

MICHIKO REGINA OZAKI

**EVOLUÇÃO E INVOLUÇÃO DA
ATEROSCLEROSE ESTUDO EXPERIMENTAL
EM COELHOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

**CAMPINAS
2011**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

EVOLUÇÃO E INVOLUÇÃO DA ATEROSCLEROSE ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS

Michiko Regina Ozaki

Tese de Doutorado apresentado à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Doutor em Clínica Médica, Área de concentração em Ciências Básicas. Sob orientação do Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Oz1e Ozaki, Michiko Regina,1962
Evolução e involução da aterosclerose estudo
experimental em coelhos hipercolesterolêmicos. /
Michiko Regina Ozaki. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Eros Antonio de Almeida
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Aterosclerose. 2. Coelhos. 3. Endotélio. 4. Óxido
nítrico. 5. Peroxidação lipídica. I. Almeida, Eros
Antonio de. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evolution and involution of atherosclerosis experimental study in hypercholesterolemic rabbits

Palavra-chave em inglês:

Atherosclerosis

Rabbits

Endothelium

Nitric oxide

Lipid peroxidation

Área de concentração: Ciências Básicas

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Banca examinadora:

Eros Antonio de Almeida [Orientador]

Luiz Shiguero Matsubara

Marina Politi Okoshi

Márcia Marília Fagian

Sandra Helena Alves Bonon

Data da defesa: 16-06-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

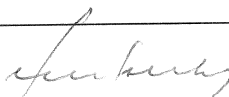
Banca examinadora da tese de Doutorado

Michiko Regina Ozaki

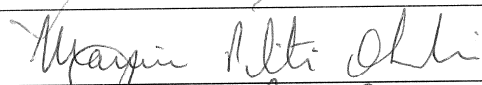
Orientador: Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida

Membros:

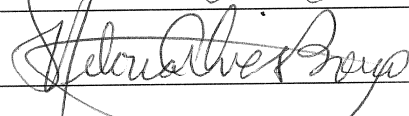
1. Prof. Dr. Luiz Shiguero Matsubara



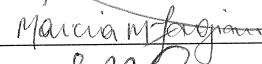
2. Prof^a. Dr^a. Marina Politi Okoshi



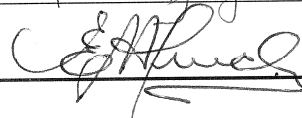
3. Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Alves Bonon



4. Prof^a. Dr^a. Marcia Marilia Fagian



5. Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida



Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 16/06/2011

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais que,
com sua sabedoria, me deixaram como legado a honestidade,
o amor e a perseverança que, sempre orientam minha vida.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus por me dar forças e sabedoria para transpor os obstáculos da vida e colocar ao meu lado pessoas iluminadas.

Ao Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida meu orientador, pela dedicação, persistência, energia e incentivo, que convergiram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, e para a concretização desta pesquisa.

À Maria Madalena de Abreu Rodrigues, técnica do Laboratório por toda a sua dedicação e amizade ao longo desses anos.

À Camila Tiemi Ozaki, minha filha, que tem sido minha companheira e que me dá forças para as minhas realizações.

À Yaeko Ozaki, que sempre com sua energia, determinação e coragem, incentiva-me a caminhar para a frente.

À Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo pela bolsa recebida

À FAEPEX pelo auxílio financeiro recebido.

Ao Prof. Dr. Paulo Afonso Ribeiro Jorge por ter acreditado em mim e ter me dado uma oportunidade de crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

As Prof^{as}. Dr^{as}.

Adriana Zapparoli

Márcia Marília Fagian

Marina Politi Okoshi

Sandra Helena Alves Bonon

Aos Profs. Drs.

Luís Shiguero Matsubara

Milton Lopes de Souza

Pela valiosa colaboração no fornecimento de informações, materiais e pelas sugestões que facilitaram a concretização deste trabalho.

Às pessoas, que pelo espírito de solidariedade, profissionalismo e apoio, contribuíram

Gracinda de Lourdes Jorge

Nilza Alzira Batista

Rosana Aparecida Trevisan Pereira

É a todos os colegas e docentes do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental que contribuíram para a concretização desse trabalho e me deram apoio.

Aos coelhos que foram sacrificados em benefício desta pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 ETIOPATOGENIA DA ATEROSCLEROSE.....	19
1.2 FUNÇÃO ENDOTELIAL	22
1.3 ATEROSCLEROSE E LDL OXIDADA	24
1.4 FÁRMACOS REDUTORES DE COLESTEROL	26
1.5 ENSAIOS CLÍNICOS	27
1.6 REGRESSÃO DA PLACA DE ATEROSCLEROSE: ESTUDOS EXPERIMENTAIS.....	29
2. OBJETIVOS.....	32
2.1 OBJETIVO GERAL	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 COLESTEROL PLASMÁTICO E FRAÇÕES	37
3.2 QUANTIFICAÇÃO DO COLESTEROL TECIDUAL	38
3.3 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	38
3.4 FUNÇÃO ENDOTELIAL	39
3.5 HISTOLOGIA.....	42
3.6 QUANTIFICAÇÃO DE ATEROSCLEROSE.....	42
4. RESULTADOS.....	44
4.1 PESO DOS ANIMAIS	45
4.1 LIPÍDES PLASMÁTICOS.....	47
4.1.1 Colesterol total	47
4.1.2 LDL-Colesterol	47
4.1.3 HDL-Colesterol	48
4.1.4 Triglicérides	49

4.2 COLESTEROL TECIDUAL	50
4.3 PEROXIDAÇÃO LÍPIDICA TECIDUAL	51
4.4 QUANTIDADE DE ATEROSCLEROSE NA AORTA	52
4.4.1 Macroscopia e microscopia da aorta	53
4.5 FUNÇÃO ENDOTELIAL	56
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÃO	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	83

LISTA DE ABREVIATURAS

AHA	- American Heart Association
ApoA1	- Apoproteína 1
Ach	- Acetilcolina
CETP	- Proteína transportadora de éster de colesterol
EDCF(s)	- Fatores constritores derivados do endotélio
EDHF(s)	- Fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio
EDRF(s)	- Fatores relaxantes derivados do endotélio
EDTA	- Ácido etileno diamino tetraacético
GMPc	- Guanilato ciclase
HDL-c	- Lipoproteínas de alta densidade
HMGCoA	- 3-Hidroxi-Metil-Glutaril coenzima A
LDL-c	- Lipoproteínas de baixa densidade
LDL-ox	- Lipoproteína de baixa densidade oxidada
MDA	- Malondialdeído
NaDH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NE	- Noradrenalina
NO	- Óxido nítrico
O₂⁻	- Ânion superóxido
TBA	- Ácido tiobarbitúrico
TCA	- Ácido tricloroacético

Figura 1. Esquema demonstrando divisão dos grupos, tratamento e tempo de duração de cada grupo.....	37
Figura 2. Segmento da aorta suspensa em cuba com solução de Krebs Henseleit e aerado com carbogênio.....	40
Figura 3. Registro das curvas de concentração-efeito com acetocolina e nitroprussiato de sódio.	41
Figura 4. Representação esquemática da curva de concentração-efeito com acetilcolina em endotélio integro e lesado.....	41
Figura 5. Colesterol total nos 6 grupos: Os valores são expressos como média e desvio padrão, considerando-se *p<0,05 em relação a G1, ° p<0,05 em relação a G2 e & p<0,05 em relação a G3.....	47
Figura 6. LDL-c nos 6 grupos: Os valores são expressos em media e desvio padrão, considerando-se *p<0,05 em relação a G1, ° p<0,05 em relação a G2 e & p<0,05 em relação a G3.....	48
Figura 7. HDL-c nos 6 grupos: Os valores são expressos em média e desvio padrão, considerando-se *p<0,05 em relação a G1, ° p<0,05 em relação a G2 e & p<0,05 em relação a G3.....	49
Figura 8. Triglicérides nos 6 grupos: Os valores são expressos em média e desvio padrão, considerando-se *p<0,05 em relação a G1, ° p<0,05 em relação a G2 e & p<0,05 em relação a G3.....	50
Figura 9. Colesterol tecidual nos 6 grupos: Os valores são expressos como média e desvio padrão. Considerando-se *p<0,05 em relação a G1, ° p<0,05 em relação a G2 e & p<0,05 em relação a G3.	51
Figura 10. Peroxidação lipídica nos 6 grupos: Os valores são expressos como média e desvio padrão, considerando-se *p<0,05 em relação a G1, ° p<0,05 em relação a G2 e & p<0,05 em relação a G3.....	52

Figura 11. Quantificação da aterosclerose nos 6 grupos: Os valores são expressos como média e desvio padrão, considerando-se *p<0,05 em relação a G1, ° p<0,05 em relação a G2 e & p<0,05 em relação a G3.	53
Figura 12. Macroscopia das aortas nos grupos 1 a 6, coradas com Sudam IV vistas pela superfície intimal, demonstrando a aterosclerose, em menor intensidade no grupo 6.	54
Figura 13. Microscopia das aortas nos grupos 1 a 6, aumento 2,5x, coradas pela Hematoxilina/Eosina, demonstrando o espessamento intimal, secundário a aterosclerose, salientando o menor grau de acometimento no grupo 6.	55
Figura 14. Microscopia das aortas nos grupos 1-6, aumento 10x, coradas pela Hematoxilina/Eosina, demonstrando o espessamento intimal, secundário a aterosclerose, salientando a constituição da placa, na qual predomina colesterol extracelular nos grupos 2, 4 e 5. Nos grupos 3 e 6 já ocorre a presença de tecido colágeno.	56
Figura 15. Resultados da função endotelial nos 6 grupos, considerando *p<0,05 em relação a G1, ° p<0,05 em relação a G2 e & p<0,05 em relação a G3.	57
Figura 16. Resultados da ação do nitroprussiato de sódio. Demonstrando que não houve diferença significativa entre os grupos (p > 0,05).	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados dos parâmetros bioquímicos estudados nos grupos G1 a G6 (médias \pm DP).....	46
Tabela 2. Resultados dos parâmetros teciduais nos Grupos G1 a G6	46

A regressão da aterosclerose é ainda um campo muito amplo a ser pesquisado, com mecanismos a serem desvendados, sendo o coelho um animal utilizado internacionalmente para fins de pesquisa, nesta área. Este trabalho foi realizado com objetivo de verificar a evolução e involução da aterosclerose em coelhos hipercolesterolêmicos e sua relação com a função endotelial, lípides plasmáticos, colesterol e peroxidação tecidual e quantificação de aterosclerose. Foram utilizados 30 coelhos da raça Nova Zelândia, com peso inicial de 3,0 a 3,5 kg e divididos em 6 grupos (n=5): G1 - animais não hipercolesterolêmicos; G2 - animais hipercolesterolêmicos; G3 - animais hipercolesterolêmicos, seguidos por 4 meses de dieta não hipercolesterolêmica; G4 - animais hipercolesterolêmicos, seguidos por 1 mês de dieta não hipercolesterolêmica e tratamento com rosuvastatina (5,0mg/animal/dia); G5 - animais hipercolesterolêmicos, seguidos por 2 meses de dieta não hipercolesterolêmica e tratamento com rosuvastatina (5,0mg/animal/dia); G6 - animais hipercolesterolêmicos, seguidos por 4 meses de dieta não hipercolesterolêmica e tratamento com rosuvastatina. (5,0mg/animal/dia). Sendo que os animais dos grupos G2 a G6 foram alimentados com dieta hipercolesterolêmica composta de colesterol a 0,5% e 10% de gordura de coco por um período de 4 meses. Ao final do experimento foram dosados no plasma: colesterol total, triglicérides e HDL-c. A LDL-c foi estimada através da fórmula de Friedwald. Em segmentos de aorta, dosou-se colesterol e MDA, assim como foi medida a função endotelial utilizando-se de curvas de concentração/efeito com acetilcolina. A quantificação de aterosclerose foi verificada macroscopicamente na aorta corada pelo sudan IV, e microscopicamente em fragmentos corados com hematoxilina-eosina e estudados por microscopia óptica. A quantificação foi realizada por software específico. Os valores do colesterol total, LDL-c, HDL-c, triglicérides, colesterol e peroxidação teciduais, nos diferentes grupos de animais, foram examinados por teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn. As curvas que expressam a função endotelial foram comparadas por análise de variância (ANOVA) para medidas

repetidas. Considerando-se valores significativos “p”<0,05. Os parâmetros, tanto bioquímicos, quanto teciduais estiveram aumentados no G2 em relação ao G1. A suspensão da dieta hipercolesterolêmica não foi suficiente para retornar os parâmetros teciduais aos do grupo G1. Os grupos tratados com rosuvastatina G4, G5 e G6, tiveram os lípidos plasmáticos diminuídos significativamente; porém, em relação ao colesterol e peroxidação teciduais apenas nos animais do G6 ocorreu diminuição significativa. Em relação à função endotelial, somente, os animais do grupo G6 apresentaram melhora significativa. Apenas a suspensão da dieta não foi eficiente para melhorar os valores teciduais do colesterol, peroxidação lipídica, função endotelial e envolver a aterosclerose. O tratamento prolongado com rosuvastatina, além da suspensão da dieta hipercolesterolêmica, diminuiu o colesterol e peroxidação lipídica teciduais, melhorou a função endotelial e produziu involução da aterosclerose.

Palavras-Chave: Aterosclerose, Coelhos, Endotélio, Óxido nítrico, Peroxidação lipídica.

ABSTRACT

Regression of atherosclerosis is still a very broad field to be searched, with mechanisms to be explored, the rabbit is an animal used internationally for research in this area. This work was carried out aiming at checking the progress and regression of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits and its relation to endothelial function, lipid peroxidation and plasma and tissue. We used 30 New Zealand white rabbits initially weighing 3.0 to 3.5 kg and divided into six groups (n=5): G1: not hypercholesterolemic animals, G2: hypercholesterolemic animals, G3: hypercholesterolemic animals, followed by four months of not hypercholesterolemic diet; G4: hypercholesterolemic rats, followed by a month of not hypercholesterolemic diet and treatment with rosuvastatin (5.0mg/animal/day), G5: hypercholesterolemic rabbits, followed by two months of diet does not hypercholesterolemic and treatment with rosuvastatin (5.0mg/animal/day) G6: hypercholesterolemic animals, followed by four months of diet does not hypercholesterolemic and treatment with rosuvastatin. (5.0mg/animal/day). The animals in groups G2 to G6 were fed a hypercholesterolemic diet composed by 0.5% cholesterol and 10% coconut oil for a period of four months. At the end of the experiment were measured in plasma: total cholesterol, triglycerides and HDL-C. The LDL-C was estimated by the Friedwald formula. In aortic segments dosed 0cholesterol and MDA, as well as measured endothelial function through curves of concentration-effect with acetylcholine. Quantification of atherosclerosis in the aorta was observed macroscopically stained sudam IV, and microscopic fragments stained with hematoxylin-eosin and studied by light microscopy. Quantification was performed by specific software. The values of total cholesterol, LDL-C, HDL-C, triglycerides, cholesterol and tissue peroxidation in different groups of animals were examined by nonparametric statistical test Kruskal-Walls, followed by multiple comparison test of Dunn. The curves expressing endothelial function were compared by analysis of variance (ANOVA) for repeated measures. Considering the significant values "p"<0.05. The parameters, both biochemical and tissue were increased for G2 compared to G1. The suspension of the hypercholesterolemic

diet was not enough parameters to return the tissue to the G1. The groups treated with rosuvastatin G4, G5 and G6, plasma lipids were significantly decreased, but in relation to cholesterol peroxidation and tissue in animals only significant decrease in the G6. Regarding the endothelial function, only the animals of the G6 group showed significant improvement. Only the suspension of the diet was not effective for improving the tissue values of cholesterol, lipid peroxidation, endothelial function and regress atherosclerosis. Prolonged treatment with rosuvastatin, besides the suspension of hypercholesterolemic diet decreased cholesterol and tissue lipid peroxidation, improved endothelial function and produced regression of atherosclerosis.

Keywords: Atherosclerosis, Rabbits, Endothelium, Nitric oxide, Lipid peroxidation.

1. INTRODUÇÃO



Aterosclerose é entendida como uma doença multifatorial, inflamatória, influenciada pela genética do indivíduo e agravada por fatores externos, como ingestão de alimentos ricos em colesterol, tabagismo e sedentarismo, dentre outros fatores de risco. Forma-se através do acúmulo de LDL-c na íntima arterial, onde esta se oxida ao entrar em contato com radicais livres gerados nesse local, fazendo com que os monócitos migrem para fagocitar as LDL-c e, conseqüentemente, formar as células espumosas.

