantes territórios arteriais, responsabilizando-se por 95% das coronariopatias, 85% das claudicações intermitentes dos membros inferiores, e 75% dos acidentes vasculares encefálicos, além de ser um fator importante no desenvolvimento do aneurisma de aorta abdominal. Frente à importância desta doença para o ser humano, houve por parte dos pesquisadores uma busca incessante de modelos experimentais que pudessem melhor caracterizá-la. Tem-se induzido aterosclerose em coelhos através do fornecimento de ração contendo 1% de colesterol, por aproximadamente 12 semanas. Este método permite não apenas a formação de lesões ateroscleróticas nas aortas torácica e abdominal, como também se mostrou efetivo no estudo da aterosclerose carotídea em coelhos. Entretanto, o colesterol purificado disponível no mercado tem alto custo, o que limita seu amplo emprego no estudo da aterosclerose experimental (Tabela 1).

Tabela 1. Custo comparado entre suplemento de colesterol para a ração e a gema de ovo. Dieta a 0,15% de colesterol, para sete coelhos/dia, durante o período de 12 semanas.

<i>FORTE DE</i> <i>COLESTEROL</i>	<i>% DE</i> <i>COLESTEROL</i>	<i>TOTAL DE</i> <i>COLESTEROL</i> <i>(g) - 3 MESES</i>	<i>CUSTO POR</i> <i>GRAMA</i>	<i>CUSTO</i> <i>POR</i> <i>DIA</i>	<i>CUSTO</i> <i>EM</i> <i>US\$4</i>	<i>CUSTO</i> <i>EM</i> <i>R\$</i>
<i>Cholesterol –</i> 99%, porcine liver, powder, grade I	0,15% dieta =225mg/150g de ração	141.75 g	1g = U\$36.00 5g = U\$114.00 25g=U\$315.00 ²	1,575 g/dia U\$ 19.85 (Frasco c/ 25g)	1786.50	4075,00
<i>Gema de Ovo</i> (uma gema contém média 225mg de colesterol)¹	0,15% dieta =1gema/150g de ração	630 ovos (gemas)	30 dúzias de ovos (81g col)= R\$ 27,98 ³ ∴1g = R\$ 0,35	7 ovos/dia (gemas) R\$ 0,56	22.10	50,40

Em estudos prévios realizados em nosso laboratório, verificou-se significativo aumento na concentração de colesterol plasmático de coelhos alimentados com ração suplementada com gema de ovo. A sobrecarga de colesterol através da gema de ovo, embora seja um modelo pioneiro de aterosclerose experimental, não teve avaliação sistemática da distribuição e da intensidade do comprometimento vascular. Por conseguinte, propõe-se avaliar se a dieta em questão induz aterosclerose de maneira eficaz nas principais artérias do animal de experimentação (aorta, carótidas, renais, ilíacas comuns e femorais) e se pode ser usada como modelo experimental de baixo custo.

O protocolo experimental deste estudo seguiu os Princípios Éticos na

Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP. O experimento foi realizado em 14 coelhos machos da raça Norfolk, que foram randomizados em dois grupos de 7 animais: grupos G1 (controle) e G2 (experimental). Os animais do grupo G2 foram alimentados com dieta contendo uma gema de ovo acrescida de 13,5ml de óleo de milho para cada 150g de ração comercial para coelhos (Nutricoeelho, Purina®), por três meses. O Grupo G1 recebeu ração habitual de mesma marca e lote, pelo mesmo período de tempo e água foi oferecida *ad libitum*. Foram realizados controle de peso e dosagem do perfil lipídico dos animais mensalmente a partir do dia anterior ao início do tratamento. Ao término dos período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia para acesso e retirada das artérias em estudo. Retirou-se as aortas torácica e abdominal, as artérias carótidas e as artérias femorais. A aorta foi dividida nos seguintes segmentos: Arco, Aorta Torácica, Aorta Abdominal e Aortoiliaco. Estes segmentos juntamente com as artérias carótidas e femorais foram abertos em sua parede posterior, analisados em sua superfície luminal e então fixados em solução de formol tamponado a 10% por 24h, para serem corados em solução de Sudan IV (Solução de Hexheimer), padronizada por Holman e col. Após a coloração, as superfícies luminais das artérias foram novamente inspecionadas, a olho nu e em Microscópio para Anatomia (D.F. Vasconcellos S.A®., São Paulo) ao aumento de 10x. Verificou-se a presença (áreas sudanofílicas) ou ausência (áreas não sudanofílicas) de placas ateroscleróticas, bem como a distribuição destas ao longo da luz vascular. Realizou-se estudo histológico através de amostras das artérias que foram colocadas em frascos contendo solução de formol 10%, para processamento e montagem em blocos de parafina. Realizou-se cortes seriados de 5µm em Micrótomo e coloração pela técnica Hematoxilina-eosina (HE).