O termo “aterosclerose” foi criado por Marchand, em 1904, que, ao observar a parede vascular, encontrou a presença de depósitos de lipídeos, circunscritos, associados a fenômenos de esclerose envolvente. Está citada entre as doenças que acometiam os indivíduos desde épocas antes de Cristo, juntamente à lepra e gripe, além de outras. Assim, lesões ateroscleróticas foram encontradas em múmias com mais de 3.500 anos, sendo a morte súbita citada por Hipócrates (469-377 a.C). Em 300 a.C a claudicação intermitente, típica em doença aterosclerótica, foi documentada por Erasistratos. Em 1575, Fallopius observou graves achados patológicos em artérias, que foram caracterizados como degeneração dos ossos, sugerindo a presença de lesões ateroscleróticas calcificadas. A relação entre lesões ateroscleróticas coronárias e os sintomas de angina foi interpretada como resultado da isquemia do miocárdio, em 1809, por Potain e, em, 1835 foi criado o termo “arteriosclerosis” por Lobstein⁽¹⁾.

Em 1914, Nicholai Anitschkow foi o primeiro a estudar e descrever o papel do acúmulo do colesterol na parede dos vasos para a formação de aterosclerose. Até 1946 foi considerada, por muitos pesquisadores, como uma doença decorrente da idade e que, por isso, não havia muito que se fazer ou pesquisar. No entanto, em 1958, a Organização Mundial de Saúde definiu a aterosclerose como uma afecção na íntima das artérias resultante do acúmulo focal de lipídeos, hidratos de carbono complexos, sangue e produtos sanguíneos, tecido fibroso e depósito de cálcio, acompanhadas de alterações na camada média⁽²⁾. A partir de 1969, as pesquisas se intensificaram e demonstraram que o colesterol poderia

ser reduzido através de mudanças no estilo de vida, e que a aterosclerose poderia ser interrompida na sua evolução.

1.1 ETIOPATOGENIA DA ATEROSCLEROSE

A aterosclerose se forma precocemente, originando a placa aterosclerótica posteriormente, e esta é composta por 3 elementos: células (músculo liso, macrófagos, leucócitos); matriz extracelular e tecido conjuntivo (colágeno, fibras elásticas e proteoglicanas) e depósito lipídico intra e extracelular. A aterosclerose é classificada em graus de I a VI, segundo a American Heart Association (AHA). As lesões são evolutivas, considerando-se como iniciais as do tipo I e II, as intermediárias do tipo III e as avançadas de tipos IV a VI⁽³⁾.

As principais características das lesões do tipo I são: lesões microscópicas dependentes do acúmulo de LDL-c no espaço subendotelial que se oxidam, são reconhecidas e fagocitadas por macrófagos, tornando-se as células espumosas^(4, 5).

As lesões do tipo II apresentam células musculares lisas e pequeno acúmulo de gordura extracelular⁽⁵⁾. As lesões do tipo III, chamadas de pré-ateroma, diferem das lesões tipo II por possuir maior quantidade de lipídeo extracelular, ocupando parte da matriz de proteoglicanas, formando pequenos núcleos lipídicos visíveis sem ajuda de microscópio. As lesões do tipo IV são consideradas ateromas por possuírem um núcleo lipídico individualizado, formado pela fusão de ilhotas de gordura, tendo um núcleo de centro necrótico, além de macrófagos, gordura livre e grande quantidade de restos celulares⁽⁶⁾. As lesões do tipo V caracterizam-se pela presença de tecido fibroso envolvendo o núcleo lipídico e subdivide-se em 3 subtipos: a, b e c. Lesão do tipo Va é denominada fibroateroma por possuir capa fibrótica envolvendo o núcleo lipídico. Lesão do tipo Vb é denominada de placa calcificada por possuir cálcio no componente fibrótico ou mesmo no núcleo lipídico e a lesão do tipo Vc é denominada placa fibrótica por

possuir tecido fibrótico com ausência de núcleo lipídico⁽⁶⁾. A placa do tipo VI é aquela complicada por trombose, fissura, ruptura, hemorragia ou erosão, sendo a causa dos eventos isquêmicos agudos⁽⁷⁾.

As placas ateroscleróticas podem ser divididas e caracterizadas em estável, que apresenta uma capa fibrosa espessa possuindo escassas células inflamatórias e núcleo lipídico menos proeminente; ou instável, com uma capa fibrosa fina com atividade inflamatória intensa e núcleo lipídico proeminente. Possuem localização difusa, mas encontram-se preferencialmente na aorta abdominal, nas artérias coronárias, no segmento arterial íleo-femoral poplíteo, nas artérias carótidas internas e nas artérias cerebrais do polígono de Willis, com menor acometimento das artérias dos membros superiores, as mesentéricas e renais.

Entre as várias teorias sobre a aterogênese pode-se citar:

- 1) teoria da resposta à retenção;
- 2) teoria lipídica;
- 3) teoria monoclonal;
- 4) teoria da incrustação; e
- 5) teoria da resposta à lesão oxidativa, revistas pormenorizadamente por Silva⁽⁸⁾.

A teoria de resposta à retenção se baseia na existência de áreas de predileção estrutural e funcionalmente diferente do restante da superfície endotelial⁽⁹⁾. Tais regiões se caracterizam por ter a íntima mais espessa, conter células mesenquimatosas, musculares lisas indiferenciadas, fibras elásticas e de colágeno⁽¹⁰⁾. Também, por apresentarem maior permeabilidade do endotélio para proteínas plasmáticas, como a albumina, o fibrinogênio e LDL-c, um glicocalix mais fino e por um maior *turnover* endotelial. Nesta teoria havia a idéia de ausência de lesão endotelial, aparentemente nas fases mais precoces da aterogênese, postulando que a lesão endotelial não seria um fator essencial para a

formação da placa de aterosclerose e sim a retenção de LDL-c na parede arterial.

Isso ocorreria, devido ao influxo de LDL-c maior que o efluxo dependendo da lâmina elástica interna que aprisiona lipoproteínas e outras macromoléculas, como os fatores de coagulação, dependentes de suas concentrações no plasma. Tal retenção das LDL-c na íntima estaria associada a importantes alterações na composição bioquímica dos elementos da matriz, aumento na concentração de sulfato de condroitin e sulfato de dermatan e uma falta de sulfato de heparan em relação à parede arterial normal⁽¹¹⁾.

A teoria da resposta lipídica considera que a contínua retenção de lipídeos e lipoproteínas e a sua relação com os elementos celulares presentes ou atraídos para a íntima levariam à formação de células espumosas. Na evolução das estrias lipídicas para as formas mais avançadas da placa ocorreria um aumento das células musculares lisas, se bem que os macrófagos e os linfócitos T, helper ou supressores/citotóxicos, se encontrariam, também em número significativo⁽¹²⁾.

Benditt e Benditt⁽¹³⁾ propuseram a teoria monoclonal, que admite que as células musculares lisas, do tecido conjuntivo e outras encontradas normalmente na parede arterial seriam as mesmas encontradas nas placas de aterosclerose. Assim, derivaria do mesmo tipo das células normais e que as alterações seriam decorrentes de transformações secundárias a vários estímulos químicos e até virais.

Na teoria da incrustação ou hipótese trombogênica, os macrófagos fazem o caminho inverso e atravessam novamente o endotélio, agora em direção ao lúmen. Porém, a capacidade migratória está prejudicada, o que deve estimular a adesão plaquetária e formar trombos. Mesmo com a capa fibrosa formada, os monócitos continuam entrando na íntima, predominantemente nas bordas da lesão, onde a capa não existe ou é mais fina, expandindo-se periféricamente. As células espumosas, aprisionadas no centro da lesão vão degenerando progressivamente, desenvolvendo-se um grande núcleo necrótico que acaba por

envolver parte da camada média. Menos de metade das placas contêm um núcleo lipídico, que pode representar até 45% da sua constituição, fundamentalmente colesterol, sendo a maioria composta por tecido fibroso duro, denominado de placas fibrosas. Até esse ponto, pode-se ter complicações como angina crônica; porém, com a formação repetida de trombos, apresenta-se o risco de complicações responsáveis pelas síndromes coronarianas agudas.

A teoria da resposta à lesão oxidativa, ou teoria de Ross, formulada em 1976 e revista em 1986^(14, 15) considera que uma lesão inicial do endotélio seja o fato crucial para desencadear todo o processo de aterogênese. A lesão endotelial pode acontecer por tensão hemodinâmica, tensão de cisalhamento, danos tóxicos, deposição de complexos imunes circulantes, infecções, radicais livres e dos níveis aumentados de LDL-c. Quando esses fatores coexistem, atuam sinergisticamente e multiplicam seus efeitos, amplificando a magnitude da lesão vascular⁽¹⁶⁾. Essa é a teoria mais aceita e postula que a LDL-c ao penetrar na região da íntima arterial, sofre ação dos macrófagos, células endoteliais e musculares lisas que liberam enzimas e outras substâncias com o intuito protetor e produtos metabólitos que oxidam a LDL-c. Essa teoria está pormenorizada nos itens seguintes: função endotelial, aterosclerose e LDL-c oxidada.

1.2 FUNÇÃO ENDOTELIAL

O endotélio vascular é constituído por uma camada de células que recobre todos os tipos de vasos e possui várias funções. Antes do trabalho de Furchgott e Zawadski⁽¹⁷⁾ o endotélio era considerado, apenas, como uma camada de células funcionando como uma barreira entre o sangue e a parede vascular. Atualmente, é considerado um órgão endócrino e metabólico altamente ativo com funções muito importantes, atuando no transporte de substâncias, solutos, moléculas intercelulares, tônus vascular, coagulação e inflamação⁽¹⁸⁾. Os mediadores e/ou fatores produzidos pelo endotélio podem ser neutralizados dentro da própria

célula, difundir-se para o sangue ou atravessar a membrana do músculo liso vascular⁽¹⁹⁾. No músculo liso vascular, essas substâncias podem ativar receptores constritores ou relaxantes, estimular a proliferação celular, a geração de espécies reativas de oxigênio e a expressão de genes.

A síntese e liberação de substâncias vasoativas pelo endotélio, que modulam o tônus, calibre vascular e fluxo sanguíneo, desempenhando papel fundamental na regulação do aparelho circulatório e constitui a função mais conhecida do órgão, e se não, a mais importante.

Essas substâncias vasoativas foram denominadas fatores relaxantes (EDRFs) e fatores constritores derivados do endotélio (EDCFs).

Os fatores relaxantes são: óxido nítrico (NO), prostaciclina, monóxido de carbono e vários fatores hiperpolarizantes, como o ácido eposseicosatrienóico, metabólitos do ácido araquidônico e endocanabinóides^(20, 21). Os fatores constritores são: endotelina, produtos da oxigenase, como endoperóxidos e tromboxano e espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-). São liberados, também, pelo endotélio: interleucinas, fatores de crescimento, inibidores de plasminogênio e fator de Von Willebrand⁽²²⁾. As células endoteliais são susceptíveis à força de mudanças hemodinâmicas e composição sanguínea, regulando a vasodilatação e inibem a proliferação de musculatura lisa vascular, agregação plaquetária e formação de trombo. Em condições normais, todo esse processo leva a uma homeostasia. Nas condições patológicas de desequilíbrio, podem-se citar fatores de risco como a idade avançada, ação de radicais livres, fumo, diabetes, hipertensão arterial, hipercolesterolemia e insuficiência cardíaca, as células endoteliais passam a apresentar disfunção e favorecem situações proaterogênicas⁽²³⁾.

1.3 ATEROSCLEROSE E LDL OXIDADA

Evidências sugerem, fortemente, que a geração das células espumosas, seja um processo independente dos receptores normais de LDL-c, presentes em todos os tecidos. Em uma delas, pacientes e animais com deficiência genética de receptores de LDL-c, desenvolvem a lesão aterosclerótica rica em células espumosas.

Portanto, a captação arterial de LDL-c ocorre também, por vias alternativas, que foram denominadas por Brown e Goldstein⁽²⁴⁾ de “*scavenger pathways*”. Então, postulou-se que as LDL-c circulantes sofreriam algum tipo de transformação na parede vascular e que essa forma modificada de LDL-c seria fagocitada pelos macrófagos e geraria células espumosas⁽²⁴⁾.

Um dos eventos mais precoces na aterosclerose é a oxidação excessiva de LDL-c que ocorre, apesar da utilização de todos os antioxidantes endógenos lipossolúveis. A fragmentação dos ácidos graxos oxidados formam produtos com grande variação de peso molecular (aldeídos, álcoois, cetonas e alcanos) e, também, fragmentação da cadeia polipeptídica de apo B, a oxidação do colesterol, a conjugação dos produtos de degradação lipídica, perda dos sítios reconhecidos por receptor de LDL-c e geração de nova configuração reconhecida por receptor “*scavenger*”^(9, 25, 26).

Esse processo pode ser inibido pelos agentes antioxidantes⁽²⁷⁾ e recentes evidências sugerem que a HDL-c pode evitar as alterações oxidativas da LDL-c.

O processo de oxidação da LDL-c *pode ser*, também, *in vitro*, através de incubação em cultura de células com íons de metais de transição, tais como cobre e ferro⁽²⁸⁾.

As lipoproteínas de baixa densidade têm sido descritas como um grupo heterogêneo de partículas que diferem entre si em tamanho, conformação, carga elétrica e composição química, sendo subdivididas em LDL-I, LDL-II, LDL-III e LDL IV mais densa e pequena. As LDL-c pequenas e densas são mais aterogênicas

que grandes partículas por causa de sua maior penetração na célula endotelial e maior susceptibilidade oxidativa⁽²⁹⁾.

A hipótese oxidativa considera que a LDL-c apresenta 2 fases: na primeira fase, ou fase inflamatória, os lípidos da LDL-c sofrem oxidação, sem grandes modificações na apoB, o que resulta na formação de LDL-c minimamente modificada. Nesta fase, a LDL-c pode recrutar monócitos circulantes, através do aumento da expressão de glicoproteínas de adesão na superfície das células. Na camada íntima as LDL-c sofrem intensa oxidação por espécies reativas de oxigênio e enzimas produzidas pelos macrófagos, como a mieloperoxidase e lipoxigenase, transformando-se em LDL-c altamente oxidada (LDL-ox). As LDL-ox passam a ser reconhecidas pelos receptores do tipo “scavengers” dos macrófagos, que não são regulados pelo conteúdo celular de colesterol.

Somam-se a esses efeitos, o aumento da disfunção endotelial, a indução da agregação plaquetária, a formação de trombos e a desestabilização das placas ateroscleróticas, por mecanismos que incluem a expressão de metaloproteinases, todos promovidos pela LDL-ox⁽³⁰⁾.

O sistema antioxidante do organismo protege as células dos efeitos danosos dos radicais livres, evitando a peroxidação dos ácidos graxos polinsaturados⁽²⁷⁾.

Esse sistema consiste de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a glutatona peroxidase, a catalase; de micronutrientes que incluem os minerais como selênio, cobre, zinco manganês; as vitaminas E, C, A e o beta-caroteno^(31, 32). As primeiras linhas de defesa naturais são as metaloproteínas, superóxido dismutase citoplasmática (contendo cobre e zinco) e mitocondrial (contendo manganês), que atuam acelerando a velocidade de dismutação do radical superóxido⁽³³⁾. A catalase localiza-se nos peroxisomas e é uma enzima que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio. Outra enzima citoplasmática que também é capaz de inibir o peróxido de hidrogênio por um mecanismo diferente é a glutatona peroxidase, cujo co-fator é selênio⁽³⁰⁾. A

primeira sugestão de que as estatinas pudessem ser um destes antioxidantes foi proposta por Ribeiro Jorge *et al.*⁽³⁴⁾, que verificaram em coelhos hipercolesterolêmicos a reversão da disfunção endotelial, desproporcional à redução lipídica, quando tratados com a pravastatina. Essa observação foi reiterada em 1997 pelos mesmos autores quando se estudou a reversão rápida da hipercolesterolemia, com estatinas.

A atividade antioxidante das estatinas foi observada por outros autores com sinvastatina, a fluvastatina⁽³⁵⁾ e a atorvastatina⁽³⁶⁾.

Resta, no entanto, melhor definição sobre a real interferência das substâncias antioxidantes sobre a evolução clínica da aterosclerose.

1.4 FÁRMACOS REDUTORES DE COLESTEROL

À medida que os conhecimentos avançaram a respeito do efeito nocivo da elevação do colesterol, foi sugerida em 1960, a intervenção através de dietas, para a redução do colesterol. Em meados de 1950 foi lançado no mercado o triparanol que inibia a biossíntese de colesterol. Porém, por apresentar efeitos colaterais graves como indução de catarata e não sendo muito eficaz para diminuir o colesterol, foi abandonado. Em 1970, no Japão, Akira Endo descobriu que os fungos responsáveis pela produção de penicilina produziam uma substância, o *Penicillium citrinium* ML-236B, denominada de compactina que era um potente inibidor da enzima 3Hidroxi-Metil-Glutaril coenzima A redutase (HMGCoA). Em 1977, pesquisadores de outros países comprovaram os trabalhos de Endo, concluindo pela segurança e eficácia da compactina. Na mesma década, porém, nos Estados Unidos, foi encontrado um composto produzido por um outro fungo (*Aspergillus terreus*), cuja única diferença com a compactina era a adição de um carbono a um dos anéis e a esse composto denominou-se lovastatina. A lovastatina apresentava as mesmas propriedades em relação à inibição da

HMGCoA que a compactina, porém, com menores efeitos colaterais, surgindo as estatinas⁽³⁷⁾.

Essas são medicamentos que interferem eficazmente na síntese celular de colesterol por inibição competitiva com a HMGCCoa redutase e reduzem a hipercolesterolemia por induzirem a formação de receptores hepáticos que captam as LDL-c do plasma e por diminuírem a síntese de VLDL. As estatinas mais antigas à disposição para tratamento médico são: lovastatina, pravastatina e sinvastatina e as mais novas cerivastatina, fluvastatina, rosuvastatina e, a mais recente, porém, ainda não disponível no Brasil, a pitavastatina.

1.5 ENSAIOS CLÍNICOS

O estudo Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) foi um dos primeiros com estatinas que demonstraram um efeito positivo na redução do colesterol total (25%), na LDL-c (35%) e redução na mortalidade por doença coronariana em 42%⁽³⁸⁾. Outros estudos clínicos bem conduzidos (West Scotland Coronary Prevention Study (Woscops)⁽³⁹⁾, The Cholesterol and Recurrent Events (Care)⁽⁴⁰⁾, Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TEXCAPS)⁽⁴¹⁾ demonstraram, de forma evidente, a redução da mortalidade e eventos coronarianos em pacientes em que se reduziu o colesterol plasmático com o uso de estatinas.

Com o desenvolvimento de novas tecnologias, principalmente no campo da imagem (angiografia, ultrassonografia e ressonância magnética), foram sendo realizadas novas pesquisas que objetivaram verificar o diâmetro, volume da placa e alterações morfológicas em pacientes com aterosclerose tratados com estatinas ou outros fármacos redutores de colesterol. Assim, estudos utilizando a angiografia coronária, se propuseram a verificar prováveis modificações no volume da placa de aterosclerose, na expectativa de correlacionar as alterações morfológicas desta com a redução dos eventos cardiovasculares.

O estudo The Bezafibrate Coronary Atherosclerosis Intervention Trial (Becait) mostrou não progressão de placas de aterosclerose nas artérias coronárias (obstruções menores que 20-50%), em pacientes infartados e tratados com benzafibrato na dose de 600mg/dia e seguidos por 2 anos⁽⁴²⁾.

The Monitored Regression Study (MARS) utilizando a angiografia quantitativa revelou que pacientes com aterosclerose, medicados com lovastatina 40mg/2x/dia, apresentaram aumento do diâmetro luminal de $0.13 \text{ mm} \pm 0.35$ em lesões maiores que 50%⁽⁴³⁾. Mais recentemente, estudos utilizando ultrassonografia intracoronária e mais intensa redução das LDL-c evidenciaram regressão da placa de aterosclerose⁽⁴⁴⁾. A avaliação da relação íntima/média da carótida, medida, também por ultrassonografia, sugeriu regressão da aterosclerose⁽⁴⁵⁾.

A ultrassonografia intravascular tem sido eficaz em detectar o tamanho e distribuição da placa de aterosclerose por proporcionar uma visão tridimensional do vaso.

O estudo Reversal of Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering (REVERSAL) realizado por 18 meses, randomizado e multicêntrico comparou o efeito de um tratamento intenso e moderado com atorvastatina 80 mg em 253 pacientes e pravastatina na dose de 40mg em 249 pacientes. No final do estudo verificou-se que atorvastatina reduziu a progressão da aterosclerose em relação à pravastatina, demonstrando o valor do tratamento com maior dose de estatina⁽⁴⁶⁾.

O estudo Justification for the Use of Statins in Prevention: Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER), um dos mais significativos trabalhos feitos com a rosuvastatina, avaliou 17.802 pacientes aparentemente saudáveis com LDL-c < 130 mg/dl e dosagem de 2,0 mg de proteína C reativa ultrasensível que receberam 20mg de rosuvastatina por 1,9 anos. Parâmetros bioquímicos demonstraram redução de 50% do LDL-c e 37% da proteína C reativa ultrasensível⁽⁴⁷⁾.

O Study to Evaluate the Effect of Rosuvastatin On Intravascular ultrasound-Derived Coronary Atheroma Burden (ASTEROID) avaliou 517

pacientes com doença aterosclerótica coronariana diagnosticada através de angiografia e com 20% de estenose, os quais receberam 40 mg de rosuvastatina por 24 meses. Parâmetros bioquímicos demonstraram redução de 53,2% em LDL-c, e aumento de 14,7% no HDL-c. O resultado pela ultrassonografia demonstrou 0,79% de redução do volume do ateroma, e uma mediana de 5,6 mm³ na redução do ateroma, no total do segmento do vaso coronariano⁽⁴⁴⁾.

As constatações desses ensaios clínicos, nem, sempre seguidas por redução da hipercolesterolemia em níveis normais, levaram os pesquisadores a investigar a possibilidade de existir efeitos pleiotrópicos das estatinas, atualmente constatados ocorrerem na função endotelial, nos processos inflamatório, antioxidantes e antitrombóticos⁽⁴⁸⁻⁵²⁾.

1.6 REGRESSÃO DA PLACA DE ATEROSCLEROSE: ESTUDOS EXPERIMENTAIS

Nikolai N. Anitschkow em 1914, foi um dos pioneiros na indução de hipercolesterolemia em coelhos. Porém, na época, seus experimentos não foram muito bem compreendidos e obtiveram pouca repercussão. Através de alimentação de coelhos com gema de ovo, ele descobriu que ocorria depósito de gordura nas artérias. Os trabalhos de Anitschkow foram repetidos por outros autores, que utilizaram outras espécies de animais, por considerarem que o nível de colesterol nos coelhos (1000mg/ml) era muito alto, e totalmente diferente dos humanos. Sendo assim, utilizaram como modelos experimentais cães e ratos e não obtiveram resposta semelhante.

Em 1933, quando Anitschkow publicou uma revisão de seus trabalhos na revista americana “Atherosclerosis”, ficou mais conhecido e outros pesquisadores começaram a reproduzir seus trabalhos, surgindo novas perguntas e se descobrindo novos achados⁽⁵³⁾.

Os estudos experimentais mostram de forma mais concreta a diminuição do conteúdo lipídico da placa de aterosclerose⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾. Estes devem ser considerados, principalmente, na cogitação dos mecanismos envolvidos com eventual aplicação clínica. O trabalho de Badimon⁽⁵⁷⁾, mostrou em coelhos hipercolesterolêmico aos quais se administrou HDL-c, uma significativa redução do teor de colesterol total, colesterol esterificado, colesterol livre e fosfolípides na parede arterial em relação aos animais controle. Paralelamente, observou-se redução da porcentagem de aterosclerose da superfície da aorta corada pelo Sudam IV e também do número de células espumosas ao exame histológico.

Em coelhos tratados com sinvastatina e pravastatina⁽³⁴⁾ verificou, também, redução do teor de colesterol da parede arterial, da peroxidação lipídica e do número de células espumosas, quando comparados com o grupo controle. Concomitantemente, ocorreu reversão da disfunção endotelial.

Estudo com ressonância magnética também verificou regressão e progressão da aterosclerose em coelhos tratados com colesterol por 6 meses e regressão por outros 6 meses, demonstrando que ocorre modificações na composição da placa conforme o tempo mais longo ou mais curto de suspensão da dieta⁽⁵⁸⁾. Novos métodos de estudo como espectroscopia, utilizando raio infravermelho, têm sido propostos para se analisar a placa de aterosclerose e abrem novas perspectivas para o conhecimento da formação e regressão do ateroma⁽⁵⁹⁾.

A partir de 1994 no Laboratório de Endotélio, Lípides e Aterosclerose do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental-Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Estadual de Campinas, Ribeiro Jorge e colaboradores, verificaram um diferencial de ação entre 2 tipos de estatinas: pravastatina e sinvastatina administrando-as em coelhos hipercolesterolêmicos, em doses suficientes para reduzir o nível de colesterol plasmático a valores semelhantes, nos 2 grupos de animais.

Chegaram a conclusão que a pravastatina produz um relaxamento dependente do endotélio de maior magnitude e diminuição do número de células espumosas. Assim, a existência de alguns efeitos adicionais do medicamento, que posteriormente foi denominado de efeitos pleiotrópicos das estatinas deveriam ocorrer.

Seguindo a linha de pesquisa do Laboratório, outros trabalhos foram apresentados em congressos e publicados^(34, 50, 60-66).

No entanto, todos esses estudos abordaram a aterosclerose em sua fase inicial. Com o intuito de abranger melhor o conhecimento, sobre o estudo da aterosclerose já estabelecida, foi proposto o presente trabalho. Este teve o objetivo de verificar a evolução da aterosclerose, a sua possível involução sob intervenção na dieta e medicamentosa e os possíveis mecanismos envolvidos na disfunção endotelial.

2. OBJETIVOS



2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a evolução e involução da aterosclerose experimental em coelhos hipercolesterolêmicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) verificar a relação da evolução e involução da aterosclerose com os lípides plasmáticos;
- 2) verificar a relação da evolução e involução da aterosclerose com o colesterol e peroxidação lipídica teciduais;
- 3) verificar a relação da evolução e involução da aterosclerose com a função endotelial.

3. MATERIAIS E MÉTODOS



Este estudo foi realizado após aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, protocolo nº 786-1.

Os coelhos foram mantidos em temperatura entre 20° C e 22°C e período de luz de 12 horas, no Biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Utilizou-se uma dieta padrão, não hipercolesterolêmica, da marca Purina, sendo que cada 100 g de ração foi composta por proteínas 20%, carboidratos 45%, fibras 16%, gordura 5% e cinza 14%. A dieta não hipercolesterolêmica forneceu-se ao grupo normocolesterolêmico, enquanto que os outros cinco grupos de animais foram submetidos à dieta não hipercolesterolêmica mais adição de 0,5% de colesterol e 10% de gordura de coco, o que proporcionou 70% de ácidos graxos saturados, 17% monoinsaturados e 13% de poliinsaturados. A suplementação foi feita dissolvendo 5g de colesterol em 100g de gordura de coco aquecida e misturada com 1kg de ração até que os “pellets” absorvessem completamente os lipídeos. A dieta foi preparada semanalmente.

Para a realização deste trabalho utilizou-se os seguintes materiais: colesterol ultrapuro (cód 967), obtido da empresa Vetec Química Fina Ltda, (RJ, Brasil), a gordura de coco foi obtida da empresa Cargil, Kits enzimáticos para a determinação de colesterol CAT N° (01400) adquiridos do Laboratório Laborlab, (SP, Brasil), o Kit de triglicérides MONO CAT (10726) foi obtido da IN VITRO Diagnóstica (MG, Brasil) e reativo precipitante para separar HDL (CAT N° 02300) obtido da empresa Laborlab (SP, Brasil).

Os sais e reagentes foram utilizados da marca Merck (SP, Brasil). A acetilcolina, noradrenalina e nitroprussiato de sódio foram utilizados da marca Sigma (USA).

Para o estudo utilizou-se 30 coelhos machos da raça Nova Zelândia, peso inicial de 3,0kg a 3,5kg, distribuídos em seis grupos (n=5): G1: animais não hipercolesterolêmicos; G2: animais hipercolesterolêmicos; G3: animais

hipercolesterolêmicos, seguidos por 4 meses de dieta não hipercolesterolêmica; G4: animais hipercolesterolêmicos, seguidos por 1 mês de dieta não hipercolesterolêmica e tratamento com rosuvastatina; G5: animais hipercolesterolêmicos, seguidos por 2 meses de dieta não hipercolesterolêmica e tratamento com rosuvastatina; G6: animais hipercolesterolêmicos, seguidos por 4 meses de dieta não hipercolesterolêmica e tratamento com rosuvastatina. O tempo de duração do experimento para cada grupo constou de: G1= 8 meses; G2= 8 meses; G3= 8 meses; G4= 5 meses; G5=6 meses e G6= 8 meses. O desenho do estudo está esquematizado na figura 1.

O medicamento utilizado para a execução desse trabalho foi a rosuvastatina (5,0mg/dia/coelho). Administrou-se o medicamento de duas formas: por acréscimo na água de beber e através de gavagem.

Diariamente, 5mg de rosuvastatina era dissolvida em 150ml de água e alternado com 15 dias na forma de gavagem, onde 5mg de rosuvastatina eram diluídas em 10ml de água, aspirados por uma seringa, conectadas a uma sonda nasogástrica N°10 e administradas aos coelhos.

Essa metodologia de administração do medicamento na água foi realizada para não lesar a laringe e o esôfago dos animais, considerando que o experimento é de longa duração e a gavagem foi utilizada periodicamente para se ter certeza da ingestão total da dose do medicamento.

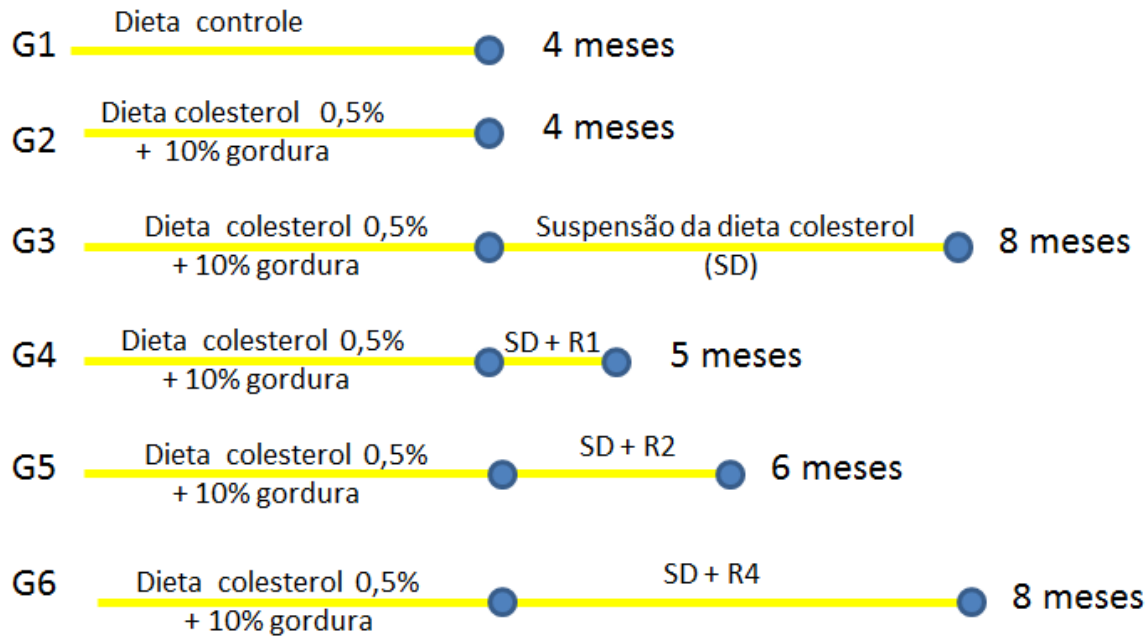


Figura 1. Esquema demonstrando divisão dos grupos, tratamento e tempo de duração de cada grupo.

3.1 COLESTEROL PLASMÁTICO E FRAÇÕES

No início do experimento coletou-se sangue via veia marginal da orelha para obter o valor do colesterol total inicial. Ao final dos experimentos, após jejum de 16h, coletou-se, novamente, o sangue por punção cardíaca. O sangue foi armazenado em tubo contendo EDTA-dissódico, para evitar coagulação e oxidação. Após tempo estipulado para cada coelho os animais foram sedados com uma mistura de 20mg/kg de xylazina + 25mg/kg de ketamina para sedar o animal e após administrado 20 mg/kg de tiopental sódico em doses letais.

A dosagem do colesterol foi determinada pelo método enzimático, cujo princípio baseia-se na hidrólise do colesterol e ésteres de colesterol que estão acopladas a uma reação de cor, monitorada a 500nm. Para 10µl de plasma foi adicionado 1 ml de reativo, incubando-se a 37°C por 5 minutos, sendo utilizado como padrão uma concentração de colesterol de 200mg/dl. Após, foi feita leitura

em espectrofotômetro (modelo Genesys 10uv da marca Spectronic, USA) no comprimento de onda de 500nm.

A dosagem dos triglicérides foi realizada usando kit enzimático, cujo princípio do método baseia-se na hidrólise que libera o glicerol o qual é demonstrado por reação de cor, com leitura a 500nm.