As lesões ateroscleróticas encontradas no estudo macroscópico foram graduadas visualmente usando uma escala de 0-3, segundo a quantidade de áreas sudanofílicas presentes na luz arterial (0=ausência; 1=discreta, restrita aos óstios; 2=moderada; 3=intensa). Somadas as informações macro e microscópicas, utilizou-se ainda a classificação padronizada pelo Comitê de Lesões Vasculares da *American Heart Association*. As comparações entre os grupos foram feitas utilizando o Teste de Mann-Withney. Os dados foram expressos em mediana com o quartil 25 e o quartil 75 e os resultados foram considerados estatisticamente significantes se $p < 0,05$. O grupo que recebeu dieta suplementada teve peso corporal maior que o grupo controle ($p < 0,001$) ao final de 90 dias de seguimento.

Os níveis plasmáticos de colesterol total, LDL-c, HDL-c e triglicérides estão descritos na figura 1. Houve aumento nas concentrações de colesterol total e frações no grupo que recebeu dieta suplementada com gema de ovo, porém não se observou diferença nos níveis de triglicérides entre os grupos. Não se observou qualquer alteração macroscópica nos segmentos arteriais estudados dos animais do grupo controle, antes ou depois da histoquímica para gordura. Por outro lado, as artérias dos animais do grupo G2, depois da coloração, apresentaram áreas sudanofílicas correspondentes à lesões do tipo estrias gordurosas na superfície luminal anterior do arco aórtico e aorta abdominal, predominantemente (Tabela 2). Nos animais que receberam gema de ovo, as alterações observadas concentravam-se na camada íntima e correspondiam a acúmulos lipídicos discretos no interior de células espumosas ou formando vacúolos subendoteliais. Essa alteração estava presente nas amostras de aorta abdominal (3/7), renais (2/7), carótidas (2/7), transição tóraco-abdominal (2/7) e femorais (2/7).

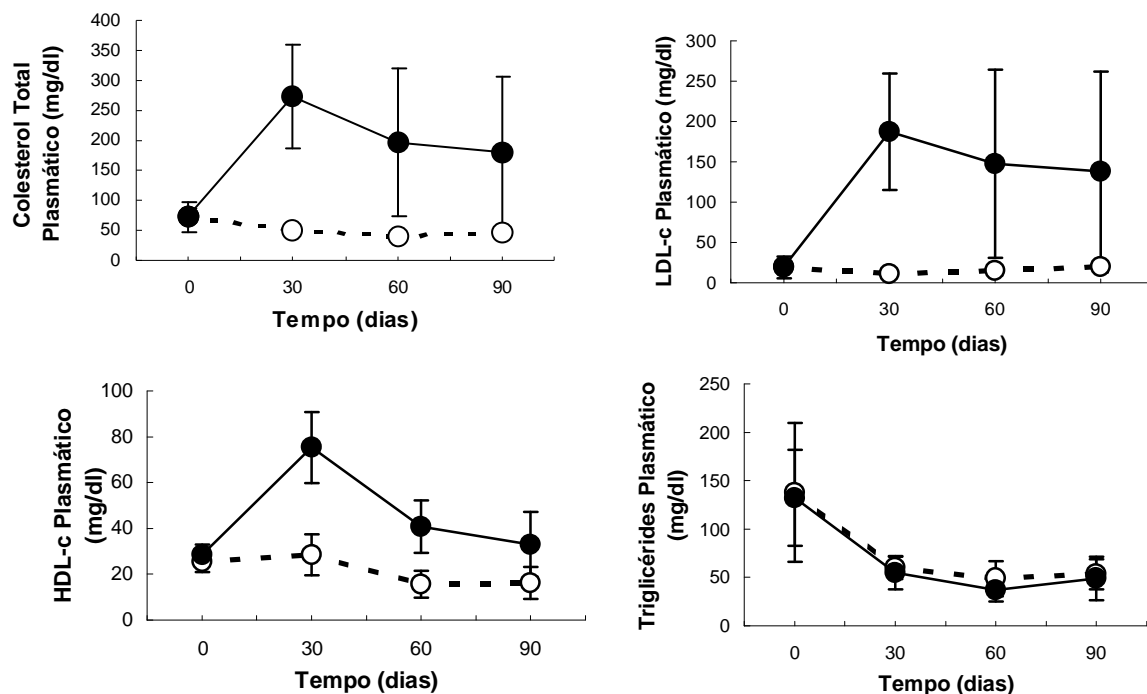


Figura 1. Médias e desvios-padrão do Perfil Lipídico (mg/dl) ao longo do estudo nos dois grupos experimentais. A. Colesterol total; B. LDL-colesterol; C. HDL-colesterol; D. Triglicérides. ○Controles; ●Tratados. Teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Tabela 2. Avaliação macroscópica e graduação† das áreas sudanofílicas nos segmentos aórticos e seus principais ramos em todos os animais do grupo tratado com gema de ovo.