Utilizou-se como padrão, uma solução de glicerol, correspondente a 100 mg/dl de triglicérides.

Para 10µl de amostra adicionou-se 1ml de reativo, incubando-se a 37°C por 5 minutos.

A dosagem do HDL-c foi obtida através de *kit* enzimático, cujo princípio do método se baseia na precipitação de VLDL, LDL e quilomicrons pela reação do ácido fosfotungístico com o cloreto de magnésio. A LDL-c foi estimada pela fórmula de Friedwald.

3.2 QUANTIFICAÇÃO DO COLESTEROL TECIDUAL

O valor do colesterol tecidual foi medido pelo método de Naito e David⁽⁶⁷⁾. Inicialmente, fragmentos de aorta foram macerados e homogeneizados a 4° C em 5 ml de 0.13M tampão TRIS HCl (pH 7.4); 0.01 mM NaNO₃. Após, acrescentado clorofórmio e metanol na proporção (2:1 vol/vol) contendo 0.001% de hidroxitolueno butilado, como antioxidante. Deixado em temperatura ambiente por 24h e o sobrenadante retirado e seco em nitrogênio líquido.

3.3 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica tecidual foi medida em segmento de aorta para a verificação da quantidade de malondialdeído (MDA), segundo a técnica de

Buege⁽⁶⁸⁾. Utilizou-se o ácido tricloroacético (TCA) (1g de tecido+10vol TCA a 20%) para fazer a homogeneização e desproteinização.

Após, foi acrescentado uma mistura de TCA 25% com ácido tiobarbitúrico a 75% para identificação de MDA e aquecimento a 100° C por 20 minutos. A concentração de MDA foi medida em espectrofotômetro, comprimento de onda de 532nm e calculado através de um coeficiente de extinção molar de $1,49 \times 10^{-5,0}$ expresso em nmol/mg de tecido $\times 10^{-7,0}$ M.

3.4 FUNÇÃO ENDOTELIAL

Segmento de aorta torácica próximo ao arco aórtico, com 5mm de comprimento, foram suspensas através de 2 clips de aço, em uma cuba e a um transdutor de força. A cuba continha 6 ml de solução de Krebs Henseleit com a seguinte composição (mmol/l): NaCl, 113; KCl, 4,74; CaCl₂, 1,9; NaHCO₃, 25,0; MgSO₄, 0,44; KH₂PO₄, 1,18; EDTA, 0,03; C₆H₁₂O₆, 11,0, e aerada continuamente com 95% de O₂ a pH 7,4^(17, 34). Os resultados foram traçados no registrador de eventos fisiológicos (Registrador Narcotrace 40). A tensão basal ótima foi determinada, submetendo-se os fragmentos a diferentes tensões mecânicas e contraídos à mesma dose de noradrenalina (10^{-7} M) (Fig.2).

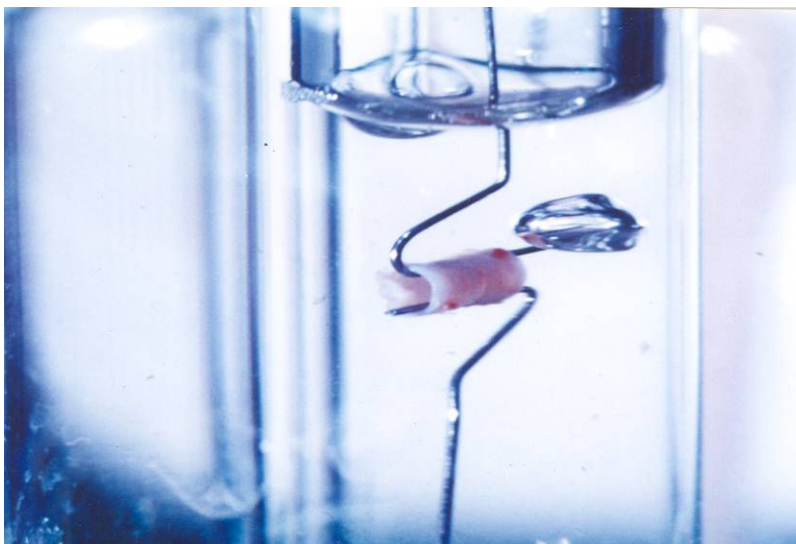


Figura 2. Segmento da aorta suspensa em cuba com solução de Krebs Henseleit e aerado com carbogênio.

A tensão basal ótima foi aquela que apresentou melhor resultado comprimento/tensão, assim como, melhor relaxamento à acetilcolina.

Os segmentos de aortas foram deixados em equilíbrio na solução de Krebs Henseleit, pelo período de 1 hora, trocando-se a solução a cada 20 minutos. Todos os anéis foram contraídos pela noradrenalina ($10^{-7}M$).

Depois que a contração alcançava um *plateau*, a acetilcolina foi acrescentada de forma cumulativa ($10^{-8,0}$ a $10^{-5,0}M$) para obter-se a curva de concentração-efeito, após o fragmento ter sido lavado diversas vezes com a solução de Krebs Henseleit. Depois de um período de 30min. os anéis de aorta foram contraídos com NE ($10^{-7,0}M$) e outras curvas de concentração-efeito obtidas com nitroprussiato para verificar a integridade da musculatura lisa da camada média arterial (Figura 3 e 4).

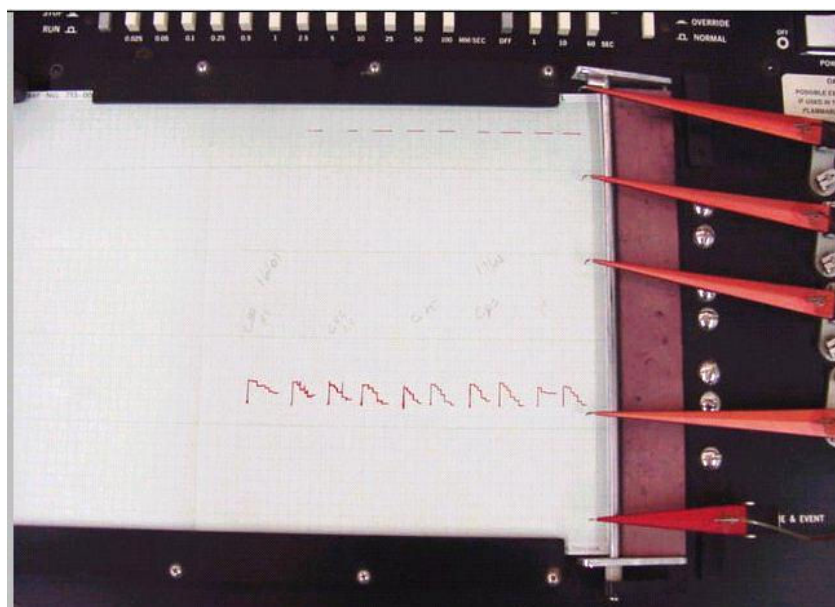


Figura 3. Registro das curvas de concentração-efeito com acetilcolina e nitroprussiato de sódio.

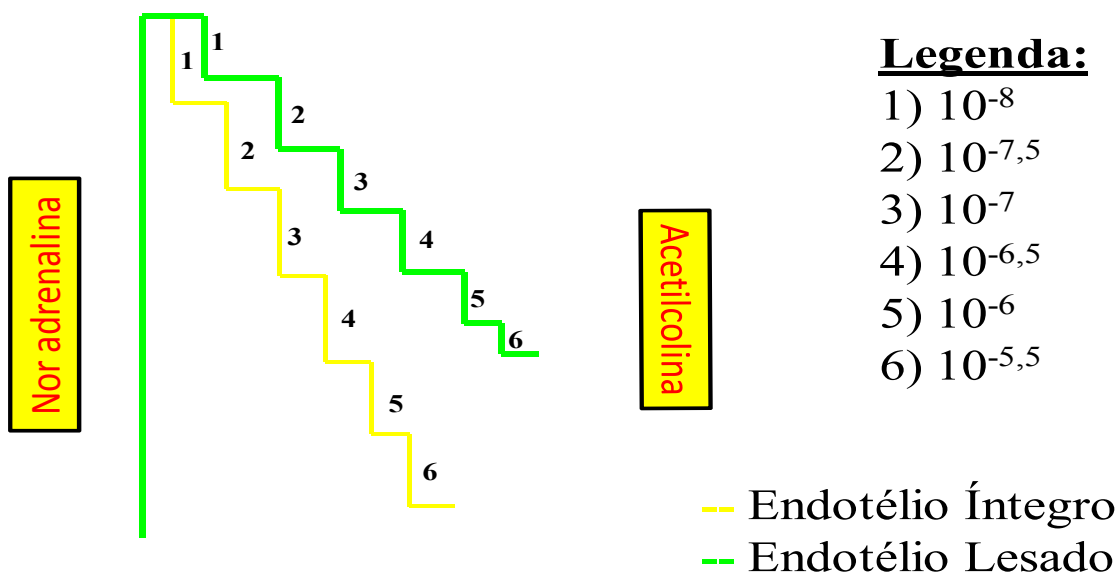


Figura 4. Representação esquemática da curva de concentração-efeito com acetilcolina em endotélio íntegro e lesado.

3.5 HISTOLOGIA

Na preparação histológica utilizou-se anéis de aorta próximo ao arco aórtico. Após, foram lavados, pré-fixados em formol a 10% por 24h em recipientes individuais e devidamente identificados. Depois os anéis foram retirados e colocados em cápsulas próprias, identificadas, fechadas e colocadas em álcool a 70% e os fragmentos foram processados com técnicas específicas, realizados cortes histológicos em micrótomo e montados em lâmina e lamínula. As colorações utilizadas foram: Hematoxilina-eosina e tricrômio de Masson.

O processamento, montagem das lâminas e as colorações foram realizados no Laboratório de Patologia Experimental do NMCE/FCM/UNICAMP, e examinadas em microscópio óptico marca Leica 300 e imagens capturadas e fotografadas para documentação.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE ATEROSCLEROSE

A aterosclerose foi monitorada macro e microscopicamente. Para documentação macroscópica, os segmentos de aorta foram obtidos entre a emergência da artéria braquial esquerda e o plano diafragmático. Em seguida, fixados em formol a 10%, à temperatura de 37°C por 16h e, após, imersos em placa de Petri com sudam IV por 24h. Após, a extensão da aterosclerose foi quantificada morfometricamente através de imagens capturadas em câmera digital (Sony mod FD 97), transferidas para o computador e submetidas ao software Scion, programa específico para cálculo de área. O mesmo foi efetuado nas lâminas histológicas.

A quantificação da aterosclerose foi expressa em (%) em relação a área total do segmento arterial.

ESTATÍSTICA

Os valores do colesterol total, HDL-c, LDL-c, triglicérides, colesterol e peroxidação lipídica teciduais, nos diferentes grupos de animais, foram examinados por teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn. Para analisar a relação entre as variáveis numéricas foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman^(69, 70). Para comparar o relaxamento entre os 6 grupos de animais e entre os tempos e doses, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas⁽⁷¹⁾. O valor de significância foi de $p < 0,05$.

Os dados foram analisados no setor de estatística da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, sendo utilizados o programa computacional SAS e *software Origin* para o estudo.

4. RESULTADOS



4.1 PESO DOS ANIMAIS

No final do experimento, os coelhos de todos os grupos ganharam peso de modo semelhante, com a dieta hipercolesterolêmica sendo bem aceita, assim como o medicamento acrescido à água. Esta foi ingerida diariamente, na quantidade de 60 a 70 ml por coelho.

Os valores, média e desvio padrão do colesterol total, HDL-c, LDL-c, triglicérides, colesterol e peroxidação lipídica teciduais, função endotelial e quantificação de aterosclerose, constam da tabela 1 e 2 estão apresentados nas figuras de 5 a 16.

Do início ao final do experimento os animais dos 6 grupos apresentaram pesos corporais similares, não havendo diferenças significativas entre os mesmos.

Tabela 1. Resultados dos parâmetros bioquímicos estudados nos grupos G1 a G6 (médias \pm DP).

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Col.total Inicial • (mg/dl)	63,63 $\pm 4,32$	860,64 $\pm 103,68$	881,16 $\pm 165,93$	793,96 $\pm 89,41$	843,83 $\pm 332,40$	810,08 $\pm 81,48$
Col. Total Final # (mg/dl)	63,63 $\pm 4,32^{\circ}$	860,64* $\&$ $\pm 103,68$	51,56 $\pm 13,42^{\circ}$	411,12* $\&$ $\pm 79,72^{\circ}$	365,07* $\&$ $\pm 65,31^{\circ}$	31,40* $\&$ $\pm 6,66^{\circ}$
LDL-c # (mg/dl)	26,57 $\pm 3,92^{\circ}$	503,87* $\&$ $\pm 25,51$	27,58 $\pm 16,91^{\circ}$	354,23* $\&$ $\pm 81,84^{\circ}$	306,49* $\&$ $\pm 63,36^{\circ}$	5,85* $\&$ $\pm 8,10^{\circ}$
HDL-c # (mg/dl)	16,47 $\pm 3,69^{\circ}$	306,06* $\&$ $\pm 77,90$	18,54 $\pm 3,11^{\circ}$	41,19* $\&$ $\pm 17,14^{\circ}$	45,65* $\&$ $\pm 5,89^{\circ}$	29,20 $\pm 13,63^{\circ}$
TG # (mg/dl)	104,17 $\&$ $\pm 16,24^{\circ}$	253,34* $\&$ $\pm 54,21$	27,19* $\pm 5,36^{\circ}$	77,41* $\&$ $\pm 22,42^{\circ}$	64,61* $\&$ $\pm 8,10^{\circ}$	30,01* $\pm 5,67^{\circ}$

Colesterol total após quatro meses de dieta hipercolesterolêmica. # Colesterol total e demais parâmetros dosados por ocasião do sacrifício dos animais. LDL-c – Lipoproteína de baixa densidade. HDL-c - Lipoproteína de alta densidade. TG – Triglicérides. Os valores são expressos como média e desvio padrão, considerando-se * $p < 0,05$ em relação a G1, $^{\circ} p < 0,05$ em relação a G2 e $\& p < 0,05$ em relação a G3

Tabela 2. Resultados dos parâmetros teciduais nos Grupos G1 a G6

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Col. Tec. # (mg/g)	21,64 $\pm 4,89^{\circ}$	138,82* $\&$ $\pm 19,03$	50,47 $\pm 5,58^{\circ}$	156,42* $\&$ $\pm 28,28$	93,58* $\&$ $\pm 25,28^{\circ}$	34,29 $\pm 35,92^{\circ}$
Per. Tec # (nmol/g)	5,06 $\&$ $\pm 0,62^{\circ}$	9,14* $\pm 1,48$	8,40* $\pm 2,01$	7,58* $\pm 1,41$	8,70* $\pm 0,86$	5,67 $\&$ $\pm 0,97^{\circ}$
Ateros # (%)	0% $^{\circ}$ $\&$	36,73* $\pm 14,53$	42,66* $\pm 31,86$	46,21* $\pm 21,76$	26,69* $\pm 17,26$	18,23* $\&$ $\pm 1,90^{\circ}$
Relax (%) #	93,19* $\&$ $\pm 6,73^{\circ}$	0%*	10,0* ± 10	41,56* $\&$ $\pm 38,46^{\circ}$	38,76* $\&$ $\pm 23,99^{\circ}$	71,54* $\&$ $\pm 12,72^{\circ}$

Col. Tec. – Colesterol tecidual na aorta. Per. Tec. - Peroxidação Lipídica Tecidual. Ateros - Aterosclerose na aorta. Relax - Relaxamento máximo dependente do endotélio.

Os valores são expressos como média e desvio padrão, considerando-se * $p < 0,05$ em relação a G1, $^{\circ} p < 0,05$ em relação a G2 e $\& p < 0,05$ em relação a G3

4.1 LIPÍDES PLASMÁTICOS

4.1.1 Colesterol total

Em relação ao colesterol total final obtiveram-se os resultados que estão apresentados na tabela 1 e Figura 5. O grupo G2 apresentou elevação do colesterol total significativamente em relação aos demais grupos. O grupo G3 não apresentou diferença significativa em relação ao grupo G1. O grupo G6 apresentou redução significativa em relação aos grupos G1-G5.

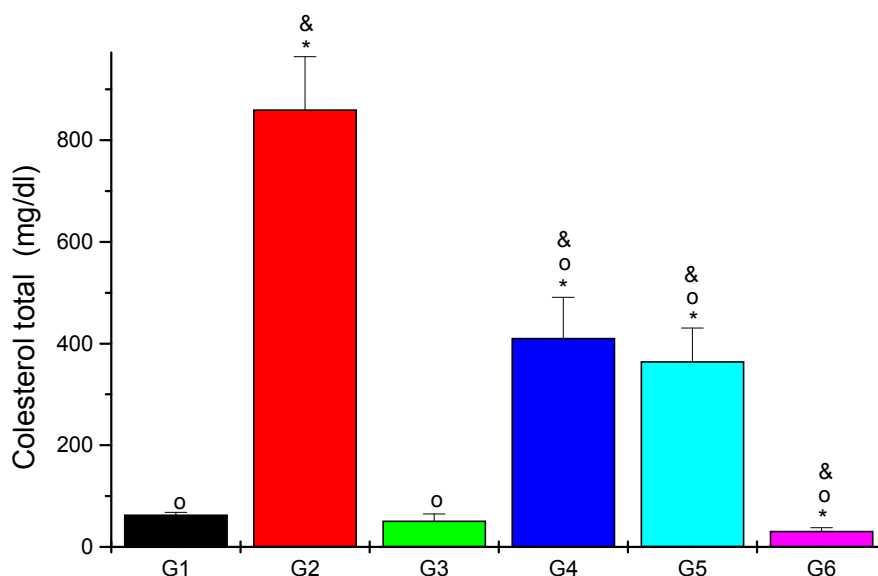


Figura 5. Colesterol total nos 6 grupos: Os valores são expressos como média e desvio padrão, considerando-se ° $p < 0,05$ em relação a G1, ° $p < 0,05$ em relação a G2 e & $p < 0,05$ em relação a G3.

4.1.2 LDL-Colesterol

A LDL-c, apresentou valor significativamente maior no grupo G2 em relação a todos os outros grupos. No grupo G3 a LDL-c apresentou valor

significativamente menor em relação aos grupos G4-G5. Não houve diferença significativa entre valor da LDL-c do grupo G3 com o grupo G1. Os grupos G4 e G5, tratados com rosuvastatina, tiveram LDL-c semelhantes, não havendo diferença significativa. No grupo G6, tratado com rosuvastatina por 4 meses, a LDL-c apresentou valor significativamente menor em relação aos grupos G1- G5 (Figura 6).

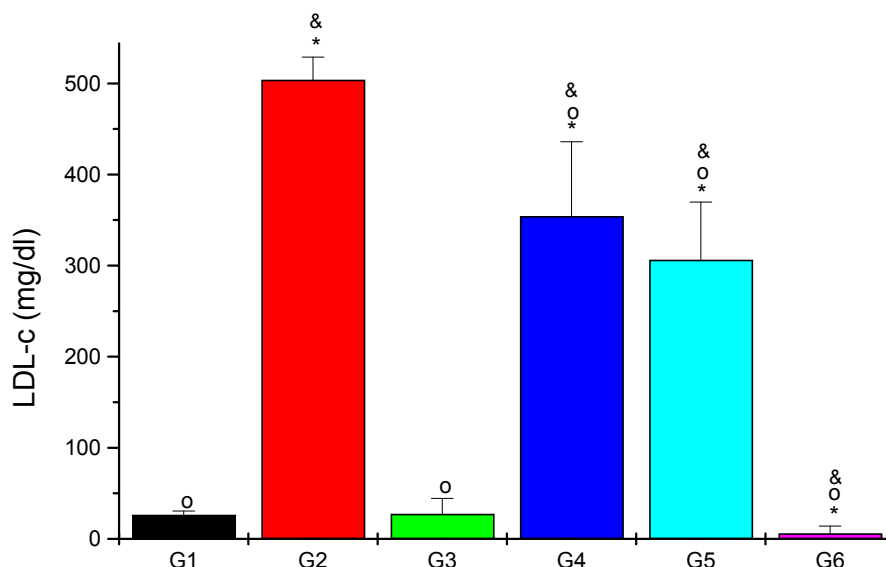


Figura 6. LDL-c nos 6 grupos: Os valores são expressos em media e desvio padrão, considerando-se *p<0,05 em relação a G1, ° p<0,05 em relação a G2 e & p<0,05 em relação a G3.

4.1.3 HDL-Colesterol

A HDL-c apresentou valor significativamente maior no grupo G2 em relação a todos os outros grupos.

No grupo G3 o valor atingiu os níveis dos grupos G1 e grupo G6 não havendo diferença estatística significativa.

No grupo G6 a HDL-c apresentou valor significativamente menor em relação aos grupos G4 e G5 (Figura 7).

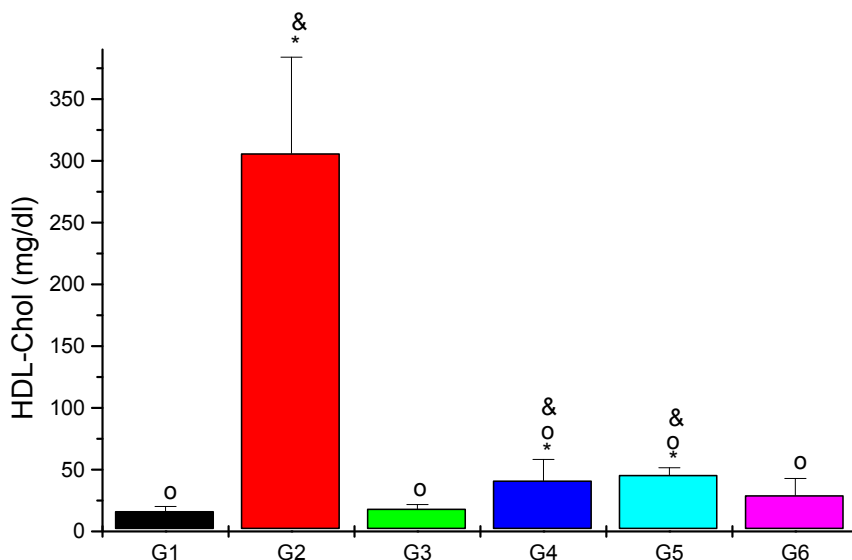


Figura 7. HDL-c nos 6 grupos: Os valores são expressos em média e desvio padrão, considerando-se * $p < 0,05$ em relação a G1, ° $p < 0,05$ em relação a G2 e & $p < 0,05$ em relação a G3.

4.1.4 Triglicérides

Os triglicérides apresentaram valores significativamente aumentados no grupo G2 em relação a todos os outros.

Os valores dos triglicérides no grupo G3 foram significativamente menores em relação aos grupos G1-G5.

Não houve diferença significante do grupo G3 em relação aos grupo G6.

Os níveis de triglicérides foram semelhantes nos grupos G4 e G5 e significativamente maior em relação ao grupo G6 (Figura 8).

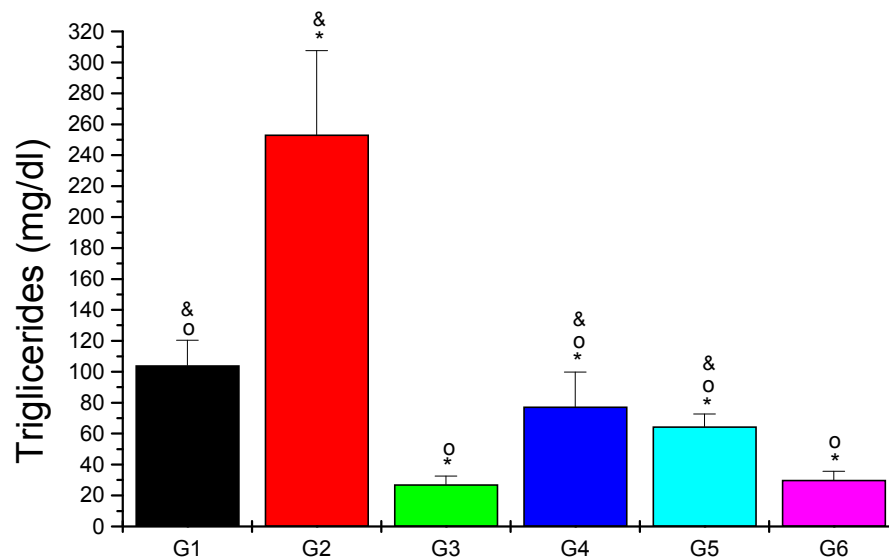


Figura 8. Triglicérides nos 6 grupos: Os valores são expressos em média e desvio padrão, considerando-se * $p < 0,05$ em relação a G1, ° $p < 0,05$ em relação a G2 e & $p < 0,05$ em relação a G3.

4.2 COLESTEROL TECIDUAL

O valor do colesterol tecidual foi significativamente maior no grupo G2 em relação aos grupos G1, G3, G5 e G6 e em relação ao grupo G4, no qual os animais foram tratados com rosuvastatina por apenas um mês, não houve diferença significativa.

No grupo G3 o valor do colesterol tecidual foi significativamente maior que no G1 e G6 e menor significativamente, em relação ao grupo G4 e G5.

Os animais do grupo G6 apresentaram colesterol tecidual menor significativamente, em relação aos grupos G2-G5, não havendo diferença significativa com o grupo G1 (Figura 9).

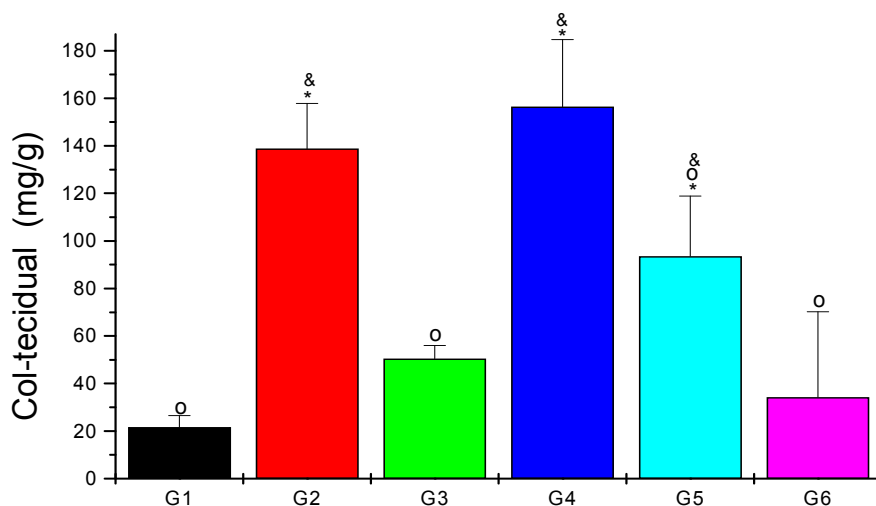


Figura 9. Colesterol tecidual nos 6 grupos: Os valores são expressos como média e desvio padrão. Considerando-se * $p < 0,05$ em relação a G1, ° $p < 0,05$ em relação a G2 e & $p < 0,05$ em relação a G3.

4.3 PEROXIDAÇÃO LÍPIDICA TECIDUAL

Os valores da peroxidação lipídica tecidual foram maiores significativamente, no grupo G2 em relação aos grupos G1 e G6, não havendo diferença estatística significativa com os grupos G3-G5.

Os valores do grupo G3 foram semelhantes aos grupos G2, G4 e G5, sendo maiores significativamente em relação aos grupos G1 e G6. Os animais do grupo G6 apresentaram peroxidação lipídica menor, significativamente, em relação aos grupos G2-G5 e não significativa em relação ao grupo G1 (Figura 10).

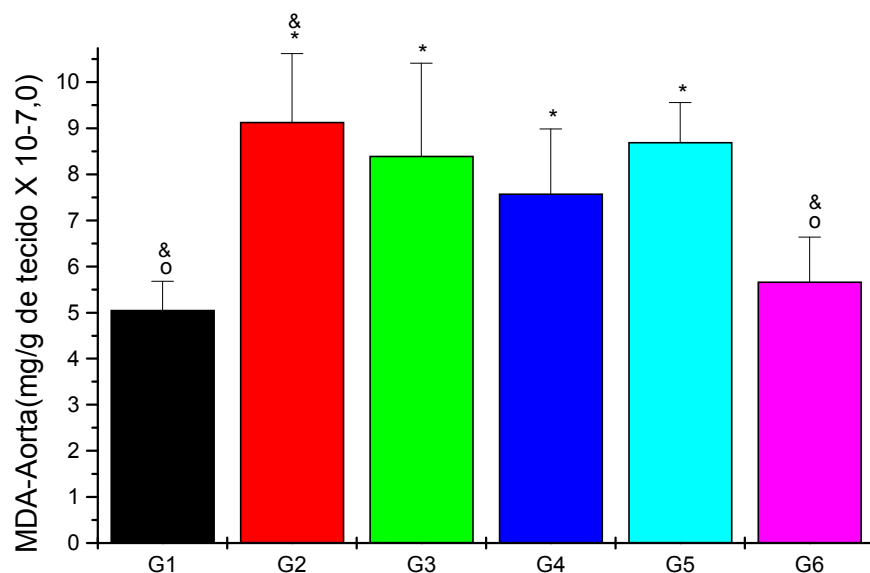


Figura 10. Peroxidação lipídica nos 6 grupos: Os valores são expressos como média e desvio padrão, considerando-se * $p < 0,05$ em relação a G1, ° $p < 0,05$ em relação a G2 e & $p < 0,05$ em relação a G3.

4.4 QUANTIDADE DE ATEROSCLEROSE NA AORTA

Os grupos G2-G6 apresentaram maior quantidade de aterosclerose na aorta, significativamente, em relação ao grupo G1.

A quantidade de aterosclerose na aorta, no grupo G2, foi maior significativamente em relação aos grupos G5 e G6.

No grupo G3 a aterosclerose foi maior significativamente em relação ao grupo G6.

A aterosclerose da aorta foi menor significativamente, no grupo G6 em relação aos grupos G2-G5 (Figura 11).

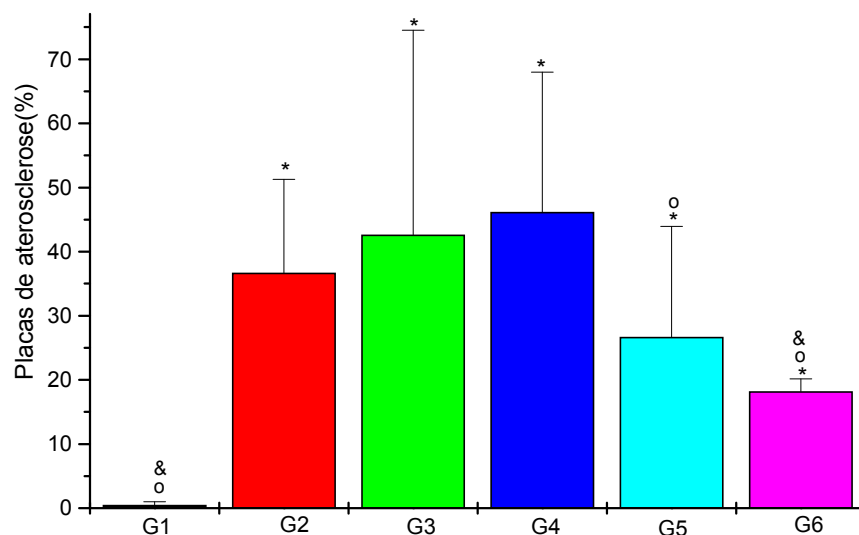


Figura 11. Quantificação da aterosclerose nos 6 grupos: Os valores são expressos como média e desvio padrão, considerando-se * $p < 0,05$ em relação a G1, ° $p < 0,05$ em relação a G2 e & $p < 0,05$ em relação a G3.

4.4.1 Macroscopia e microscopia da aorta

A Figura 12 apresenta a macroscopia da aorta de um dos animais dos grupos G1 a G6.

No grupo G1 a aorta apresenta superfície intimal completamente lisa o que não acontece nos demais grupos, na mesma intensidade.

Nos grupos G2 e G3, observa-se placas extensas de aterosclerose.

Nota-se a redução progressiva das placas nos grupos G4 a G6.