ARTÉRIA EM ESTUDO	FREQUENCIA POR TIPO DE LESÃO (%)			
	0	1	2	3
Aa. Carótidas	7/7 (100)	–	–	–
Arco Aórtico	1/7 (14)	1/7 (14)	4/7 (58)	1/7 (14)
Aorta Torácica	6/7 (86)	–	1/7(14)	–
Aorta Abdominal	–	3/7 (43)	3/7 (43)	1/7 (14)
Aortoilíaca	5/7 (71)	2/7 (29)	–	–
Femorais	7/7 (100)	–	–	–

† Graduadas visualmente em uma escala de 0-3 (0=ausência; 1=discreta, restrita aos óstios; 2= moderada; 3= intensa). G2= grupo dos animais que receberam dieta hipercolesterolêmica; n= número de animais.

Os modelos baseados na hipercolesterolemia induzida por via alimentar são os mais práticos e difundidos para o estudo da aterosclerose experimental. O papel deste tipo de dieta na aterogênese é bem determinado. Lesões precursoras podem ser percebidas em apenas uma semana de exposição à dieta hipercolesterolêmica. Aikawa e col. mostraram que os lipídeos da dieta, provocando hipercolesterolemia, eram responsáveis por estresse oxidativo e lesão endotelial na aorta de coelhos, de forma que apenas a redução lipídica na dieta reduzia os mecanismos lesivos à superfície arterial. Procurou-se estudar os efeitos aterogênicos da dieta em estudo da forma mais natural possível, ou seja, adotou-se a via alimentar *ad libitum* e a gema de ovo como fonte de colesterol. Este estudo foi proposto no intuito de viabilizar o amplo uso da aterosclerose experimental em investigações fisiopatológicas e terapêuticas. A dieta testada mostrou-se efetiva na indução de hipercolesterolemia no animal de experimentação, porém provocou apenas alterações iniciais do processo aterosclerótico. Por outro lado, pode-se considerar que a gema de ovo como fonte de colesterol alimentar a 0,15% provocou alterações arteriais e nos níveis plasmáticos de colesterol equivalentes àquelas provocadas pelo colesterol purificado comercial quando fornecido em baixa dosagem. Dessa forma, abrem-se perspectivas de se testar se maior oferta de gema de ovo diária desenvolveria lesões arteriais e colesterolemia mais expressivas, dados o baixo custo e a acessibilidade à esta fonte alimentar de colesterol.

Referências Bibliográficas

YOSHIDA, W.B. O processo aterosclerótico: da disfunção endotelial à lesão complexa. In: Sitrângulo Jr., C.; Kauffman, P. (Ed). **Doença Aterosclerótica Periférica**. São Paulo: BBS editora, 2004. p. 11-27.

FERNANDES, A.A.A.; ALVES, M.J.Q.F.; BOTEON, E.M. et al. Avaliação do colesterol plasmático em coelhos com hipercolesterolemia induzida e tratados com extrato etanólico de própolis. **Rev Bras Plantas Medicinai**s, v. 4(2), p. 1-5, 2002.

VALIENTE, M.A.A.; CARRALERO, G.A.; PENA, A.M.Q.; CARBALLO, R.S. Evaluación de un posible modelo experimental de aterosclerosis carotídea en conejos hipercolesterolémicos. **Rev Cubana Invest Biomed**, v. 20(3), p. 192-196, 2001.

ROSS, R. Atherosclerosis – An Inflammatory Disease. **N Eng J Med**, v. 340, p. 115-126, 1999.

MORALES, R.; ESTELA, L. La aterosclerosis: algunas consideraciones acerca de su estudio experimental; revisión bibliográfica. **Rev. Cuba. Med.**, v.26(9), p. 965-970, 1987.

KRITCHEVSKY, D. Diet and atherosclerosis. **J Nutr Health Aging**, (3), p. 155-159, 2001.

KRITCHEVSKY, D. Dietary protein, cholesterol and atherosclerosis: a review of the early history. **The Journal of Nutrition**, v.125 (5), p. 589S-593S, 1995.

HOLMAN, R.L.; McGRILL, H.C.; STRONG, J.P.; GEER, J.C. Technics for studying atherosclerotic lesions. **Laboratory Investigation**, v.7(1), p.42-47, 1958.

BOCAN, T.M.; MUELLER, S.B.; MAZUR, M.J. et al. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. **Atherosclerosis**, v. 102(1), p. 09-22, 1993.

Bolsa: PIBIC/CNPq