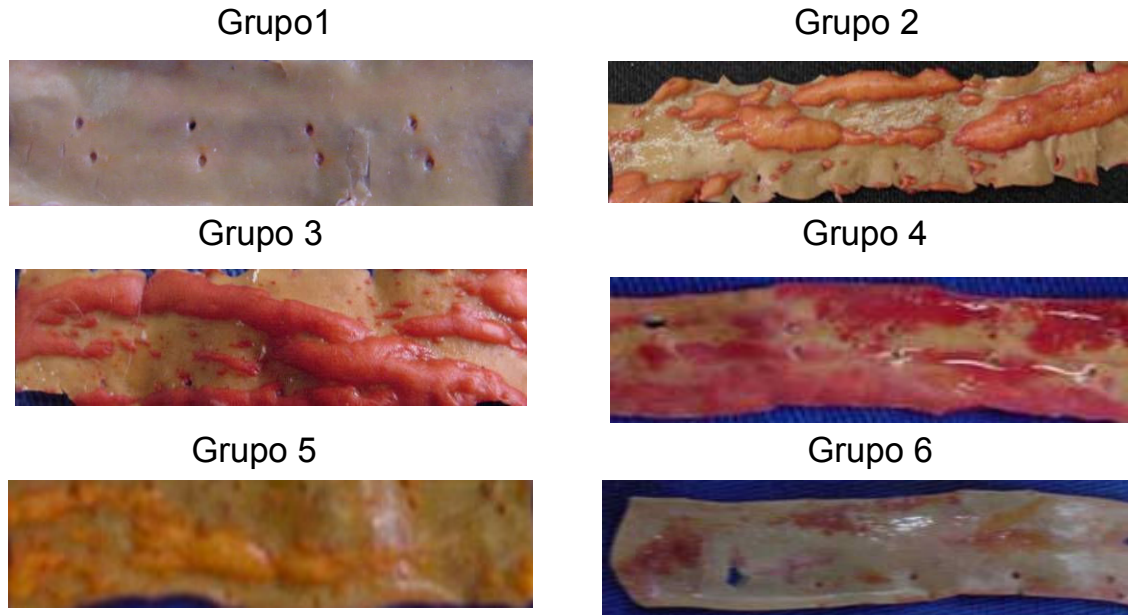


Figura 12. Macroscopia das aortas nos grupos 1 a 6, coradas com Sudam IV vistas pela superfície intimal, demonstrando a aterosclerose, em menor intensidade no grupo 6.

Na Figura 13 observa-se a microscopia da aorta de um dos animais dos grupos G1 a G6. No grupo G1 a superfície intimal apresenta-se homogeneamente lisa, sem qualquer espessamento, o que não acontece nos Grupos G2 e G3. Nestes animais dos grupos G2 e G3 a superfície intimal é irregular, por deposição heterogênea de gordura, sobre a forma de cristais de colesterol, células inflamatórias e fibrose. Nota-se a redução progressiva destes componentes a partir do grupo G4. O pequeno aumento (2,5X) não permite identificar cada um destes elementos histológicos na figura, o que foi feito pormenorizadamente em cada animal até a capacidade máxima do microscópio.

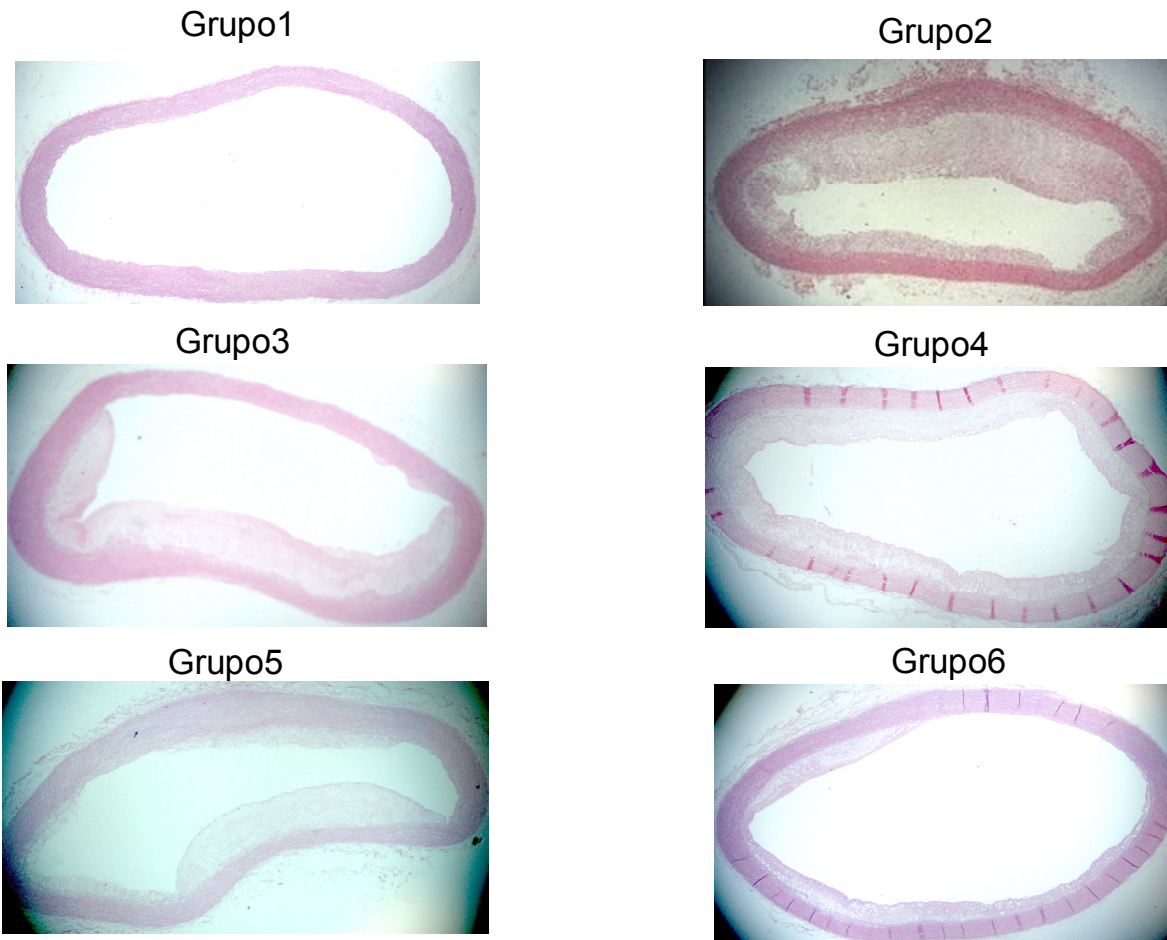


Figura 13. Microscopia das aortas nos grupos 1 a 6, aumento 2,5x, coradas pela Hematoxilina/Eosina, demonstrando o espessamento intimal, secundário a aterosclerose, salientando o menor grau de acometimento no grupo 6.

Na figura 14 estão apresentados os exemplos microscópicos da figura 13 em maior aumento (X10), pormenorizando os aspectos da deposição lipídica.

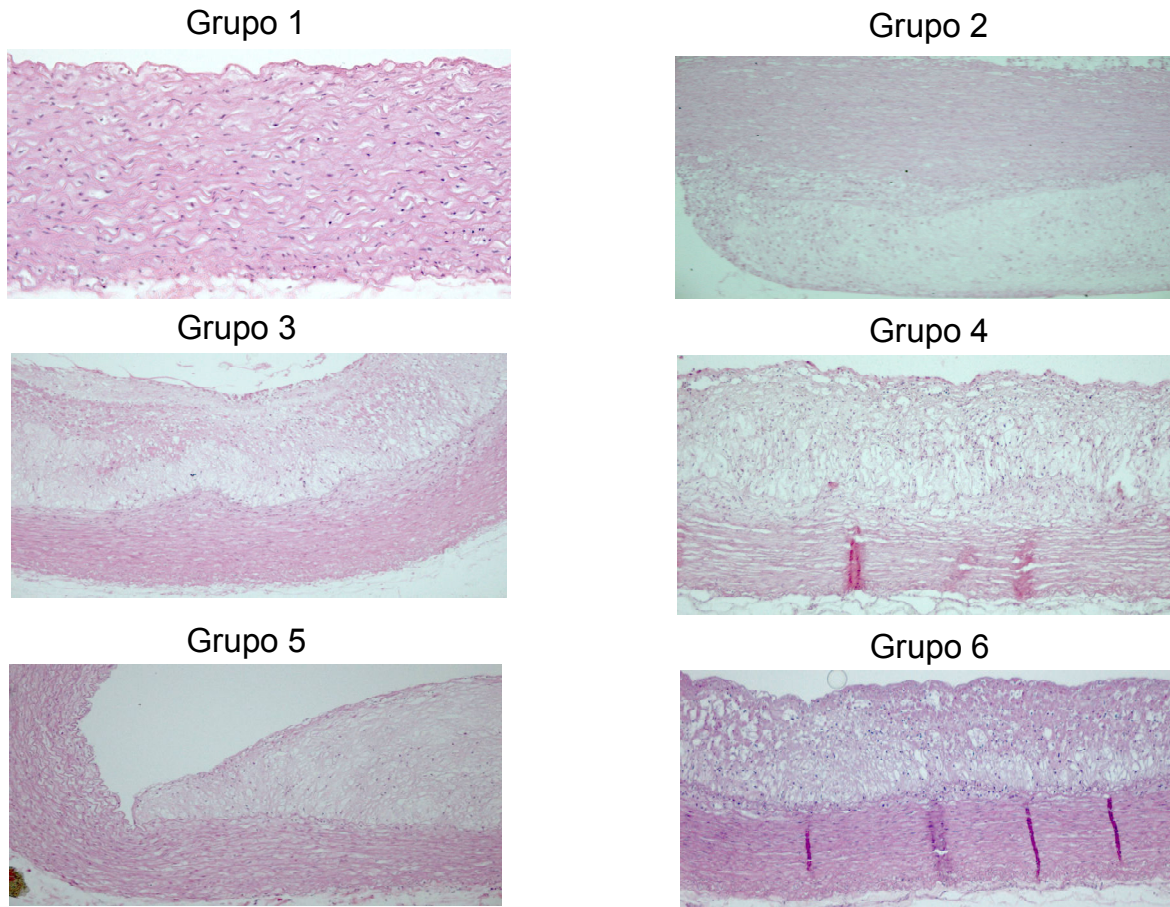


Figura 14. Microscopia das aortas nos grupos 1-6, aumento 10x, coradas pela Hematoxilina/Eosina, demonstrando o espessamento intimal, secundário a aterosclerose, salientando a constituição da placa, na qual predomina colesterol extracelular nos grupos 2, 4 e 5. Nos grupos 3 e 6 já ocorre a presença de tecido colágeno.

4.5 FUNÇÃO ENDOTELIAL

A função endotelial de todos os grupos está representada na figura 15 e na figura 16 está representada a ação do nitroprussiato sobre a musculatura lisa.

A função endotelial foi significativamente menor nos grupos G2 a G6 em relação ao grupo G1.

A função endotelial foi significativamente menor no grupo G3 em relação aos grupos G4, G5 e G6.

Não houve diferença significativamente entre os valores da função endotelial nos grupos G4 e G5.

Nos grupos G4 e G6 os valores da função endotelial significativamente maior em relação aos grupos G2 e G3.

O grupo G6 apresentou, valor da função endotelial significativamente maior em relação aos grupos G4 e G5.

Os resultados não significativos observados na ação do nitroprussiato de sódio em todos os grupos demonstra que a musculatura lisa não foi afetada em função da dieta hipercolesterolêmica e ação da rosuvastatina.

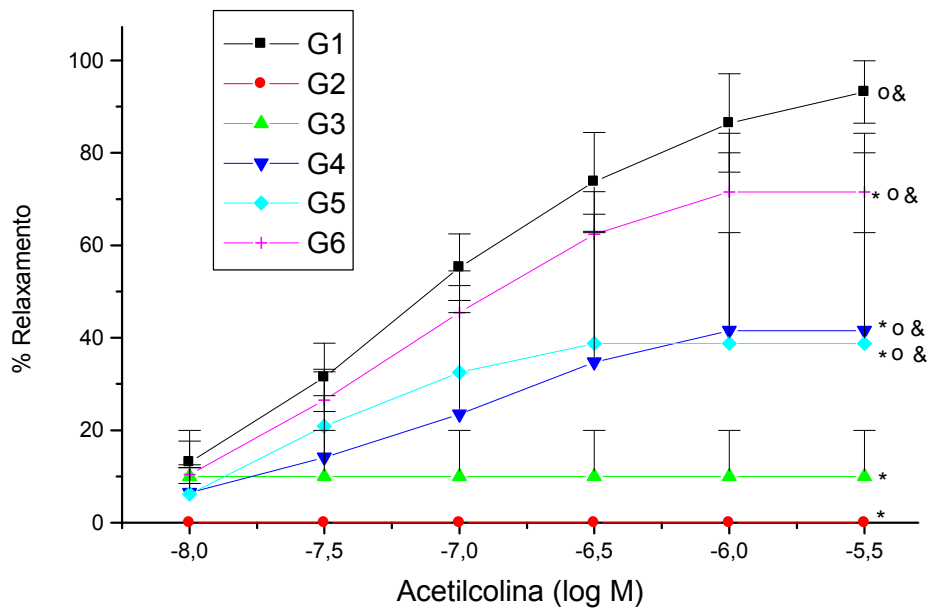


Figura 15. Resultados da função endotelial nos 6 grupos, considerando * $p < 0,05$ em relação a G1, ° $p < 0,05$ em relação a G2 e & $p < 0,05$ em relação a G3.

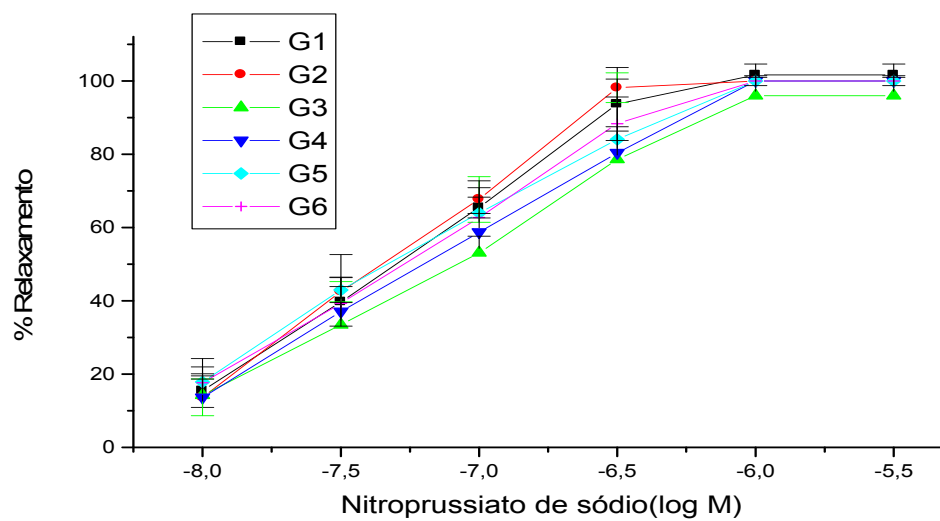


Figura 16. Resultados da ação do nitroprussiato de sódio. Demonstrando que não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

5. DISCUSSÃO



A utilização de dietas para manter o bom funcionamento do organismo não é uma recomendação recente, sendo uma prática desde que o cardiologista Even E. H. Ahrens Jr, um dos pioneiros em pesquisa clínica, comprovou que a dieta tem efeito no aumento ou diminuição do colesterol e é imprescindível manter uma dieta equilibrada⁽⁵³⁾.

No presente estudo observou-se que a dieta hipercolesterolêmica oferecida aos animais no período de 4 meses foi suficiente para gerar aumento significativo do colesterol total, triglicérides, HDL-c e LDL-c, confirmando que o coelho é um dos animais mais suscetíveis à indução de hipercolesterolemia através de dieta. Também, é considerado como modelo apropriado para o estudo da aterosclerose por responder rapidamente à indução da dieta hipercolesterolêmica e apresentar vários tipos de lesões⁽⁷²⁾. A hipercolesterolemia e suas complicações têm sido relatadas ocorrendo em várias concentrações de colesterol na dieta. Assim, Kolodgie et al.⁽⁷³⁾ estudaram várias concentrações de colesterol: 0,05%, 0,10%, 0,15%, 0,20% e 0,25% na dieta por um período de 32 semanas e constataram que ocorreu aumento do colesterol, peroxidação lipídica, disfunção endotelial máxima e aterosclerose grave na aorta em concentrações maiores de colesterol na dieta (>0,15%), como os achados do presente estudo. Jayakody⁽⁷⁴⁾, confirmaram que ocorre disfunção endotelial, aumento de lípidos plasmáticos e colesterol da aorta em coelhos alimentados com dieta enriquecida por colesterol a 2%, por um período de 6 semanas.

Os resultados do presente estudo demonstram que as elevações lipídicas no plasma, principalmente colesterol total e LDL-c, acompanham os fenômenos ocorridos na parede arterial, verificando-se aumento do colesterol tecidual, da peroxidação lipídica, disfunção endotelial e o desenvolvimento da aterosclerose. Tais fatos têm sido mostrados ocorrer precocemente neste sentido⁽⁶²⁾ e, demonstrado pelos resultados do estudo em discussão, continuar-se durante a manutenção prolongada da dieta e até após a suspensão. Oubina *et al.*⁽⁷⁵⁾, trataram coelhos com dieta enriquecida com colesterol a 1%, por 12 semanas, e

estudou o efeito dos marcadores inflamatórios, balanço fibrinolítico, função endotelial e placas de aterosclerose e concluíram que ocorre aumento de interleucina 1 β , interleucina 6, proteína C reativa, piora na função endotelial e presença de placas de aterosclerose. Prasad^(76, 77)], tratando coelhos hipercolesterolêmicos por um período de 8 semanas com dieta a 0,25% e 0,5%, respectivamente, estudou a peroxidação lipídica e a aterosclerose. Em ambos encontrou aumento como os resultados do presente trabalho.

Assim, a concentração de colesterol utilizada para desencadear dislipidemia experimental é bastante variada na literatura, sendo a que foi utilizada no presente estudo (0,5%), adequada para esta finalidade. O mesmo pode se dizer para o período de utilização da dieta, que variou de 6 semanas^(74, 78) até 32 semanas⁽⁷³⁾, ocorrendo o mesmo para os períodos de suspensão (3 a 32 semanas), não havendo padronização para esta finalidade. Assim, o período de 16 semanas para a indução de aterosclerose e o mesmo para suspensão da dieta no presente estudo está entre aqueles utilizados na literatura, sendo adequados a este tipo de observação.

Tempo inferior de observação após a suspensão da dieta (3 semanas), correspondendo à metade daquele utilizado para a dieta hipercolesterolêmica foi utilizado por Tsantila *et al.*⁽⁷⁸⁾, havendo redução dos lípides plasmáticos.

No desenho do presente estudo identificou-se o grupo G3 como tendo intervenção apenas no estilo de vida e nos demais G4, G5 e G6 o uso de uma estratégia terapêutica, atualmente, utilizada como a mais eficiente na redução do colesterol total e LDL-c, ou seja, o tratamento com estatinas, no caso a rosuvastatina.

Nos coelhos do grupo G3, apenas com a suspensão da dieta hipercolesterolêmica, os valores de colesterol total, LDL-c, HDL-c, TG (figuras 5, 6, 7 e 8) reduziram-se a aqueles do grupo controle G1.

Estes resultados são coerentes com os achados de Jayakody *et al.*,⁽⁷⁴⁾ que trataram coelhos com ração enriquecida com colesterol a 2%, por 6 semanas,

com retorno à ração sem colesterol, por períodos de 14 e 32 semanas, e observaram que o colesterol total e triglicérides voltaram aos níveis iniciais.

Prasad^(76, 77) em estudo semelhante utilizou colesterol a 0,25% e 0,5% por 8 semanas e suspensão da dieta por 16 semanas, também, demonstraram ocorrer diminuição dos lípides plasmáticos e, mais recentemente, Tsantila *et al.*⁽⁷⁸⁾, utilizando ração enriquecida com colesterol a 1%, por 6 semanas e regressão por 3 semanas, encontraram resultados semelhantes em relação aos lípides plasmáticos.

A diminuição do colesterol tecidual (figura 9) ocorreu nos coelhos do grupo G3, porém não chegou aos valores normais do grupo G1, mantendo-se elevado significativamente.

Isto demonstra que o metabolismo tecidual não acompanha paralelamente as alterações lipídicas ocorridas no plasma, espontaneamente, com a suspensão da dieta. Almeida *et al.*⁽⁶⁶⁾ verificaram este fato ao estudar o aumento progressivo dos lípides em coelhos com dislipidemia mista induzida por dieta. Os coelhos foram alimentados com dieta enriquecida com colesterol a 0,5% e separados por elevações graduais do colesterol total de 100 a 1000 mg/dl, com intervalo de 100mg, verificando que os parâmetros teciduais: colesterol, peroxidação lipídica e disfunção endotelial não aumentaram progressivamente como os níveis plasmáticos. Os autores interpretaram os resultados considerando que o transporte das LDL-c para o interior da parede arterial depende de mecanismos reguláveis e não reguláveis como receptores de membrana, pinocitose, filtração através de lacunas paracelulares ou difusão por canais transendoteliais e devem atuar como regulador protegendo a parede vascular contra valores críticos do colesterol tecidual.

A peroxidação lipídica no grupo G3 não diminuiu aos níveis do grupo G1, mantendo-se como no grupo G2, hipercolesterolêmico. Esse resultado demonstra que pode existir relação de peroxidação lipídica tecidual com os níveis de colesterol tecidual. Assim, Ribeiro Jorge *et al.*⁽⁵⁰⁾, estudaram a reversão rápida

da disfunção endotelial em coelhos hipercolesterolêmicos. Os autores observaram que o aumento da peroxidação lipídica e do colesterol tecidual ocorre paralelamente e foram considerados os responsáveis pela disfunção endotelial encontrada.

Portanto, os resultados encontrados demonstram que mesmo com os lípides plasmáticos em níveis normais, a intensidade do colesterol tecidual é capaz de continuar a produzir espécies reativas de oxigênio, contribuindo para manter o estado aterogênico na parede arterial.

Os resultados observados na tabela 2 e figuras 9, 10 e 11, demonstram que a quantidade de aterosclerose neste grupo G3 foi semelhante ao grupo G2, hipercolesterolêmico.

Outros relatos na literatura também encontraram a manutenção da aterosclerose após essa suspensão, não se constatando diminuição de concentração de colesterol tecidual⁽⁷⁹⁾.

Entretanto, demonstrou também aumento da quantidade de células musculares lisas e a manutenção do tamanho das placas de aterosclerose, mesmo após 72 semanas de suspensão da dieta.

Assim, é possível que o *clearance* de remoção do colesterol tecidual da íntima arterial não seja suficientemente rápido para, no tempo de observação, determinar o retorno aos níveis do controle normal.

O fato de ter havido redução significativa do colesterol tecidual em relação ao grupo G2, pode contribuir para a impressão, de que se necessitaria maior tempo de observação após a suspensão da dieta hipercolesterolêmica, para se atingir os níveis de colesterol tecidual do Grupo G1.

No entanto, em estudo recente, Riedmuller *et al.*⁽⁸⁰⁾, induziram aterosclerose utilizando 2,0% de colesterol na dieta por um período de 6 semanas e estudaram os coelhos em períodos variáveis de 15 até 78 semanas. Após a suspensão da dieta hipercolesterolêmica, verificaram a progressão e regressão da

aterosclerose e a composição da placa. Verificaram que houve modificação nos componentes desta, caracterizada por diminuição da densidade de macrófagos, diminuição gradual de colesterol da aorta, ocorrência de apoptose e aumento das células musculares lisas. Os autores observaram resultados semelhantes aos do presente estudo em relação a quantidade de colesterol tecidual, que reduziu significativamente aos grupos G2, hipercolesterolêmico, mas se manteve bem acima do grupo controle G1, nunca hipercolesterolêmico, em valores 2,3 vezes maior. O fato de Riedmuller *et al.*⁽⁸⁰⁾, terem observado este fato até 1 ano e meio (78 semanas) após a suspensão da dieta, contradiz a hipótese de que o tempo de observação no presente estudo teria sido insuficiente para este fim.

Assim, é possível que muito mais tempo após a suspensão da dieta seja necessário para a normalização do colesterol tecidual ou, então, que nunca ocorra o retorno aos parâmetros dos animais controle, não hipercolesterolêmicos. Não se encontrou na literatura explicações para este fato, a não ser os dados gerais hipotéticos de Almeida *et al.*⁽⁶⁶⁾. Outro fator a ser responsabilizado pela manutenção da aterosclerose após suspensão da dieta hipercolesterolêmica no grupo G3 seria a incapacidade dos mecanismos antioxidantes de inativar o *stress* oxidativo.

Prasad^(76, 77) verificou que no grupo regressão ocorreu aumento da atividade antioxidante e aumento do *stress* oxidativo e considerou que esses fatores foram responsáveis pela não diminuição da placa de aterosclerose. O processo aterosclerótico continuaria, mesmo após suspensão da dieta, porque não ocorre diminuição de colesterol na parede arterial apesar da diminuição dos lípides plasmáticos.

Tsantila *et al.*⁽⁷⁸⁾, somente comentaram que retirando a dieta não ocorre diminuição da placa e que esses resultados são coerentes com outros autores.

A disfunção endotelial (Figura 15) observada no G3 foi intensa como no grupo G2, acompanhando os fenômenos ocorridos na parede arterial, demonstrando sua dependência do colesterol tecidual e oxidação lipídica, como já

demonstrado^(66, 81). Outros autores, como Jayakody⁽⁷⁴⁾, em estudo semelhante, porém com tempos mais longos de observação, após a retirada da dieta hipercolesterolêmica, encontraram resultados semelhantes.

Os autores explicam tal fato devido à continuidade do processo aterosclerótico que diminui os receptores de cálcio que estão associados com aterogênese^(82, 83), trataram coelhos hipercolesterolêmicos com seqüestradores de cálcio e demonstraram que os animais tratados tinham diminuição de cálcio intracelular e, conseqüentemente, menor quantidade de placas, porém sem alteração na concentração de colesterol total.

Quanto à manutenção dos níveis de colesterol tecidual e oxidação lipídica na parede é responsável por esta disfunção endotelial ou se esta disfunção seria a responsável pela não redução dos 2 primeiros eventos ainda não foi abordado pelos estudos encontrados na literatura^(77, 78), estando o assunto em aberto. Outros mecanismos responsáveis pela aterogênese podem estar envolvidos e até serem desencadeados pela oxidação lipídica e disfunção endotelial.

Neste sentido, o papel do cálcio precisa ser definido, pois já se demonstrou que o aumento intracelular deste ocorre em toda lesão tecidual e a aterosclerose não se constitui em exceção haja vista o encontro de quantidades variáveis de placas ateroscleróticas calcificadas⁽⁸³⁾.

Associada a estes dados encontram-se as evidências de que os bloqueadores de cálcio reduzem a intensidade de aterosclerose experimental por dieta hipercolesterolêmica⁽⁸²⁾.

Analisando os lipídes plasmáticos (Figuras 5, 6, 7 e 8) verificou-se que nos grupos tratados com rosuvastatina G4, G5 e G6, estes diminuíram progressivamente, sendo que no grupo G6 retornou aos padrões do grupo G1. Verificou-se que o acréscimo da estatina à interrupção da dieta hipercolesterolêmica reduziu os níveis dos lipídes plasmáticos abaixo do normal, significativamente, nos animais do grupo G6, comprovando, novamente, que as estatinas são eficientes em diminuir o colesterol total, LDL-c, triglicérides e

umentar o HDL-c. Todavia, não se encontrou na literatura artigos referentes a tratamento de aterosclerose e rosuvastatina especificamente em coelhos.

Assim, não se têm estudos experimentais com o mesmo modelo animal para que os dados sejam comparados.

No entanto, em camundongos deficientes em receptor de LDL (LDL-r), Guo *et al.*⁽⁸⁴⁾ estudaram a hipercolesterolemia induzida por dieta com colesterol a 1,25% e dividiram os animais em 2 grupos: um grupo hipercolesterolêmico e outro acrescido de rosuvastatina. Ao final do estudo verificaram os parâmetros bioquímicos, oxidação de LDL-c, aterosclerose e concentração de colágeno, concluindo que a rosuvastatina, melhorou a oxidação de LDL-c e diminuiu as placas de aterosclerose, interpretando os resultados como consequência aos efeitos redutores de colesterol e aqueles pleiotrópicos já conferidos às estatinas.

Comparando os resultados obtidos neste estudo com os de Guo *et al.*⁽⁸⁴⁾, verificou-se que os coelhos da raça Nova Zelândia utilizados no presente estudo apresentaram resultados semelhantes em relação à melhora nos parâmetros bioquímicos e na aterosclerose, constituindo-se em um modelo a ser usado frente a esta nova estatina.

Enomoto *et al.*⁽⁸⁵⁾ estudaram a ação da rosuvastatina na apoptose, célula endotelial e redução da formação de lesões ateroscleróticas em camundongos deficientes em ApoE (20mg/kg/dia por 24 semanas) e demonstraram que não houve alteração nos lipídes plasmáticos; porém, ocorreu melhora nas células endoteliais da aorta comprovado por imuno-histoquímica, através de anticorpo monoclonal Anti-CD31. A coloração com sudan IV demonstrou que ocorreu diminuição de placas de aterosclerose e ocorreu aumento de colágeno e diminuição da infiltração de macrófagos.

No presente estudo, também, verificou-se redução da aterosclerose, devido à redução do colesterol tecidual e diminuição do processo oxidativo.

Comparando os resultados dos parâmetros bioquímicos nos coelhos do grupo G2 e G3 com os grupos tratados com rosuvastatina, verificou-se que os

valores melhoraram progressivamente em relação ao grupo G2 e igualou-se ao grupo G3, sendo que no grupo G6 tratado por 4 meses houve melhora acentuada em relação ao G1.

Os resultados demonstram a relação temporal dos resultados do tratamento com rosuvastatina. Isto tem sido verificado em humanos hipercolesterolêmicos, também, com a dose do medicamento, sendo que melhores resultados são observados quando são utilizados doses maiores em tempo mais prolongado⁽⁴⁶⁾.

O mesmo aconteceu com o colesterol tecidual, observando-se redução progressiva nos grupos G4, G5 e G6, sendo que apenas neste último, alcançou os níveis do grupo G1 (Tabela 2 e Figura 9).

No entanto, para a peroxidação lipídica tecidual não houve modificações significantes nos grupos G4 e G5 em relação aos grupos G2 e G3. Já no grupo G6 houve redução significativa, praticamente igualando-se aos resultados do grupo G1. Embora não discuta a estreita relação entre o conteúdo de colesterol tecidual e oxidação lipídica na parede arterial esta não ocorreu proporcionalmente à redução da primeira. Os resultados do grupo G6 demonstraram que o colesterol tecidual deve ser reduzido aos parâmetros do grupo G1, normal, para que a oxidação lipídica diminua significativamente.

Assim, parece demonstrado neste sentido, que o efeito da estatina na oxidação lipídica está intimamente associada a sua ação hipolipemiante, uma vez que isto ocorreu apenas com valores muito baixos de colesterol total, LDL-c e colesterol tecidual, observados no grupo G6.

Como já salientado anteriormente, é creditado às estatinas efeitos pleiotrópicos independentes da redução de colesterol⁽³⁴⁾, o que pode ser colocado em discussão pelos resultados aqui apresentados. Também, para o nosso conhecimento, é a primeira vez que se demonstra em um mesmo trabalho a sequência temporal da relação colesterol e oxidação lipídica teciduais com os parâmetros bioquímicos plasmáticos.

Os mecanismos conhecidos de transporte reverso do colesterol, mediados por HDL, retroendocitose e difusão passiva de colesterol livre^(86,87) não parecem ser suficientes para reduzir o colesterol e peroxidação lipídica tecidual a não ser em situações de quantidade de lípides plasmáticos muito baixas, como ocorreu no grupo G6.

Do ponto de vista prático, a estatina contribuiu neste sentido e confirma as diretrizes atuais que orientam a redução máxima do colesterol total e, principalmente LDL-c, para se alcançar diminuição significativa de eventos clínicos⁽⁸⁸⁾.

Fenômenos semelhantes ocorreram com a função endotelial e a quantidade de aterosclerose (tabela 2, figuras 15 e 11). A partir do grupo G4, houve redução da disfunção endotelial e alcançou seu máximo no grupo G6, assim como a redução da quantidade de aterosclerose, embora não alcançassem os níveis do grupo G1, coelhos não hipercolesterolêmicos. Estes resultados demonstraram a relação linear entre a diminuição do colesterol total, LDL-c plasmáticos com os fenômenos parietais. Restaria às estatinas apenas a função de acelerar tal processo, independentemente dos efeitos pleiotrópicos destes fármacos? Os resultados permitem inferir tal assertiva.

No entanto, analisando a melhora da disfunção endotelial e redução da aterosclerose no grupo G4, mas principalmente no grupo G5, necessita-se relacioná-la ao uso de estatina, uma vez que isto não ocorreu no grupo G3. Este manteve a disfunção endotelial e quantidade de aterosclerose semelhante ao grupo G2, coelhos hipercolesterolêmicos. Assim, os efeitos pleiotrópicos independentes da redução de colesterol creditados a estes fármacos, tais como: aumento e mobilização de células progenitoras do endotélio, redução na produção de tromboxane A2 com diminuição na quantidade de colesterol nas membranas das plaquetas, atividade anti-inflamatória e ação das metaloproteinases da matriz extracelular, reverteriam ou impediriam o surgimento da aterosclerose? Os

resultados obtidos não permitem resolver tais dúvidas, necessitando a exploração de outros possíveis mecanismos que poderiam justificar os resultados.

Todavia, a aterosclerose induzida por dieta hipercolesterolêmica em coelhos só apresentou regressão significativa após suspensão da dieta hipercolesterolêmica associada ao uso de estatina, o que justifica o grande mérito dado a este grupo de fármacos redutores do colesterol, observados na prática médica atual.

6. CONCLUSÃO



- 1) Na evolução da aterosclerose ocorre aumento dos lipídes plasmáticos, colesterol e peroxidação lipídica teciduais, disfunção endotelial e aterosclerose na aorta.
- 2) Na involução espontânea ocorre retorno aos níveis normais dos lipídes plasmáticos, porém a peroxidação lipídica a função endotelial e aterosclerose continuam alterados.
- 3) Nos coelhos tratados com rosuvastatina por 1 mês e 2 meses ocorre diminuição dos lípidos plasmáticos, colesterol tecidual e pequena melhora na disfunção endotelial. Entretanto, a peroxidação lipídica e aterosclerose da aorta não diminuíram.
- 4) Nos coelhos tratados com rosuvastatina por 4 meses, tanto os lipídes plasmáticos, quanto os fatores teciduais, função endotelial e aterosclerose da aorta melhoraram significativamente.
- 5) O tempo de administração do medicamento foi um fator essencial para que ocorresse a involução da aterosclerose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. Hanke H, Lenz C, Finking G. The discovery of the pathophysiological aspects of atherosclerosis – Review. *Acta Chir Belg.* 2001;101(4):162-9.
2. World Health Organization: Classification of atherosclerosis lesions. Report of a study group. Definition of terms. WHO Tech Rep Ser. 1958;143:13-20.
3. Contran SR, Kumar V, Collins T. *Patología estrutural e funcional.* 8ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
4. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulation of T cells, macrophages, and smooth muscles in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis.* 1986;6:131-8.
5. Strydom HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis, American Heart Association. *Arterioscl Thromb.* 1994;14:840-56.
6. Strydom HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis a report from the Committee on vascular lesions of the council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1995;92:1355-74.
7. Kovanen PT, Kaartinen M, Pavoneen T, Tima MD. Infiltrates of activated mast cells at the side of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation.* 1995;92:1084-8.
8. Silva JM, Devesa N, Gaspar E. The pathogenesis of atherosclerosis. *Medicina Interna.* 2000;1:42-54

9. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. A modern view of atherogenesis. *Am J Cardiol.* 1993;71(6supplB):9B-14B.
10. Stary HC. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virch Arch.* 1992;421(4):277-90.
11. William K, Tabas I. The response to retention hypothesis of early atherogenesis. *Arteriosc Thromb Vasc Biol.* 1995;15:551-61.
12. Rosenfeld ME, Pestel E. Cellularity of atherosclerotic lesions. *Coronary Artery Dis.* 1994;5:189-97.
13. Benditt EP, Benditt JM. Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973 Jun;70(6):1753-6.
14. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med.* 1986;314:488-500.
15. Ross R, Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science.* 1976;193:1094-1100.
16. Raji L. Hypertension, endothelium, and cardiovascular risk factors. *Am J Med.* 1991;90(suppl 2A):13-8.
17. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-6.
18. Hanson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Eng J Med.* 2005;352:1685-95.
19. Michel CC. Capillares, caveolae, calcium and cyclic nucleotides: a new look at microvascular permeability. *J Mol Cell Cardiol.* 1988;30:2541-6
20. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327:524-6.

21. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res.* 1996;78:415-23
22. Schieffer B, Drexler H, Ling BN, Manero MB. G-protein coupled receptors control vascular smooth muscle cell proliferation via pp-60 c-src and p21 ras. *Am J Physiol.* 1997;272(6):C2019-30
23. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation.* 2002;105:546-49.
24. Brown MS, Goldstein JL. Lipoproteins metabolism in the macrophage implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry.* 1983;52:223-61.
25. Davidson M. Implications for the present and direction for the future. *The American Journal of Cardiology.* 1993;71(6):32b-6b.
26. Parthasarathy S, Steinbrecher UP, Barnett J, Witztum J, Steinberg D. Essential; role of phospholipase A2 activity in endothelial cell-induced modification of low density lipoprotein. *Proc Nat Acad Sci.* 1985;82(9):3000-04.
27. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med.* 1991;91(suppl 3c):14s-22s.
28. Parthasarathy S, Khoo JC, Miller E, Barnett J, Witztum J, Steinberg D. Parthasarathy S, Khoo JC, Miller E, Barnett J, Witztum J, Steinberg D. Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modifications: Implications for dietary prevention of atherosclerosis. *Proc Nat Acad Sci.* 1990;87(8):3894-98.
29. Tribble DL, Rizzo M, Chait A, Lewis DM, Blanche PJ, KraussRM. Enhanced oxidative susceptibility and reduced antioxidant content of metabolic precursors of small, dense low-density lipoproteins. *Am J Med.* 2001;110:103-10.

30. Jialal I, Fuller CT. Oxidized LDL and antioxidants. *Clinical Cardiology*. 1993;14(suppl 4):6-19.
31. Diplock A. Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *Am J Clin Nutr*. 1991;53(2):1898-935.
32. Hennekens C, Gaziana JM. Antioxidants and heart disease: Epidemiology and clinical evidence. *Clinical Cardiology*. 1993;16(suppl 4):10-5.
33. Bast A, Haenen G, Doellman C. Oxidants and antioxidants: State of the art. *Am J Med*. 1991;91(suppl 3c):2s-13s.
34. Ribeiro Jorge P, Ozaki MR, Metzke K. Effects of pravastatin and simvastatin on endothelium dependent relaxation in hypercholesterolemic rabbits. *Exp Tox Pathol* 1994;46:465-9.
35. Dupuis J, Tardef CT, Cunacek P, Treasure P. Reduction of cholesterol in ischemia and function of endothelium. *Circulation*. 1999;99:3227-33.
36. Scalia R, Appel JZ, Lefer AM. Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit. *Atherosclerosis*. 1998;137:S101-S9.
37. Steinberg D. Thematic Review series: the Pathogenesis of atherosclerosis. An interpretative history of the cholesterol controversy, part V: The discovery of the statins and the end of the controversy. *J Lipid Res*. 2006;47:1339-51.
38. Pedersen TR, Kjeldshur J, Bergt K, Haghfelt T, Faergeman O. Randomized trial of cholesterol lowering in 4,444 patients with coronary heart disease. *The Lancet*. 1994 Nov;344(8934):1383 -9.
39. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*. 1995 Nov 16;333(20):1301-7.

40. Sacks FM, Pfeffer MA, Moyl L, Brown LE, Hamm P, Braunwald E. Rationale and design of a secondary prevention trial of lowering normal plasma cholesterol levels after acute myocardial infarction: The cholesterol and recurrent events trials (CARE). *Am J Cardiol.* 1991;168(15):1436-46.
41. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA.* 1998 May 27;279(20):1615-22.
42. Ericsson CG, Nilsson J, Grip L, Svane B, Hamsten A. Effect of bezafibrate treatment over 5 years on coronary plaques causing 20% to 50% diameter narrowing – (The bezafibrate coronary atherosclerosis intervention trial). *Am J Cardiol.* 1997;80:1125-29.
43. Blankenhorn DH, Azen SP, Krams DM, Mack WJ, Cashin-Hemphill L, Hodis HN, et al. Coronary angiographic changes with lovastatin therapy. The Monitored Atherosclerosis Regression Study (MARS). *Ann Intern Med.* 1993 Nov 15;119(10):969-76.
44. Nissen S, Nicholls SJ, Sipahi I, Libby P, Raichlen JS, Ballantyne CM. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA.* 2006;295:1556-65.
45. Taylor A, Sullenberg LE, Lui Hysen LS. Arterial Biology for the Investigation of treatment effects of reducing cholesterol (Arbiter 2); a double blind, placebo controlled study of extended release niacin on atherosclerosis progression in secondary prevention treated with simvastatin. *Circulation.* 2004;110:3512-7
46. Nissen SE, Tizcu CM, Schoenhager P, Crown T, Sariela WEJ, Tsai T. Reversal of atherosclerosis with aggressive lipid lowery (Reversal) Investigation. *New Engl J Med* 2005;352(1):29-38.

47. Ridker PM, Danielson EMIA, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AM. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated c- reactive protein (JUPITER). *The New Eng J Med.* 2008;359(21):2195-207.
48. Laufs V, Fata V, Vita BA, Plutzky J, Liao K. Upregulation of endothelial nitric oxide after lipid lowering therapy in hypercholesterolemic patients. *Circulation.* 1998;97:1129-35.
49. John S, Schillich M, Langelinfield M, Weihprecht H, Schimits G, Weidinger G. Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients. *Circulation.* 1998;98:211-6.
50. Ribeiro Jorge P, Neyra LC, Ozaki MR, Almeida EA. Rapid reversal of endothelial dysfunction in hypercholesterolemic rabbits treated with simvastatin and pravastatin. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997;24:948-53.
51. Leffer AM, Campbell BA, Yong-Kyoo S, Scalia R, Hoyward R, Leffer DJ. Sinvastatin preserves the ischemic-reperfused myocardium in normocholesterolemic rat hearts. *Circulation.* 1999;100:178-84.
52. Vita JA, Yeung AC, Winniford M, Hodgson JM, Treasure CB, Klein L. Effects os cholesterol lowering therapy on coronary endothelial vasomotor function in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2000;102:846-51
53. Steinberg D. Thematic review series: the Pathogenesis of atherosclerosis. An interpretative history of the cholesterol controversy: part I. *Journal of Lipid Research.* 2004;45:1583-93.
54. Vesselinovith D, Wissler RW, Hughes R, Borensztajn J. Reversal of advanced atherosclerosis in Rhesus monkeys Light microscopic studies *Atherosclerosis.* 1976;23:155-76.
55. Armstrong ML, Warner ED, Connor WE. Regression of coronary atheromatosis in Rhesus monkeys. *Circ Res.* 1970;28(2):59-67.

56. Wissler RW, Vesselinovith D, Davis HR, Lambert PH, Bekermeier M. A new way to look at atherosclerotic involvement of the artery wall and the functional effects. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;454:9-22.
57. Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Regression of atheroma lesions by high density lipoprotein plasma fractions in the cholesterol rabbits. *J Clin Invest.* 1990;85(4):1234-41.
58. Helf G, Worthley SG, Fuster V, Fayad ZA, Zaman AG, Corti R. Progression and regression of atherosclerotic lesions: monitoring with serial noninvasive magnetic resonance imaging. *Circulation.* 2002;105:993-8.
59. Moreno PR, Lodder RA, Purusshothaman KR, Charash WE, Oconnor WN, Muller JE. Detection of lipid pool thin fibrous cap and inflammatory cells in human aortic atherosclerotic plaque by near-infrared spectroscopy. *Circulation.* 2002;105:923-27.
60. Ribeiro Jorge P, Ozaki MR, Almeida EA. Endothelial dysfunction in coronary vessels and thoracic aorta of rats exposed to cigarette smoke. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology.* 1995;22(Ribeiro Jorge PA, Ozaki MR, Almeida EA. Endothelial dysfunction in coronary vessels and thoracic aorta of rats exposed to cigarette smoke.. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* v. 22, p. 410-413, 1995.):410-3.
61. Ribeiro Jorge P, Ozaki MR, Almeida EA, Metze K, Credidio Neto L. Effects of vitamin E on endothelium-dependent coronary flow in hypercholesterolemic dogs. *Atherosclerosis.* 1996;126:43-51
62. Ribeiro Jorge PA, Almeida EA, Ozaki MR, Jorge M, Carneiro A. Ribeiro Jorge PA, Almeida EA, Ozaki MR, Jorge M, Carneiro A. Efeitos da Atorvastatina, Fluvastatina, Pravastatina e Simvastatina sobre a função endotelial, a peroxidação lipídica e a ateroscleroseaórtica em coelhos hipercolesterolêmicos. *Arquivos Bras Cardiol* 2005;84(4):314-9.

63. Ribeiro Jorge PA, Neyra LC, Ozaki MR, Almeida EA. Ribeiro Jorge PA, Neyra LC, Ozaki MR, Almeida EA. Improvement in the endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolemic rabbits treated with vitamin E. *Atherosclerosis*. 1998;40(2):333-9
64. Almeida EA, Ozaki MR, Ribeiro Jorge PA. Effects of fluvastatin on lipid, lipid peroxidation and endothelial dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *J Braz Society of Int Med*. 2004;2(3):63-71.
65. Almeida EA, Hernandez DB, Ozaki MR. Endothelium function, lipid peroxidation, plasmatic and tissue cholesterol evaluations in mixed dyslipidemia in rabbits treated with rosuvastatin and atorvastatin. *Clin Invest Ateroscl*. 2009;21(6):263-7.
66. Almeida EA, Moraes RA, Ozaki MR. Endothelial dysfunction, lipid peroxidation and cholesterol level in rabbit arteries: relationship progressive hypercholesterolemia. *Clin Invest Arterioscl*. 2007;19(6):293-9.
67. Naito HK, David JA. Laboratory considerations: determination of cholesterol, triglycerides, phospholipid and others lipids in blood and tissues. *Lab Res Methods Biol Med* 1984;10:1-76.
68. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-10.
69. Conover WJ. *Practical nonparametric statistics*. New York: John Wiley & Sons.; 1971.
70. Miliken GA, Johnson DE. *Analysis of messy data. Volume: Design experiments*. New York: Van Nostrand Reinhold Company.; 1984.
71. Montgomery Douglas C. *Design and analysis of experiments* 3rd ed. New York: John Wley & Sons; 1991.
72. Yanni AE. *The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis*

research. *Lab Anim.* 1994;38:246-56.

73. Kolodgie FD, Katocs AS, Largis EE, Wreen SM, Cornhill JF, Herderick EE. Hypercholesterolemia in the rabbits induced y feeding graded amounts of low level cholesterol. *Arter Thromb and Vascular Biology.* 1996;16:1454-64.
74. Jayakody I, Sewneratne M, Thompson A, Kapagoda T. Endothelium dependent relaxation in experimental atherosclerosis in rabbits. *Circ Res.* 1987;50:251-64.
75. Oubina MP, Heras N, Cediel E, Sanz-Rosa D, Aragoncillo P, Díaz C. Synergistic effect of angiotensin-converting enzyme (ACE) and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibition on inflammatory markers in atherosclerotic rabbits. *Clin Sci.* 2003;105:655-62. .
76. Prasad K. Dietary flax seed in prevention of hypercholesterolemic atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1997;123:69-76.
77. Prasad K. Regression of hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by secoisolariciresinol diglucose isolated from flaxseed. *Atherosclerosis.* 2008;197:34-42.
78. Tsantila N, Karantonis HC, Perrea DN, Theocharis SE, Iliopoulos DG, Iatrou C, et al. Atherosclerosis regression study in rabbits upon olive pomace polar lipids extract administration. *Nutr Metabol Cardio Dis* 2010;20(10):740-7.
79. Metz S, Riedmüller K, Kinscherf R, Metz J. Possibilities of regression in arteriosclerosis. *Z Gerontol Geriatri.* 2001;34:466-9.
80. Riedmüller K, Metz S, Bonaterra GA, Kelber O, Weiser D, Jürgern M. Cholesterol diet and effect of long-term withdrawal on plaque development and composition in the thoracic aorta of New Zealand White rabbits. *Atherosclerosis.* 2010;10(2):407-13.

81. Balakumar P, Kaur T, Singh M. Potential target sites to modulate vascular endothelial dysfunction: current perspectives and future directions. *Toxicology*. 2008 Mar 12;245(1-2):49-64.
82. Whittington-Coleman PJ, Carrier O. Effects of agents altering vascular calcium in experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1970;12:15-24.
83. Parmley WA, Blumlein S, Sievers R. Modification of experimental atherosclerosis by calcium-channel blockers. *Am J Cardiol*. 1985;55:165B-71B.
84. Guo H, Shi Y, Liu L, Sun A, Xu F, Chi J. Rosuvastatin inhibits MMP-2 expression and limits the progression of atherosclerosis in LDLR-deficient mice. *Arch Med Res*. 2009;40(5):345-51
85. Enomoto S, Sata M, Fukuda D, Nakamura K, Nagai R. Rosuvastatin prevents endothelial cell death and reduces atherosclerotic lesions formation in ApoE-deficient mice. *Biomed Pharmacother*. 2009;63(1):19-26.
86. Ross R, Glomsert JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*. 1973;180:1332-39.
87. Moreno PR, Sans J, Fuster V. Promoting Mechanisms of Vascular Health. Circulating progenitor cells, angiogenesis and reverse cholesterol transport. *J Am College Cardiol*. 2009;53(25):2315-23.
88. IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol*. 2007 Abr;88(supl I):1-80.

ANEXOS





Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 786-1, sobre "EVOLUÇÃO – REGRESSÃO DE ATHEROSCLEROSE" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida / Michico Regina Ozaki está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 17 de fevereiro de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 786-1, entitled "EVOLUTION – REGRESSION OF ATHEROSCLEROTIC PLAQUES", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 17, 2005.

Campinas, 17 de fevereiro de 2005.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP