

LACORDAIRE LOPES DE FARIA

ATEROSCLEROSE EXPERIMENTAL DA AORTA DO COELHO POR BAIXA HIPERCO-
LESTEROLEMIA. PAPEL DO ESPESAMENTO ESPONTÂNEO DA CAMADA ÍNTIMA
E DO COLAPSO ORTOSTÁTICO.

Tese de Doutorado
Departamento de Ana-
tomia Patológica da
Faculdade de Ciências
Médicas da Universi-
dade Estadual de Cam-
pinas.

CAMPINAS - SÃO PAULO

1976

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À minha esposa

e filhos: Fábio, Ricardo e Juliana.

À meus pais.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Lopes de Faria, orientador deste trabalho, pela sua incansável colaboração e apoio.

Ao Dr. Luiz Sebastião Prigenzi, pela sua valiosa cooperação na dosagem do colesterol.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica:

Maria José Ottoni Bueno da Silva

Mafalda Bedin

Mauro Gongora Sanchez

Antonio Carlos Galvan

Sebastião Henrique Militão

José Maria Barbosa de Jesus

Marco Antonio Gongora

pela inestimável ajuda.

Ao Prof. Modesto Vasques Aries, pela correção do vernáculo.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

Í N D I C E

1. INTRODUÇÃO, FINALIDADES DO TRABALHO E REVISÃO DA LITERATURA PERTINENTE.....	1
1.1. Introdução	1
1.2. Finalidades do trabalho	2
1.3. Revisão da literatura pertinente	2
2. MATERIAL E MÉTODOS	5
3. RESULTADOS	10
3.1. Aspecto macroscópico	10
3.1.1. Lesões de esclerose ou calcificação espontânea da média	10
3.1.2. Depósito lipídico	15
3.2. Aspecto microscópico	20
3.2.1. Grupo I (Controles sem receber colesterol).	20
3.2.1.1. Camada média	20
3.2.1.2. Camada íntima	25
3.2.1.3. Histoquímica enzimática	31
3.2.2. Grupo II (Controles com dieta de colesterol)	34
3.2.2.1. Camada média	34
3.2.2.2. Camada íntima	34
3.2.2.3. Histoquímica enzimática	35
3.2.3. Grupo III (com dieta de colesterol e colapso ortostático).....	38
3.2.3.1. Camada média	38
3.2.3.1.1. Medionecrose pelo colapso	39
3.2.3.2. Íntima	39
3.2.3.3. Histoquímica enzimática	43
4. DISCUSSÃO	48
4.1. Finalidades do trabalho	48
4.2. Histoquímica enzimática	51
4.3. Lesões espontâneas da aorta	53
4.4. Problemas da aterosclerose	55
5. RESUMO	56
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO, FINALIDADES DO TRABALHO E REVISÃO DA LITERATURA PERTINENTE.

1.1. Introdução

A causa da aterosclerose humana é desconhecida (46,62). O ateroma é considerado como a sua lesão básica, formado na camada íntima da artéria, uma vez que a chamada lipoidose da íntima pode regredir (27). Microscópicamente é constituído de duas alterações fundamentais, uma de caráter hiperplásico (hiperplasia de células musculares, fibras elásticas e colágenas) e a outra de caráter degenerativo, principalmente lipídico. Este manifesta-se pelo depósito de colesterol, fosfolípidos e triglicérides, constituindo o colesterol mais de 70% de todos os lípidos (62).

Portanto, a etiologia da aterosclerose pode ser investigada estudando-se em primeiro lugar a causa do espessamento hiperplásico da íntima e em segundo lugar a causa do depósito lipídico. Como a etiologia do espessamento, do depósito e da própria aterosclerose é complexa, é preferível dizer-se patogênese causal destes processos.

Os trabalhos de Lopes de Faria (1961,1965) na aorta de pacientes com cardiopatias cianóticas congênicas - (41) e de pacientes com morte súbita necropsiados no Serviço Médico-Legal (43,44) mostraram que o espessamento hiperplásico da camada íntima é secundário a processos regressivos, sobretudo necróticos, na camada média. Mais tarde, ocorre nesses espessamentos depósito lipídico.

Esses trabalhos e outros da literatura levaram ao conceito, hoje aceito, de que a hiperplasia da íntima precede o depósito lipídico (46,62).

Nos espessamentos da íntima, após a necrose da camada média da aorta, causada pelo colapso ortostático no coelho, não ocorre depósito lipídico se não houver alterações da dieta do animal (39). Resta saber se alterando-a, à custa de colesterol ingerido, este se deposita nos espessamen-

tos.

Em trabalho anterior de Lopes de Faria e Faria (1971) ficou demonstrado que, no coelho com hipercolesterolemia relativamente baixa (2,5 vezes a normocolesterolemia) e por curto tempo (4 a 8 semanas), o depósito lipídico se dá em áreas de prévio espessamento espontâneo, hiperplásico, da íntima da aorta.

1.2. Finalidades do trabalho

Do exposto, resolvemos fazer este trabalho visando duas finalidades principais:

a) estudar melhor a relação entre o espessamento espontâneo da aorta e o depósito lipídico em coelhos normais submetidos às mesmas condições experimentais de nosso trabalho anterior (47), ou seja, hipercolesterolemia baixa e de curta duração.

b) saber se em espessamentos da íntima da aorta provocados pelo colapso ortostático também há depósito lipídico na presença de hipercolesterolemia baixa e de curta duração.

1.3. Revisão da literatura pertinente

É conhecida desde o início deste século a aterogênese experimental do coelho por dieta rica de colesterol (4,5,35).

Nesta aterosclerose varia a opinião dos autores quanto ao depósito lipídico, isto é, se ele ocorre em íntima normal ou em íntima normal previamente alterada. Para Anitschkow (1967) o depósito se faria na íntima sem qualquer espessamento e haveria proliferação conjuntiva reacional (fibras argirófilas e fibras elásticas) após o depósito.

Klotz (1915-1916) diz que o colesterol é fagocitado pelas células endoteliais, descreve proliferação endotelial e ao mesmo tempo hiperplasia do tecido conjuntivo subjacente. Assim, pela descrição de Klotz, a hiperplasia não precede o depósito, mas é concomitante a ele.

Duff (1936) menciona que pequenas lesões ma

croscópicas consistiam de espessamentos da íntima formados quase exclusivamente da camada subendotelial tumefeita, impregnada de lípidos, com células fusiformes, porém sem células espumosas. Em outro trabalho, Duff, McMillan e Ritchie (1957) também não descrevem o espessamento antes do acúmulo lipídico. Para Wang, Strauss e Adlersberg (1956) a alteração mais precoce na íntima seria o acúmulo de mucopolissacarídeos ácidos, que precederia, provavelmente, o depósito lipídico. Já para Gore e Bar (1959) este precederia aquele.

Constantinides (1965) diz que o depósito se dá na parede arterial normal, não modificada. Zemplényi (1968) refere que fibroblastos aparecem mais tarde no curso da aterosclerose experimental. Dayton e Hashimoto (1970) deixam a questão por resolver.

Em conclusão, na literatura, tanto quanto seja de nosso conhecimento, permanece a idéia inicial de Anitschkow (4) de que a hiperplasia da íntima é secundária ao depósito de colesterol. Por isto, o nosso trabalho anterior (47), já referido, foi o primeiro a chamar a atenção para o fato de que, na aterosclerose dietética do coelho, o espessamento hiperplásico espontâneo da íntima precedia o depósito de colesterol. Tal espessamento é constituído de células musculares, células indiferenciadas, fibras colágenas, fibras elásticas e substância mucóide ou metacromática (azul de toluidina). Diga-se, porém, que antes de nós, Schenk e colaboradores (54) notaram, ocasionalmente, com a dieta de colesterol, depósito lipídico no espessamento espontâneo da íntima, sem darem maior importância ao achado.

A hiperplasia da íntima, como fenômeno primário, ao qual se segue o depósito lipídico, encontra apoio em alguns outros trabalhos: após congelamento da parede aórtica (60), ação da nicotina e vitamina D (24), ligadura arterial (22) etc (ver Discussão).

No colapso ortostático do coelho, Lopes de Faria (1955, 1962) observou necrose primária da camada média da aorta (39) e das artérias coronárias (42), seguida de hiperplasia secundária e reacional da íntima, constituída de células musculares, fibras colágenas e fibras elásticas. Em um único animal, dentre 6, houve acúmulo lipídico em espessamento provocado da artéria coronária (42). Cavallero, Turolla e Solcia (1963)

não observaram influência da arteriopatía pelo colapso ortostático sobre a evolução da aterosclerose experimental do coelho. As lesões da média não formam, segundo eles, um local favorável ao aparecimento da infiltração lipídica. O trabalho desses autores é sucinto e nada mais diz de interesse para esta pesquisa a não ser a perda de atividade enzimática na média necrótica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 29 coelhos machos, adultos, 5 a 6 meses de idade, da raça "Norfolk cross", de peso inicial variando entre 2.275 e 3.550 g . Os animais aumentaram de peso, em média, 165 g, durante o tempo de experimentação, exceto um coelho (C.78/75) que perdeu 150 g . Eram alimentados com uma ração própria para coelho, suplementada com verdura fresca.

Os animais foram divididos em 3 grupos:

Grupo I (controles sem dieta de colesterol), 7 animais;

Grupo II (controles com dieta de colesterol), 7 animais;

Grupo III (animais-testes com dieta de colesterol e submetidos ao colapso ortostático), 15 animais.

A duração da experiência foi entre 4 e 8 semanas, fazendo exceção 9 animais sacrificados entre a 9^a e 11^a semanas. (O atraso do sacrifício foi devido a problemas relacionados com o estudo histoquímico).

Os animais dos grupos II e III, além da ração standardizada, receberam por sonda gástrica, em média, cerca de 1 g de colesterol (Merck), emulsionado em água, em dias alternados, durante toda a duração da experiência. Semanalmente retirava-se cerca de 1 ml de sangue por punção da veia marginal da orelha, eventualmente por punção cardíaca, para se proceder a dosagem de colesterol no soro. A dosagem era feita sempre em duas amostras. Conforme o nível de colesterol no soro, aumentava-se ou diminuía-se a administração de colesterol, procurando-se mantê-lo cerca de 3 a 4 vezes o valor normal.

O método de dosagem do colesterol foi o direto com perclorato férrico num sistema de acetato de etila e ácido sulfúrico*, utilizando-se o espectrofotômetro Zeiss PM 4 no comprimento de onda de 610 nm.

* Dow Diagnostics, Cholesterol Determination. (The Dow Chemical Company, P.O. Box 68511, Indianapolis, in 46268).

Os animais do grupo III foram submetidos ao colapso ortostático uma semana após o início da dieta de colesterol.

A técnica para produzir o colapso ortostático consiste em prender firmemente as patas e a cabeça do animal em uma goteira. A seguir, coloca-se o animal em posição vertical. Cerca de 15 a 20 minutos após, ele entra em colapso ou choque. A caracterização do estado de choque é feita por alguns sinais como: perda do tônus muscular e relaxamento dos esfíncteres, dispnéia, cianose das orelhas e focinho, pulso na artéria femural filiforme ou imperceptível e diminuição ou perda do reflexo óculo-palpebral. O estado de choque era mantido durante cerca de 30 minutos. Quando muito grave, punha-se o animal em posição semi-vertical e, mais raramente, em horizontal, para melhoria. (Para mais pormenores sobre o colapso ortostático, ver o trabalho de Lopes de Faria, 1958).

O sacrifício dos animais foi feito com uma pancada na nuca e sangria imediata por secção dos vasos do pescoço. A seguir, procedia-se a necropsia, com exame dos órgãos, dissecação e retirada de toda a aorta e de um fragmento de fígado, que eram colocados em uma solução fixadora de formol neutro cloretado durante 24 horas (7). Após esse tempo, a aorta era corada pelo sudão para exame macroscópico (30).

Em 9 animais, a aorta ascendente e o arco aórtico não eram fixados devido ao estudo enzimático (ver adiante).

Para o exame microscópico retiraram-se da aorta ascendente e arco (segmento A), da aorta torácica descendente (segmento B) e da aorta abdominal (segmento C) 3 fragmentos de áreas positivas e negativas macroscópicamente à coloração pelo sudão, mais ou menos equidistantes um do outro, para cortes em congelação. Coraram-se 3 cortes de cada fragmento pelo sudão IV - propileno glicol (66); também do fígado foi feito um corte em congelação e corado pela mesma técnica.

Evitou-se retirar fragmento para exame microscópico das áreas com esclerose espontânea de média, exceto nos coelhos em que a esclerose era intensa.

Toda a sobra dos fragmentos e da aorta descendente, previamente enrolada, foram incluídos em parafina,

segundo técnica comum. Formou-se um bloco único com os fragmentos transversos de B e C designando-os segmento B. A porção enrolada da aorta descendente designou-se "rolo".

De cada bloco de parafina, em número de 3 (A, B e rolo), foi tirada uma série consecutiva de 6 cortes, cada um de 6 μ de espessura, numerados de 1 a 6. No corte nº 1, foi feita a coloração pelo azul de toluidina (A.T.), no 2 hematoxilina-eosina (H.E.), no 3 Weigert para elástico-Van Gieson (W.V.G.); os demais eram utilizados para as mesmas colorações em caso necessário, ou para as colorações hematoxilina férrica de Heidenhain e hematoxilina fosfotúngstica de Mallory.

A coloração pelo azul de toluidina foi feita durante 5 minutos segundo o método de Lison, usando-se uma solução tamponada a 0,1% no pH 4,4.

Nos coelhos do grupo III, quando não se encontrava medionecrose provocada na 1ª série de cortes, tiravam-se 3 novas séries do rolo.

Para a histoquímica enzimática, utilizaram-se 8 coelhos, sendo 3 do grupo I, 2 do grupo II e 3 do grupo III (Tab.IX). (Um outro coelho não será apresentado por ter sido parcial o estudo histoquímico). Para esta finalidade, a aorta ascendente e o arco aórtico eram retirados imediatamente após o sacrifício dos animais e recortados em fragmentos de 1 a 2 mm de espessura. Em seguida, sem perda de tempo, os fragmentos eram mergulhados no nitrogênio líquido durante 1 minuto, levados ao criostato e presos ao suporte de material por meio do líquido designado "Tissue Tek II" (Lab-Tek Products, Naperville Ill.) de modo a formar o conjunto de fragmentos um bloco único ao congelar aquele líquido. Na temperatura de - 20° C faziam-se 15 a 20 cortes de boa qualidade de 6 μ de espessura em séries ininterruptas de cortes, tendo cada série, no mínimo, 5 cortes.

Procedia-se nos cortes, pegos em lâminas muito limpas sem qualquer adesivo e seqüencialmente obtidas, as técnicas para demonstração de: adenosina trifosfatase (ATPase), difosfopiridina nucleótide-diaforase (DPN diaforase), fosfatase ácida, lipase-esterase e sudão IV - propileno glicol (66). Como controles das enzimas, utilizaram-se cortes não tratados pe

los respectivos substratos.

Método para ATPase (51,61).

- a. Tratar os cortes pela solução de adenosina trifosfato na concentração final de 0,005 M e no pH 9,4 , durante 5 a 90 minutos na estufa a 37°C . (Na preparação da solução entram o tampão de barbiturato 0,1 M e cloreto de cálcio 0,18 M);
- b. Lavar duas vezes no cloreto de cálcio a 1%;
- c. Lavar no cloreto de cobalto a 2% e em seguida numa nova solução durante 3 minutos;
- d. Lavar em água destilada;
- e. Tratar pelo sulfeto de amônio a 1%, 1 a 3 minutos;
- f. Lavar em água destilada;
- g. Corar pela hematoxilina de Harris;
- h. Desidratar pelos álcoois. Clarear em xilol e montar em resina sintética.

Método para DPN diaforase (6a, 61) ou NADH₂ tetrazólio redutase (1).

- a. Incubar no substrato constituído de DPNH (difosforopiridina nucleótide reduzida) adicionado de nitro BT (nitro azul tetrazólio) e de tampão de fosfato 0,2M (pH 7,2 a 7,4), em temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos;
- b. Passar no ácido acético a 1%, 1 minuto;
- c. Passar no formol neutro tamponado a 10%, 10 minutos;
- d. Lavar duas vezes em água destilada;
- e. Corar os núcleos com o carmim de Mayer;
- f. Desidratar em álcool. Clarear em xilol. Montar em resina sintética.

Método para lipase-esterase (20,61).

- a. Incubar no substrato "Tween 80" a 5% em tampão 0,05 M tris-maleato em pH 7 a 7,4, adicionado de clore-

to de cálcio a 2%, durante 14 a 24 horas na estufa a 37°C;

b. Lavar em água destilada, duas vezes;

c. Passar no nitrato de chumbo a 2%, durante 10 minutos, na temperatura de 50-55°C;

d. Lavar em água destilada três vezes, durante 2, 3 e 5 minutos respectivamente;

e. Passar no sulfeto de amônio a 1%, 5 minutos;

f. Lavar em água corrente, 2 minutos;

g. Corar pela hematoxilina de Harris e proceder até a montagem em resina sintética. Desidratar e clarear em tetracloroetileno.

Método para fosfatase ácida (20,61).

a. Incubar no β -glicerofosfato de sódio a 1,25% em tampão tris-maleato 0,1 M em pH 5,0, adicionado de nitrato de chumbo a 0,2%, durante 30 a 50 minutos, na temperatura de 37°C;

b. Passar em água destilada trocada 4 vezes, perfazendo ao todo 1 minuto;

c. Tratar pelo sulfeto de amônio a 1%, 1-2 minutos;

d. Lavar em água destilada, duas vezes;

e. Corar os núcleos pela hematoxilina de Harris;

f. Desidratar, clarear em tetracloroetileno e montar em resina sintética.

Nas Tabelas IV, V e VII e nas Figuras 1 e 2, a consignaçoão de menor número de animais se deveu à utilização de alguns deles para a histoquímica enzimática.

3. RESULTADOS

O resultado da dosagem do colesterol total no soro dos animais, para os diversos grupos, está consignado nas Tabelas I, II e III.

No Grupo I, a média foi de $49,5 \pm 13,9$ mg/100 ml (Tab. I);

No Grupo II, a média antes da dieta de colesterol foi $59,0 \pm 18,0$ e depois, $188,4 \pm 77,5$ mg/100 ml (Tab. II);

No Grupo III, a média antes da dieta foi $53,2 \pm 18,1$ e depois, $176,3 \pm 50,5$ mg/100 ml (Tab. III).

3.1. Aspecto macroscópico

A necropsia de todos os animais nada revelou de especial nos órgãos, exceto o C.1/75 que mostrou intensa broncopneumonia por aspiração da emulsão de colesterol. Este animal faleceu 5 dias após a aspiração.

3.1.1. Lesões de esclerose ou calcificação espontânea da média.

Dos 29 coelhos estudados, em 9 não foi avaliada a esclerose da aorta ascendente e arco porque estes segmentos foram retirados para o estudo histoquímico. Assim, tendo em vista que para a aorta ascendente e arco a amostragem é de 20 coelhos e para a aorta torácica descendente e aorta abdominal é de 29 coelhos, é a seguinte a distribuição das placas espontâneas (Fig. 1):

- a) na aorta ascendente, 9 animais (45%);
- b) no arco, 12 animais (60%), sendo que destes 12, 6 apresentavam também localização na aorta ascendente;
- c) na aorta torácica descendente, 3 animais (10%), sendo que em 2 a localização foi simultânea na aorta ascendente e arco;
- d) na aorta abdominal, 2 animais (3%), sen

Tab.I. Dosagem semanal do colesterol total no soro dos animais do grupo I, em mg/100 ml.

Coe- lho nº	P e s o inicial g	Total de colest. adm. g	0	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	8a	9a	10a	11a
3	3.250	-	32,7	28,0	26,1	33,3	29,8							
5	3.550	-	66,8	53,4	43,5	50,0	53,5							
81	2.450	-	141,4	98,4	38,0	76,7	51,5	52,4	49,2					
82	2.275	-	46,7	29,0	43,3	41,9	22,0	36,9						
85	3.100	-	63,2	55,5	36,7	66,7	61,5	58,0	52,9	58,4	65,7			
86	2.550	-	11,2	38,3	47,3	51,7	43,5	38,5	47,0	56,9	58,0	54,7	63,1	44,0
97	2.800	-	36,1	41,7	16,7	50,7	37,1	40,1	49,9	59,5	67,7	82,8	72,1	53,1

Valor médio: 49,5 ± 13,9

Tab.II. Dosagem semanal do colesterol total no soro dos animais do grupo II, em mg/100 ml.

Coe- lho nº	P e s o inicial g	Total de colest. adm. g	0	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	8a	9a	10a
1	2.950	32,5	43,1	43,6	43,3	58,3	98,0						
2	2.850	22,5	49,2	47,2	70,7	55,6	142,0	239,8					
83	2.475	10	75,0	333,5	238,6	316,8	286,6	225,4					
84	2.350	16	91,0	147,4	273,5	322,0	206,8	93,5	399,8				
88	2.700	9,5	42,0	239,4	141,7	153,4							
89	2.750	41	53,3	126,7	148,4	79,9	140,3	168,3	210,9	344,6	487,0	325,0	
90	3.250	50,5	59,8	66,7	61,7	83,0	190,3	253,2	293,4	309,5	303,1	257,8	414,7

Valor médio: antes do colesterol 59,0 ± 18,0
depois do colesterol 188,4 ± 77,5

Tab.III. Dosagem semanal do colesterol total no soro dos animais do grupo III, em mg/100ml.

Coe- lho nº	P e s o inicial g	Total de colest. adm. g	0	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	8a	9a	10a	11a
20B	3.250	17	80,0	93,4	103,8	141,4	111,8							
28	2.450	20	50,0	55,6	313,5	64,8	256,8							
30	2.750	22,5	48,0	44,9	192,0	140,9	193,7	248,7						
33	3.250	13	71,3	167,0	142,7	249,1	250,3	196,9						
34	3.000	13,5	50,7	110,0	293,5	69,0	255,2	237,5						
73	2.700	18,5	65,4	93,4	206,4	190,0	198,0	133,9						
75	3.100	19	53,0	82,0	264,4	433,5	103,7	30,5	56,6					
78	2.950	19	60,0	83,8	536,9	431,5	257,6	159,9						
79	2.850	14,5	73,4	259,6	366,8	191,6	127,1	184,5						
91	2.750	38	48,3	91,3	231,8	70,0	72,3	183,8	100,9	313,5				
92	2.500	48,5	25,8	73,0	131,7	55,0	138,4	167,7	181,1	128,2	277,4	428,9		
93	2.600	50,5	78,5	152,0	353,5	173,4	78,4	159,6	161,8	108,3	148,9	324,1	493,7	477,8
94	2.850	27	26,2	108,5	166,7	73,4	79,9	103,2	68,9					
95	2.500	26	30,2	179,5	198,4	106,7	72,3	108,0	118,6					
96	2.750	58,5	37,7	56,7	156,7	95,3	108,0	81,7	119,7	214,6	358,0	343,7	398,2	333,8

Valor médio: antes do colesterol 53,2 ± 18,1
depois do colesterol 176,3 ± 50,5

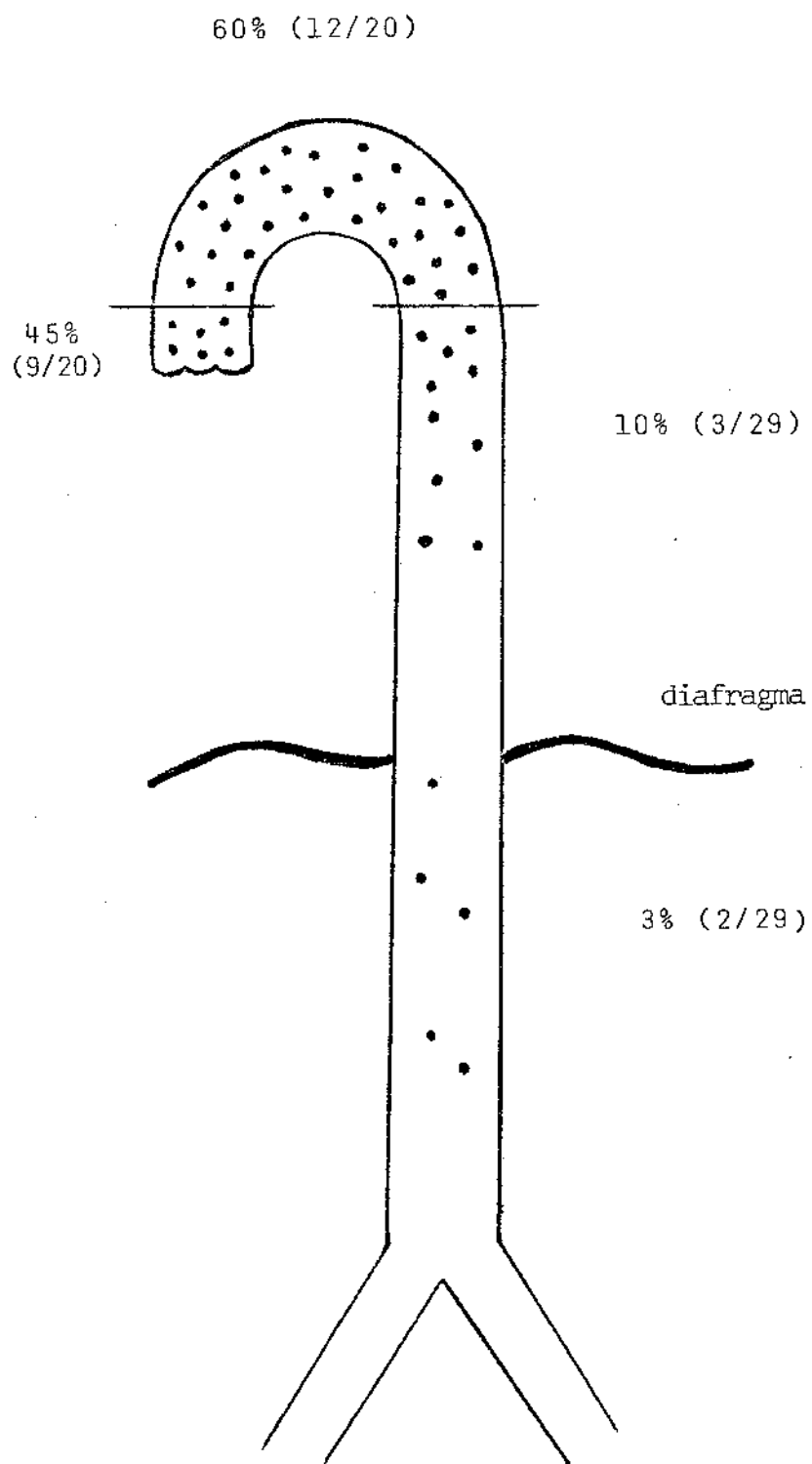


Fig.1. Frequência e distribuição da esclerose espontânea na média da aorta nos 3 grupos de animais, ao exame macroscópico.

do em 1 também no arco e o outro em todos os segmentos.

As lesões eram em grau leve, geralmente de forma arredondada, deprimidas, mais raramente alongadas ou ovais e salientes e, quando maiores, de consistência dura. Faz exceção um animal (C.85/75) em que a esclerose da média era grave. O tamanho das lesões variou entre cerca de 0,1 e 1 cm nos maiores diâmetros, sendo as maiores calcificadas.

3.1.2. Depósito lipídico

Os coelhos controles, que não receberam colesterol (grupo I) não mostraram depósito lipídico na íntima.

Todos os demais (grupos II e III), mostraram-no cuja distribuição ao longo da aorta está demonstrada na Fig. 2, em que um dado animal pode apresentar comprometimento em um ou mais segmentos.

No grupo II, a aorta ascendente estava atingida em 1 animal (20%); o arco aórtico em 5 animais (100%); a aorta torácica descendente em 4 (57%), todos no seu terço superior; e a aorta abdominal em 2 (28%), ambos no seu terço superior, sendo um destes também no terço médio.

No grupo III, a aorta ascendente comprometera-se em 7 animais (58%); o arco aórtico em 12 (100%); a aorta torácica descendente em 11 (73%), todos no terço superior, com extensão para baixo em 2; e a aorta abdominal em 7 (46%), todos no terço superior.

A diferença de frequência entre os grupos II e III são mostradas na Figura 2, na Tabela IV e nos Gráficos 1A e 1B.

Quanto à intensidade e extensão das áreas de depósito lipídico, nota-se que, em ambos os grupos conjuntamente, as lesões são leves na maioria dos animais (15 coelhos), moderadas em raros (2 coelhos do grupo II) e intensas em alguns. Os últimos animais são em número de 5 e todos pertencentes ao grupo III.

As áreas de depósito lipídico apresentaram-se sob forma de pontos, áreas arredondadas, alongadas ou irregulares, de aspecto estriado ou homogêneo. O seu tamanho variou entre cerca de 0,1 e 0,2 cm nos maiores diâmetros. Quan-

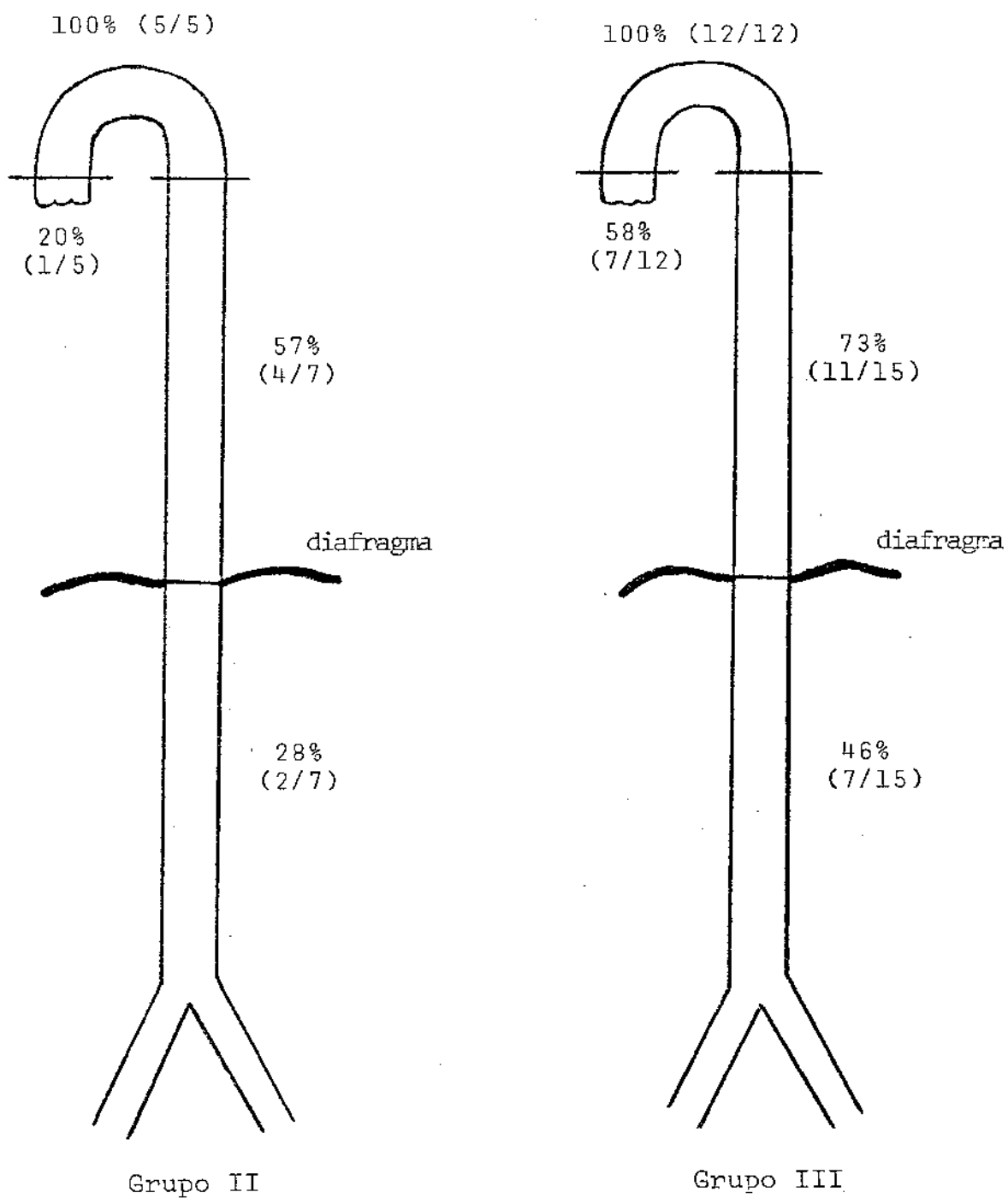


Fig. 2 . Frequência do depósito lipídico na íntima dos diversos segmentos da aorta nos grupos II e III de animais, ao exame macroscópico.

Tab.IV. Frequência de depósito lipídico na íntima da aorta nos quatro segmentos, ao exame macroscópico.

Coelhos	0	+	++	+++	++++	Total
Grupo II	80% (4)	0	20% (1)	0	0	5
Grupo III	41% (5)	33% (4)	8% (1)	16% (2)	0	12

A.Asc.

Coelhos	0	+	++	+++	++++	Total
Grupo II	0	40% (2)	60% (3)	0	0	5
Grupo III	0	50% (6)	25% (3)	25% (3)	0	12

Arco

Coelhos	0	+	++	+++	++++	Total
Grupo II	42% (3)	28% (2)	28% (2)	0	0	7
Grupo III	26% (4)	40% (6)	6% (1)	20% (3)	6% (1)	15

A.T.D.

Coelhos	0	+	++	+++	++++	Total
Grupo II	71% (5)	14% (1)	14% (1)	0	0	7
Grupo III	53% (8)	40% (6)	6% (1)	0	0	15

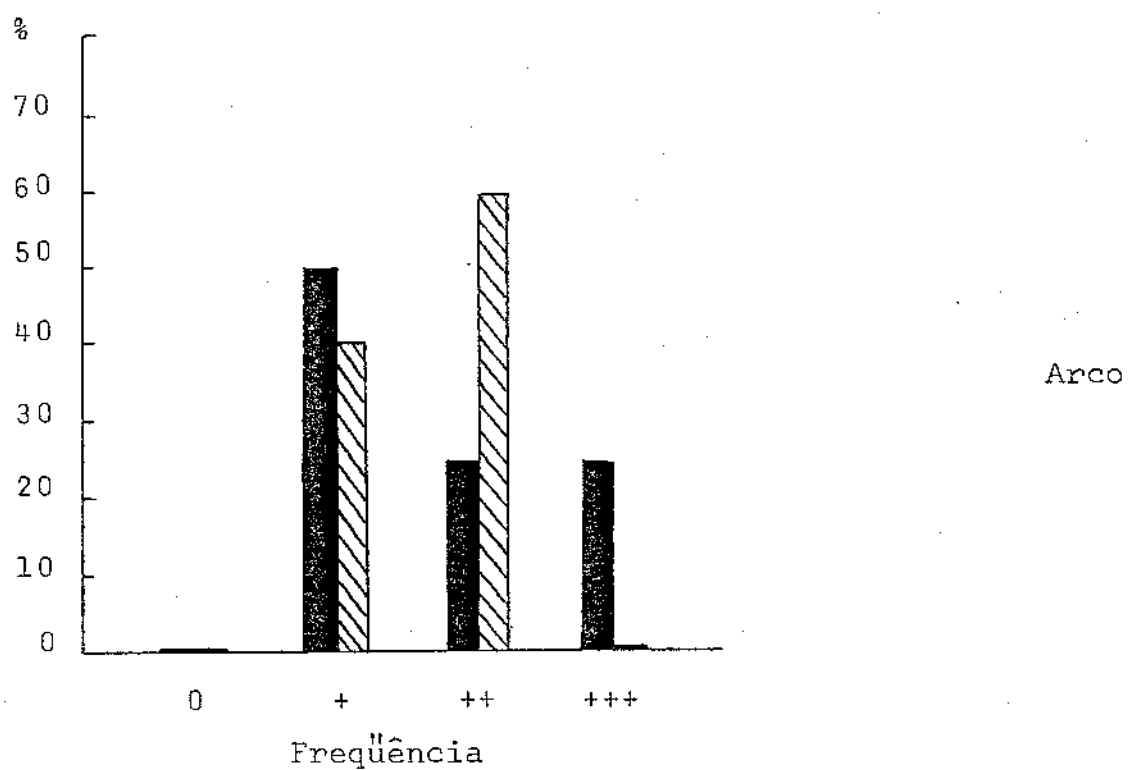
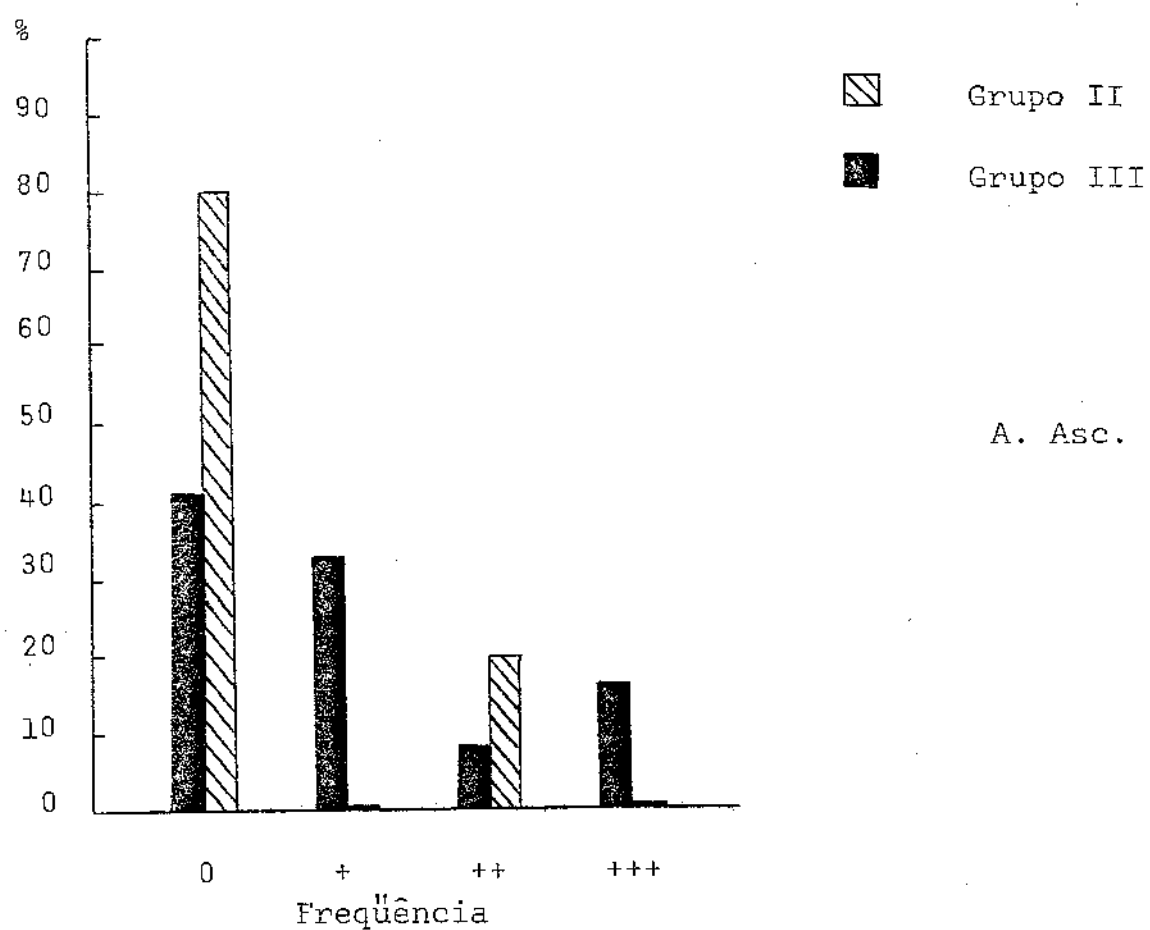
A.Abd.

A.Asc. = aorta ascendente.

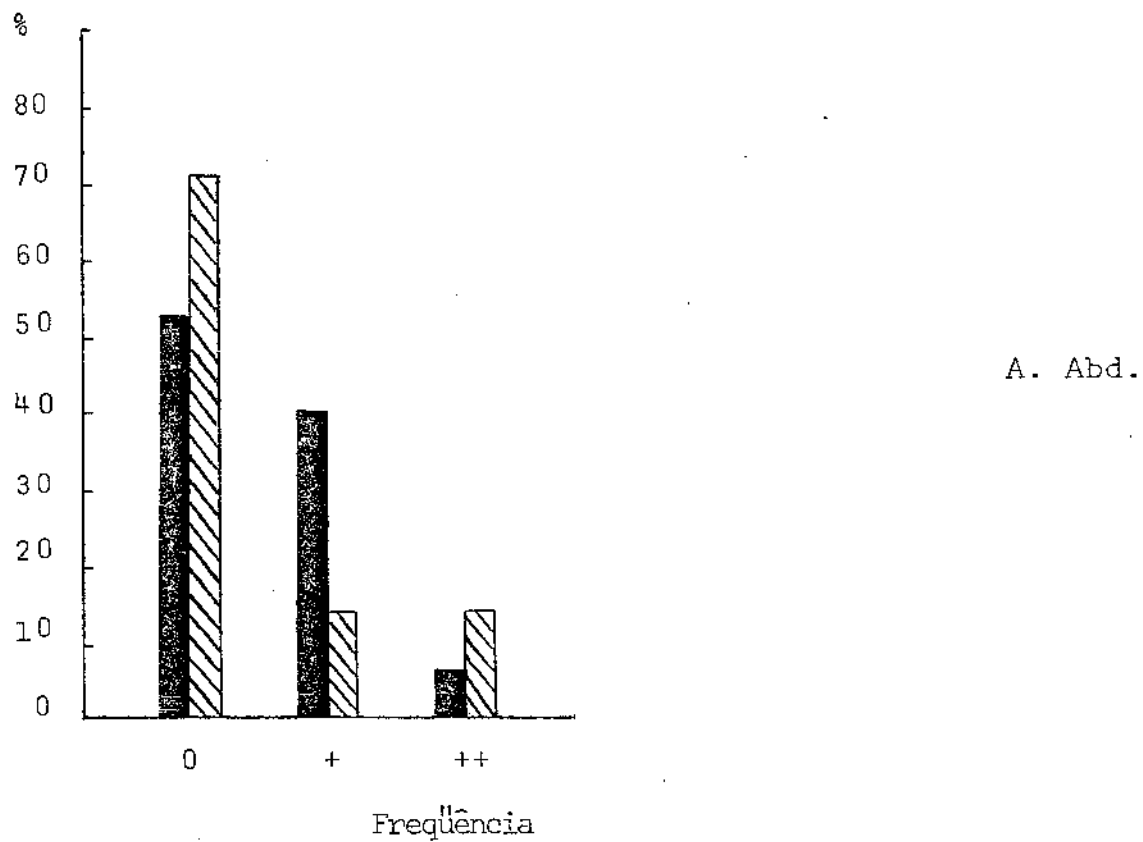
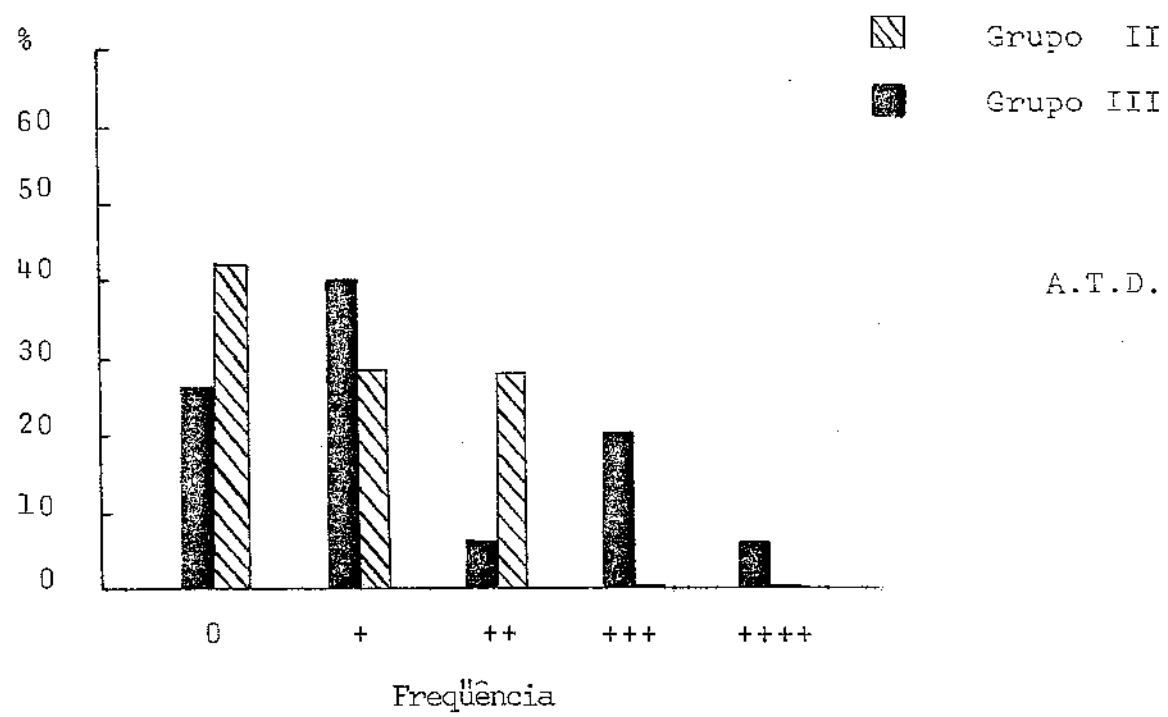
A.T.D. = aorta torácica descendente.

A.Abd. = aorta abdominal

Depósitos: 0 = ausente; + = raro; ++ = freqüente; +++ e ++++ muito freqüente. Os números entre parênteses representam o nº de animais.



Gráf.1A. Representação gráfica dos resultados da Tab.IV:
aorta ascendente e arco.



Gráf. 1B. Representação gráfica dos resultados da Tab.IV:
aorta torácica descendente e aorta abdominal.

do as áreas eram confluentes o tamanho atingiu até 2 cm no maior diâmetro (Figs.3 e 4). Localizam-se os depósitos na margem de óstios de ramos da aorta, curvaturas, na margem de placas de esclerose espontânea ou sobre as mesmas e também não se relacionam com tais estruturas.

3.2. Aspecto microscópico

3.2.1. Grupo I (Controles sem receber colesterol).

3.2.1.1. Camada média

Apenas 4 coelhos mostraram áreas de esclerose espontânea da média, em geral calcificadas, localizadas predominantemente no terço interno da média (m.i.) quando pequenas, e estendendo-se aos terços médio (m.m.) e externo (m.e.) quando maiores. Estas escleroses espontâneas só foram encontradas na aorta ascendente e arco (segmentos A).

Na camada média havia áreas claras, geralmente alongadas, lacunares, contendo substância basófila, na coloração pela H.E. (Fig. 5). Na coloração pelo Weigert-Van-Gieson tais áreas ocupavam os espaços interlamelares, de largura conservada ou dilatada, lembrando micro-cistos. Eram preenchidas por substância metacromática (revelada pelo azul de toluidina), fibrilas elásticas e fibrilas colágenas, ambas bem coloradas. Também havia fibras colágenas mais espessas. A substância metacromática ora predominava sobre os demais elementos (4 animais), ora predominavam estes (3 animais); num mesmo animal também havia ambos aspectos.

Todos os coelhos mostraram as referidas lacunas nos segmentos A e B da aorta, exceto um animal que não as apresentou e outro contendo-as só no segmento B.

No segmento A a frequência das lacunas é maior do que no segmento B, isto porque a frequência máxima em A está em duas cruzes, enquanto que em B está em uma cruz. (Tabs. V e VI, Grafs. 2 e 3).

As lacunas localizam-se em toda a espessura da camada média, sendo mais frequentes no terço interno



Fig. 3. Grupo III: depósito lipídico na íntima da aorta sob forma de áreas punctiformes, isoladas ou confluentes e em estrias (setas). Coloração pelo sudão IV, método de Holman e colaboradores.



Fig. 4. Grupo III: depósito lipídico na íntima da aorta torácica descendente, mais intenso do que no coelho anterior. A mesma coloração que para aquele.

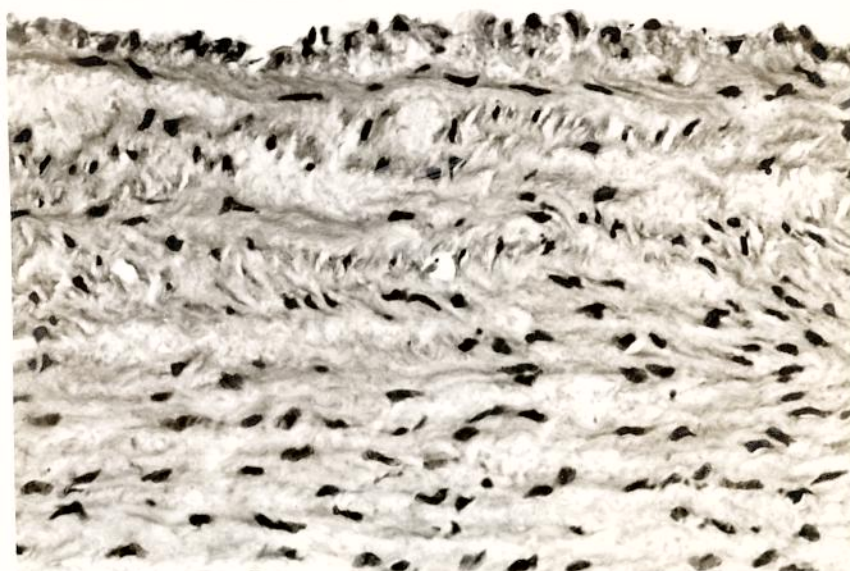
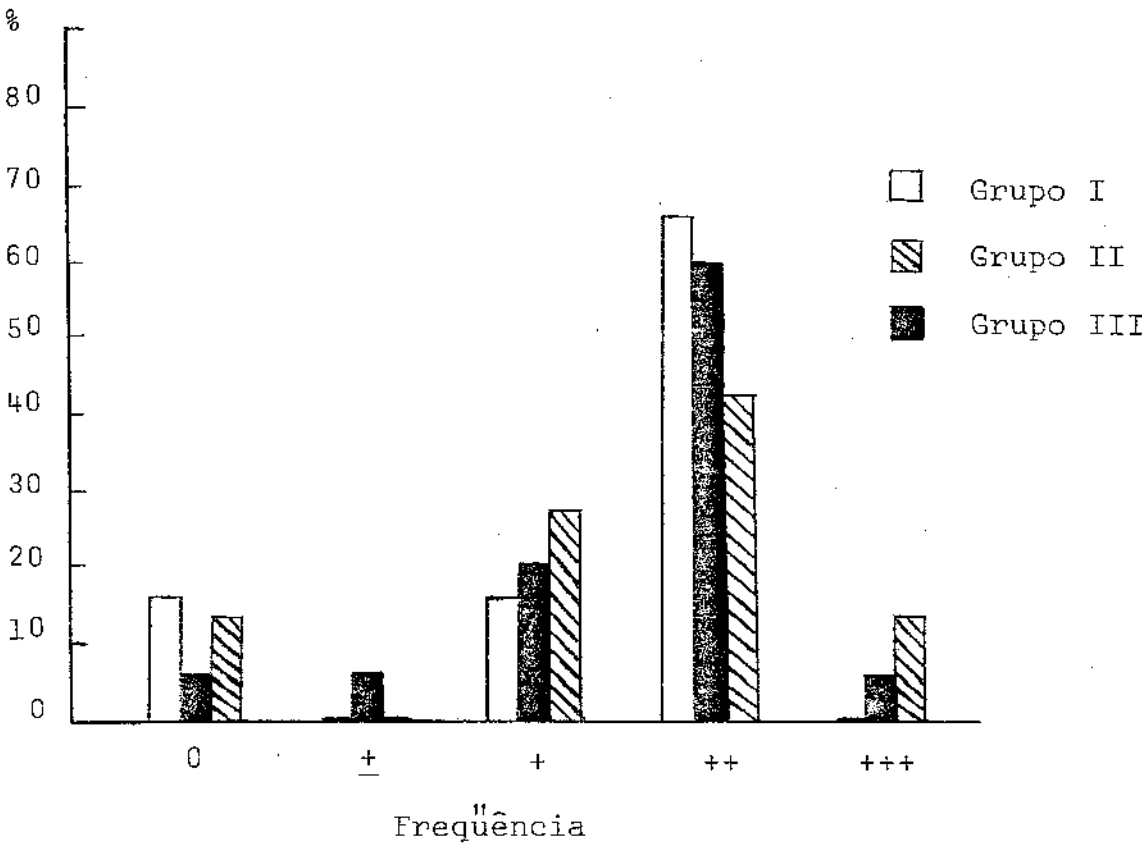


Fig. 5. Grupo I, coelho 5, sem dieta de colesterol. Aorta, segmento A: notar, em cima, a íntima espessada e logo abaixo as lacunas na camada média. Hematoxilina-eosina . 350x.

Tab.V. Frequência de lacunas na camada média da aorta no segmento A nos 3 grupos de animais.

Coelhos	0	<u>+</u>	+	++	+++	Total
Grupo I	16% (1)	0	16% (1)	66% (4)	0	6
Grupo II	14% (1)	0	28% (2)	42% (3)	14% (1)	7
Grupo III	6% (1)	6% (1)	20% (3)	60% (9)	6% (1)	15

Lacunas: 0 = ausente;
 + = duvidosa ou mui rara;
 + = rara;
 ++ = freqüente;
 +++ = mui freqüente. Os números entre parênteses representam o número de animais.

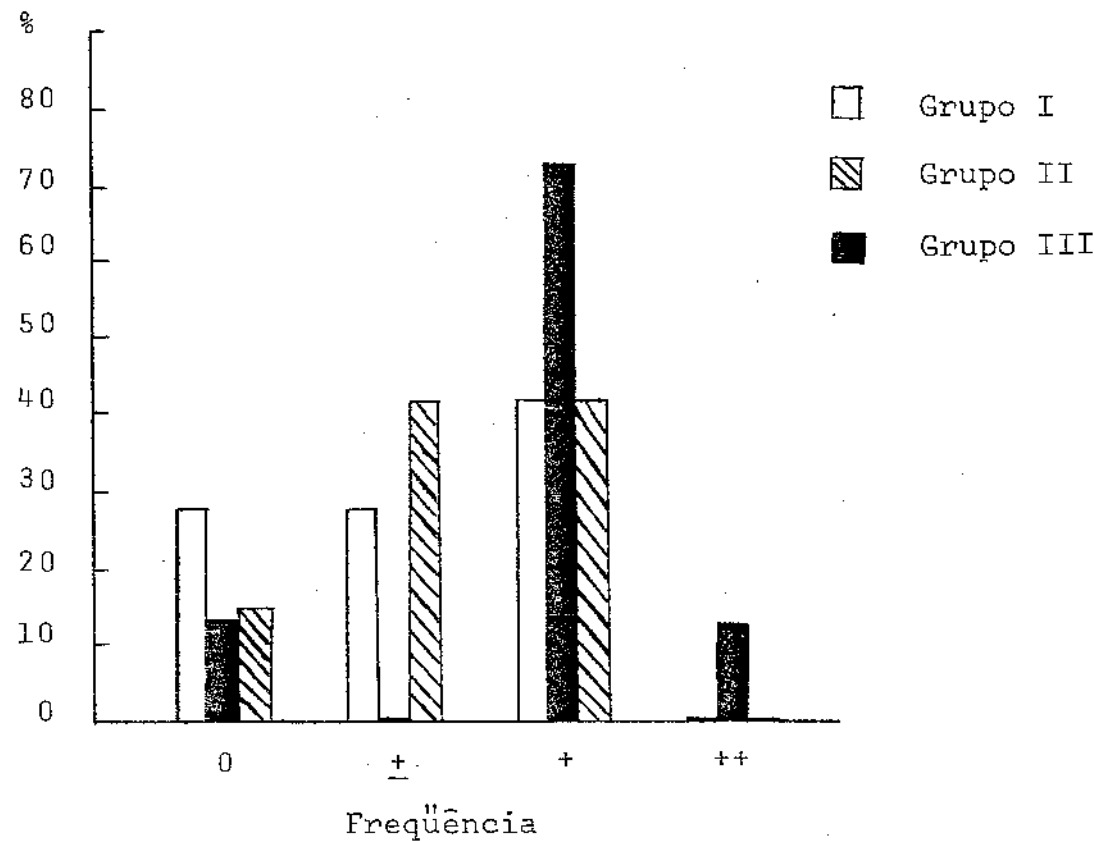


Gráf.2. Representação gráfica dos resultados da Tab.V.

Tab.VI. Freqüência de lacunas na camada média da aorta no segmento B nos 3 grupos de animais.

Coelhos	0	<u>+</u>	+	++	+++	Total
Grupo I	28% (2)	28% (2)	42% (3)	0	0	7
Grupo II	14% (1)	42% (3)	42% (3)	0	0	7
Grupo III	13% (2)	0	73%(11)	13% (2)	0	15

Para o significado das designações, ver a Tab.V.



Gráf.3. Representação gráfica dos resultados da Tab.VI.

desta camada (m.i.) e diminuem em freqüência no sentido do terço externo (m.e.). Este fato é mais evidente no segmento B, onde na m.e. 100% dos coelhos não mostram lacunas (Tabs.VII e VIII, Grafs.4 e 5).

3.2.1.2. Camada íntima

Esta camada é formada de células endoteliais e da membrana elástica interna, que freqüentemente é mais corada pelo corante de elástico do que as lamelas da média (fucsina-resorcina).

A aorta de todos os coelhos, em toda a extensão, mostra espessamentos da íntima, geralmente freqüentes. (Figs. 5 e 6). Faz exceção a aorta descendente do C.85/75 que não revelou espessamento ao nível do segmento B.

A freqüência dos espessamentos da íntima é em geral maior no segmento A do que no segmento B; sua intensidade também diminui em sentido distal, porém de modo irregular, havendo às vezes espessamentos distais de igual intensidade aos proximais.

Os espessamentos são geralmente longos, chamados difusos, de intensidade variada, leves a intensos, com predomínio dos leves e com poucas células (Fig.6); a sua altura varia desde menos de um espaço interlamelar da média até 4 espaços interlamelares (cerca de 28μ). A estrutura também varia e podem eles assumir três aspectos na coloração pelo método de Weigert-Van-Gieson, conforme a natureza dos elementos situados entre a camada endotelial e a membrana elástica interna:

a) constituídos de células, substância fundamental rósea e/ou amarela e fibrilas elásticas e colágenas, ambas mal ou bem coradas (Fig.6).

b) constituídos de células e predominantemente de fibras elásticas variáveis em espessura, porém mais finas do que as lamelas da média, dispostas irregularmente, e mais raras fibras colágenas (Fig.7).

c) de mesma constituição e estrutura da média, porém com os espaços interlamelares menores (Ver a Figura 24).

Todos os espessamentos mostram ainda subs-

Tab.VII. Frequência de lacunas nos três terços da mê dia da aorta no segmento A, nos 3 grupos de animais.

Coelhos	0	<u>+</u>	+	++	+++	Total
Grupo I	16% (1)	0	16% (1)	66% (4)	0	6
Grupo II	14% (1)	0	28% (2)	42% (3)	14% (1)	7
Grupo III	13% (2)	6% (1)	13% (2)	60% (9)	6% (1)	15

Terço
interno

Coelhos	0	<u>+</u>	+	++	+++	Total
Grupo I	33% (2)	33% (2)	33% (2)	0	0	6
Grupo II	14% (1)	57% (4)	28% (2)	0	0	7
Grupo III	20% (3)	33% (5)	46% (7)	0	0	15

Terço
médio

Coelhos	0	<u>+</u>	+	++	+++	Total
Grupo I	50% (3)	33% (2)	16% (1)	0	0	6
Grupo II	28% (2)	42% (3)	28% (2)	0	0	7
Grupo III	73% (1)	13% (2)	13% (2)	0	0	15

Terço
externo

Para o significado das designações, ver a Tab. V.

Tab.VIII. Frequência de lacunas na camada média da aorta nos três terços da média no segmento B, nos 3 grupos de animais.

Coelhos	0	$\pm$	+	++	+++	Total
Grupo I	28% (2)	42% (3)	28% (2)	0	0	7
Grupo II	28% (2)	28% (2)	42% (3)	0	0	7
Grupo III	13% (2)	6% (1)	66% (10)	13% (2)	0	15

Terço
interno

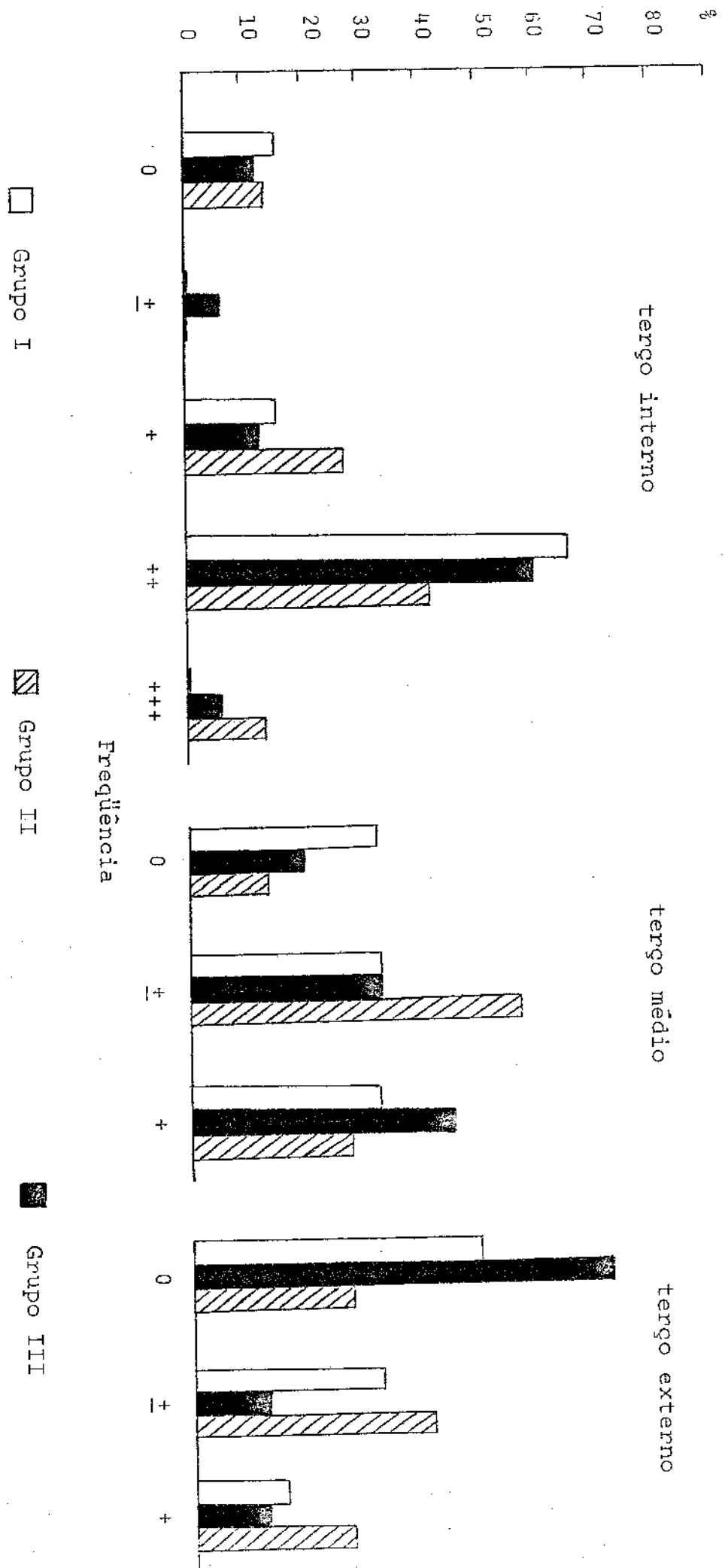
Coelhos	0	$\pm$	+	++	+++	Total
Grupo I	85% (6)	14% (1)	0	0	0	7
Grupo II	57% (4)	42% (3)	0	0	0	7
Grupo III	33% (5)	33% (5)	26% (4)	6% (1)	0	15

Terço
médio

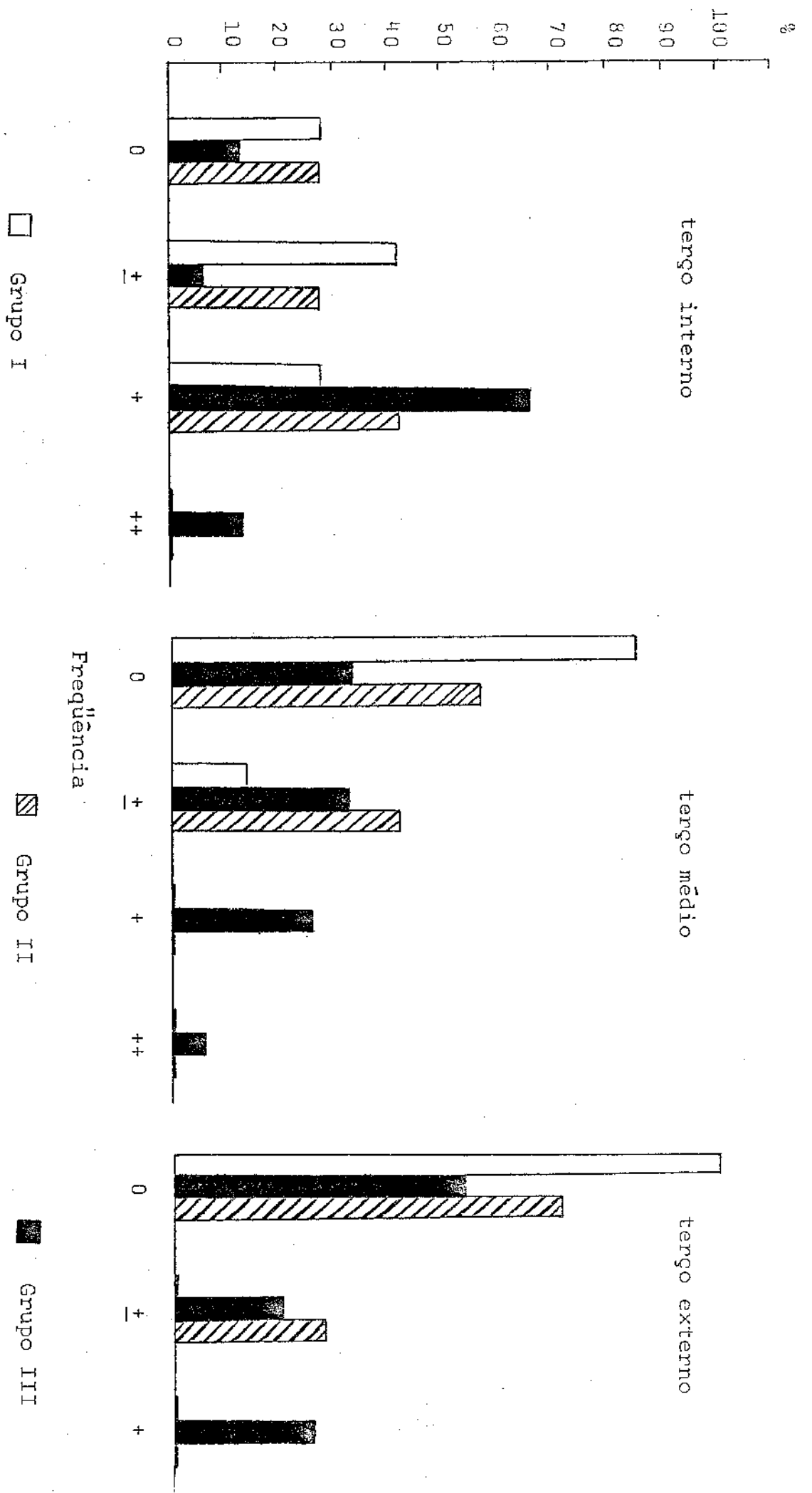
Coelhos	0	$\pm$	+	++	+++	Total
Grupo I	100% (7)	0	0	0	0	7
Grupo II	71% (5)	28% (2)	0	0	0	7
Grupo III	53% (8)	20% (3)	26% (4)	0	0	15

Terço
externo

Para o significado das designações, ver a Tab.V.



Gráf.4. Representação gráfica dos resultados da Tab.VII.



Gráf. 5. Representação gráfica dos resultados da Tab. VIII.

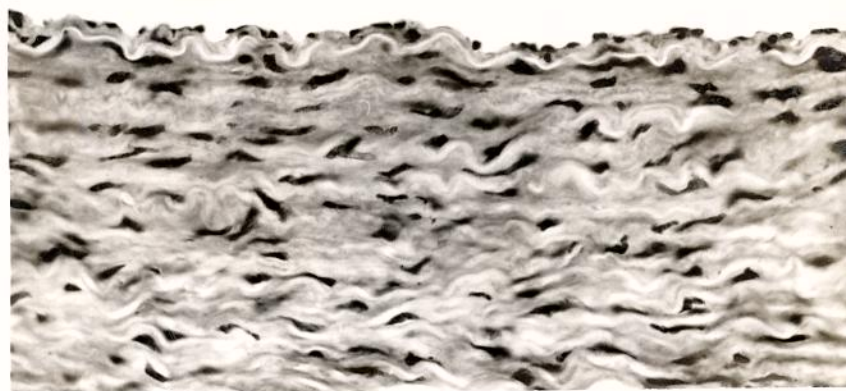


Fig. 6. Grupo I, coelho 86. Aorta descendente (segmento B): observar o leve espessamento da íntima acima de nítida membrana elástica interna. Azul de toluidina. 350x.

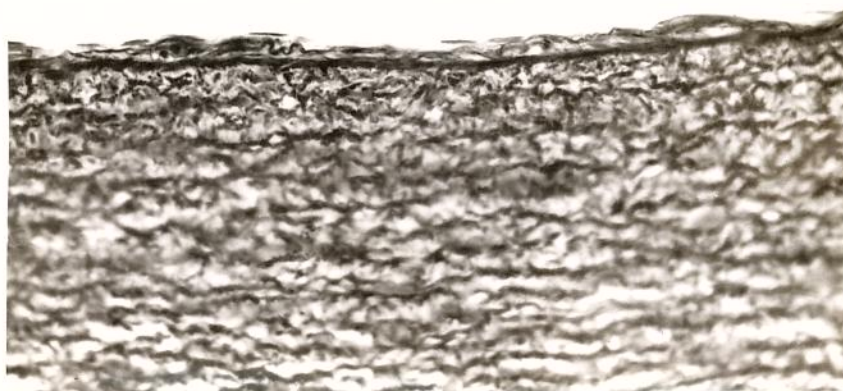


Fig. 7. Grupo I, coelho 5. Aorta abdominal : notar, acima da membrana elástica interna, o leve espessamento espontâneo da íntima, constituído de numerosas fibras elásticas. Weigert-van Gieson. 350x.

tância metacromática (azul de toluidina), mais abundante nos primeiros espessamentos (a) e mais rara nos últimos (c).

A delimitação entre os espessamentos da íntima e a camada média é, freqüentemente, nítida, porém, nos espessamentos em que a constituição se assemelha à da camada média, a delimitação não é precisa por falta de nítida membrana elástica interna.

As células dos espessamentos, na coloração pela hematoxilina-eosina, são, além das endoteliais, células musculares e células indiferenciadas. As células musculares estão situadas mais profundamente, mais próximo da membrana elástica interna e variam de tamanho, pequenas e grandes, umas e outras com nítidas miofibrilas no citoplasma. As células indiferenciadas são mais superficiais, situadas geralmente logo abaixo do endotélio (Fig. 7a). Seu núcleo é geralmente de forma elíptica ou cilíndrica, de extremidades arredondadas, às vezes afiladas, é claro, de cromatina muito fina e nucléolo não perceptível. O citoplasma em geral não é distinto, confundindo-se com a substância fundamental e sem miofibrilas (hematoxilina férrica de Heidenhain e hematoxilina fosfotúngstica de Mallory).

3.2.1.3. Histoquímica enzimática

A atividade enzimática nos espessamentos da íntima é a seguinte (Tab. IX): fosfatase ácida e lipase-esterase, mui fracas; adenosina trifosfatase (ATPase), fraca; difosforopiridina nucleótide (DPN) diaforase, moderada.

Quanto às células da íntima:

a) Células endoteliais: não há atividade de fosfatase ácida e de lipase-esterase, exceto ocasional atividade mui fraca da primeira; a atividade da ATPase varia, havendo células negativas e outras de atividade mui fraca; também varia a DPN diaforase, havendo células negativas, outras de atividade mui fraca e finalmente células com moderada intensidade;

b) Células musculares: a atividade da fosfatase ácida varia de fraca a moderada; a da lipase-esterase, de mui fraca a fraca; a da ATPase de moderada a intensa; e a DPN diaforase, intensa;

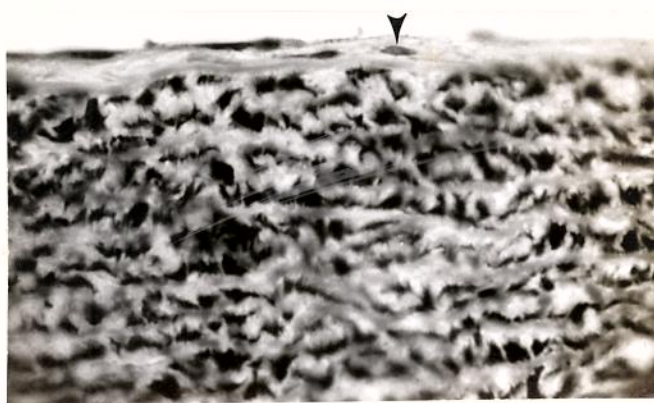


Fig. 7a. Grupo I, coelho 5. Aorta abdominal: notar o leve espessamento da íntima, com uma célula indiferenciada (seta), que tem à sua esquerda uma pequena célula muscular. Hematoxilina férrica de Heidenhain. 560x.

Tab.IX. Atividade enzimática na íntima e na média da aorta nos 3 grupos de animais.

COELHO Nº	ESPESSAMENTO DA ÍNTIMA			MÉDIA				CÉLULAS DOS ESPESSAMENTOS DA ÍNTIMA								
								Endoteliais				Musculares		Indiferenciadas		
Grupo I	Fosfatase ácida	Lipase-esterase	ATPase	DPN diaforase	Fosfatase ácida	Lipase-esterase	ATPase	DPN diaforase	Fosfatase ácida	Lipase-esterase	ATPase	DPN diaforase	Fosfatase ácida	Lipase-esterase	ATPase	DPN diaforase
	85	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	86	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	87	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grupo II	89	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grupo III	92	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	93	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	96	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- = reação negativa; + = reação muito fraca; + = reação fraca; ++ = reação moderada; +++ = reação intensa; dois sinais, por ex. -, + = presença de ambas as reações.

c) Células indiferenciadas: a atividade da fosfatase ácida é variável, sendo negativa ou mui fraca; a da lipase-esterase, negativa com ocasionais células mui fracamente positivas; quanto à ATPase há células negativas e células de mui fraca atividade; a atividade da DPN diaforase varia de intensidade mui fraca a moderada.

A atividade enzimática das células da camada média é a mesma que a das células musculares dos espessamentos da íntima (Tab.IX).

3.2.2. Grupo II (Controles com dieta de colesterol).

3.2.2.1. Camada média.

Dos 7 coelhos, 3 mostraram pequenas áreas de esclerose espontânea, geralmente calcificadas, em ambos segmentos da aorta, exceto no segmento B de um deles, que não as apresentou. Estas áreas de esclerose espontânea estão localizadas no terço interno da média (m.i.) quando no segmento A e nos terços médio (m.m.) e externo (m.e.), quando no segmento B.

Quanto às lacunas da média, são encontradas em todos animais, em ambos segmentos, exceto só no segmento A em um animal e só no segmento B noutro.

Os elementos constituintes destas lacunas, a frequência de localização nos segmentos A e B e a frequência nos respectivos terços da média são semelhantes aos dos coelhos controles sem colesterol. (Tabs. V, VI, VII e VIII, Grafs. 2, 3, 4 e 5).

3.2.2.2. Camada íntima.

Todos os coelhos mostraram espessamentos da íntima, cujos aspectos e frequência são semelhantes aos dos coelhos do Grupo I. O aspecto, entretanto, é diferente quanto e tão somente às células, nas áreas de espessamento onde há depósito lipídico. Este ocorre nos segmentos A e B de todos os coelhos.

Em dois coelhos (C.1 e C.84/75), porém, não há depósito em nenhum espessamento da íntima da aorta abdominal.

Não se nota depósito lipídico em áreas da íntima sem prévio espessamento (Ver a Figura 23), fato este mais evidente ao nível da aorta torácica descendente do coelho C.1/75, onde não há espessamento da íntima.

O depósito de colesterol se faz nas células endoteliais, na substância fundamental subendotelial e em células situadas entre a camada endotelial e a membrana elástica interna (musculares e indiferenciadas) (Tab.X). (Ver as Figuras 14 e 15). Tais células, inclusive as endoteliais, acham-se um pouco aumentadas de volume e são mais numerosas quando o depósito é maior (Ver as Figuras 22 e 23).

Em alguns coelhos notou-se depósito lipídico em espessamentos da íntima de óstios de ramos da aorta.

Também a camada média, subjacente ao depósito lipídico na íntima, mostra inconstante e raro acúmulo lipídico.

No fígado, as células de Kupfer apresentam depósito lipídico, de grau leve a moderado (Fig.8), apenas na metade dos animais, não ocorrendo nos restantes.

3.2.2.3. Histoquímica enzimática

O comportamento enzimático dos espessamentos da íntima e de suas próprias células é semelhante aos dos animais do Grupo I fazendo exceções: a atividade da ATPase, que é mais intensa nos espessamentos da íntima (passa de fraca para moderada); e a atividade fraca da DPN diaforase nas células musculares da íntima de um animal (no grupo I, moderada) (Tab. IX).

A atividade enzimática nas células vacuoladas da íntima varia (Tab.X). É, porém, constante a atividade da fosfatase ácida e da ATPase nas células musculares. A DPN diaforase não pode ser avaliada devido à difusão da enzima.

As células musculares da camada média apresentam atividade enzimática semelhante à da íntima, exceto a atividade fraca da DPN diaforase na íntima do animal C.89/75 -

Tab.X. Atividade enzimática nas células vacuoladas (lípidos) dos espessamentos da íntima.

COELHO Nº	ENDOTELIAIS			MUSCULARES			INDIFERENCIADAS		
	Fosfatase ácida	Lipase-es- terase	ATPase	Fosfatase ácida	Lipase-es- terase	ATPase	Fosfatase ácida	Lipase-es- terase	ATPase
Grupo II									
89	-	-	-, +	++	+	+++	-	-	+
90	-, +	+	-	++	+	+++	+	+	-
Grupo III									
92	-	-	+, +	+	+	++	+	-	+
93	-, +	-	-, +	+	+, +	+++	-	-, +	-
96	-, +	-, +	-, +	+, ++	+, +	+++	-, +	-, +	-, +

Para o significado dos sinais, ver a Tab.IX.

A atividade da DPN diaforase não pode ser avaliada devido a sua difusão.

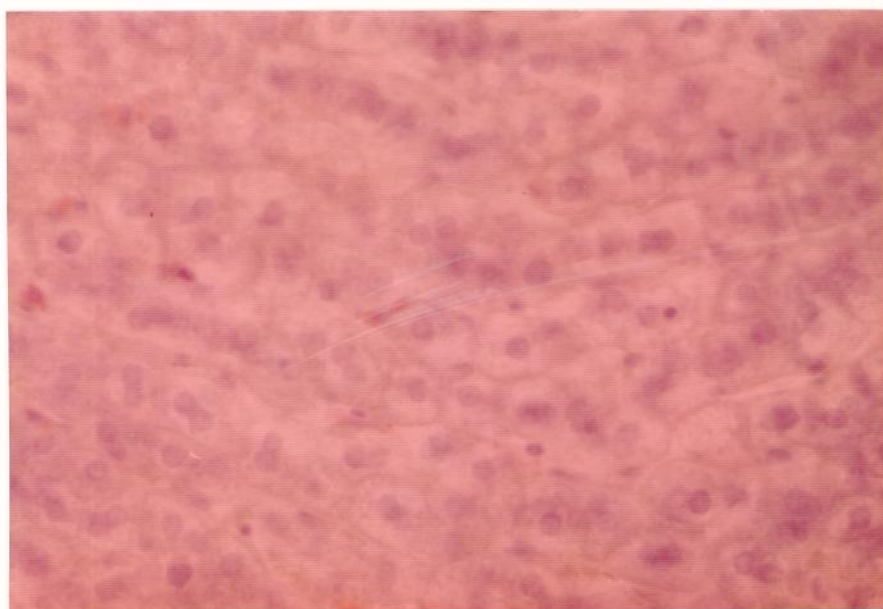


Fig. 8. Grupo II, coelho 89. Fígado: notar as poucas células de Kupfer com fagocitose de lípidos. Sudão IV-propileno glicol. 350x.

(Tab.IX).

3.2.3. Grupo III (com dieta de colesterol e colapso ortostático).

3.2.3.1. Camada média

Dos 15 coelhos, 6 apresentam áreas de esclerose espontânea da média, em geral calcificadas; quando não calcificadas a esclerose é constituída de tecido conjuntivo denso com espessas fibras colágenas. Dos 6 animais, apenas um não mostra esclerose no segmento A, 3 não a mostram no segmento B e 2 mostram-na em ambos.

Estas áreas de esclerose espontânea, quando pequenas, estão localizadas na m.i. do segmento A, podendo comprometer os demais terços, quando maiores. No segmento B são de médio e grande tamanho e localizam-se respectivamente na m.i. e m.m., e m.i., m.m. e m.e.

As lacunas estão presentes em todos coelhos, poupando apenas o segmento A do coelho C.92/75 e os segmentos B dos coelhos C.91 e C.95/75. Os constituintes destas lacunas são semelhantes aos dos coelhos do grupo I e II, havendo, porém, lacunas constituídas só de s.m., ou seja: predomínio de s.m. (7 animais); predomínio num mesmo animal ora de s.m., ora de colágeno (4 animais); lacunas constituídas só de s.m. (1 animal); lacunas constituídas predominantemente de colágeno, havendo simultaneamente lacunas só de s.m. (3 animais).

A frequência das lacunas no segmento A é mais ou menos a mesma dos coelhos anteriores. (Tab. V, Graf.2). Entretanto no segmento B, a frequência é diferente. (Tab. VI, Graf.3). Assim, enquanto que para os coelhos dos grupos I e II a frequência chega até uma cruz, para o grupo III ela atinge duas cruzes. Além disto, ao nível de uma cruz, há maior percentagem de coelhos no grupo III do que nos grupos I e II, ou seja há uma diferença de 31% daqueles sobre estes.

Nos três terços da média, a frequência de lacunas no segmento A mostra-se aproximadamente a mesma dos coelhos dos grupos I e II, enquanto em B observa-se: na m.i.,

a frequência de lacunas com uma cruz é maior (diferença de 24%) e também atinge duas cruzes (13%); há lacunas na m.m. com uma e duas cruzes de frequência que estão ausentes nos grupos I e II (Fig. 9); na m.e., existe a frequência de uma cruz, ausente nos grupos I e II.

3.2.3.1.1. Medionecrose pelo colapso

Dos 15 coelhos, 9 mostraram áreas de medionecrose. Apenas um coelho mostrou medionecrose no segmento A ; todos os demais apresentaram-na no segmento B. O tamanho destas áreas é variável, tendo as maiores a espessura de 1 a 3 espaços interlamelares e a extensão de 1.300 a 4.290 μ .

As áreas de necrose são caracterizadas na H.E. pela pobreza ou ausência de núcleos (Fig.10); assumem a forma de faixa quando maiores (Fig.11), ou distribuem-se de modo salpicado quando menores e numerosas. Localizam-se nas diversas porções da média, e preferencialmente em seu terço médio. No W.V.G. geralmente há nestas áreas colapso de lamelas elásticas, por perda das células musculares, e, mais raramente, dilatação dos espaços interlamelares (Fig.12). Na coloração pelo azul de toluidina, nas áreas onde há colapso de lamelas, a s.m. está reduzida em relação à média normal, e aumentada em quantidade, quando há dilatação daqueles espaços (Fig.13). Além da s.m., existem às vezes células e/ou fibras ou fibrilas elásticas e colágenas mal e/ou bem coradas.

3.2.3.2. Íntima

Todos os coelhos, que não mostraram em certas áreas depósito de colesterol na íntima ao exame macroscópico, mostraram-no, pelo menos em algumas delas, ao exame microscópico. Não apresentam, porém, depósito lipídico fora dos segmentos assinalados na macroscopia, os seguintes animais: C.28/75, aorta torácica descendente; C.33/75, aorta ascendente; C.75/75, C.92/75 e C.93/75 aorta abdominal; C.95/75, aorta ascendente, aorta torácica descendente e aorta abdominal.

Em alguns coelhos, nota-se depósito em espessamentos situados em torno de óstio de ramos da aorta.

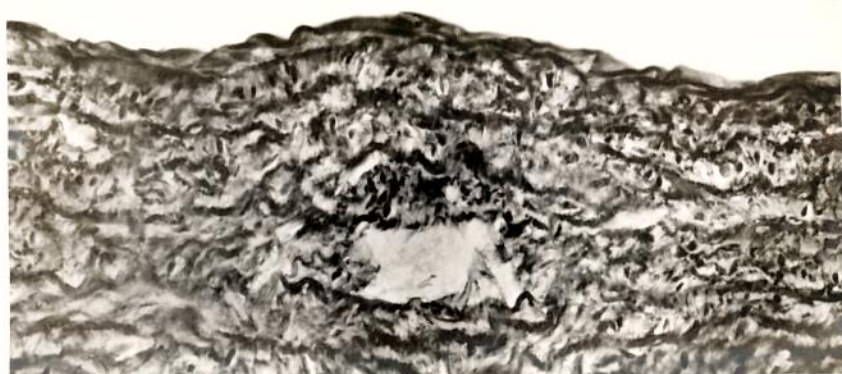


Fig. 9. Grupo III, coelho 34, aorta descendente (rolo): lacuna na camada média, contendo fibras mal coradas. Weigert-van Gieson. 350x.



Fig. 10. Grupo III, coelho 94, aorta descendente (rolo): medionecrose causada pelo colapso ortostático, caracterizada pela perda de núcleos. Hematoxilina-eosina. 350x.



Fig. 11. Grupo III, coelho 93, aorta descendente (segmento B): área de necrose pelo colapso no terço interno da camada média, caracterizada pelo caráter frouxo e lacunar. Hematoxilina-eosina. 350x.

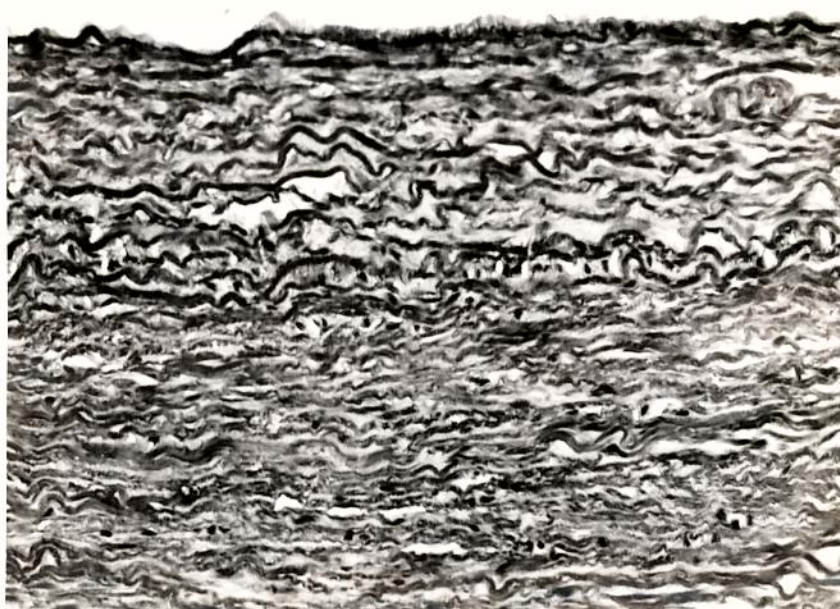


Fig. 12. Grupo III, coelho 79, aorta descendente (segmento B): área de medionecrose pelo colapso caracterizada por condensação das lamelas elásticas na metade inferior da Figura. Weigert-van Gieson. 350x.

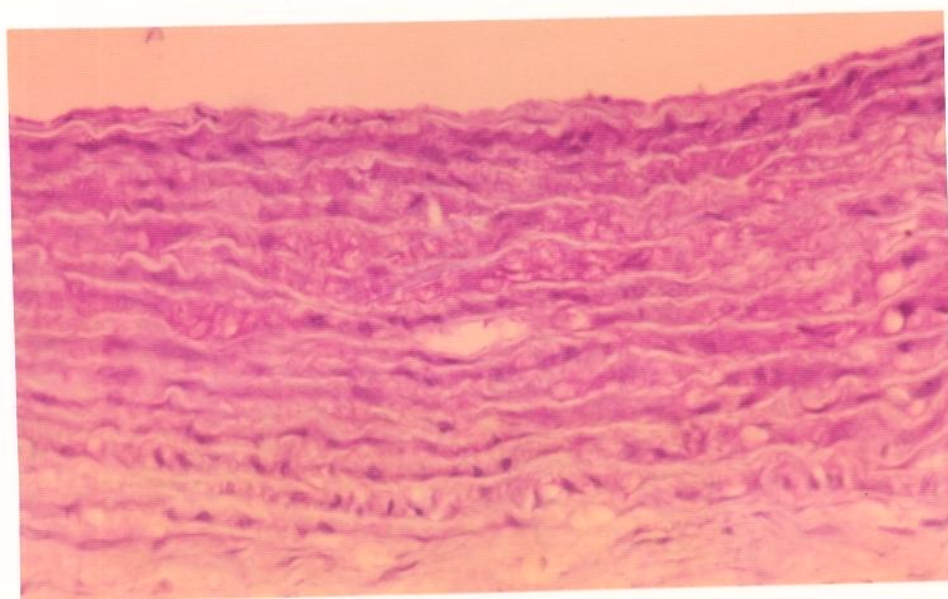


Fig. 13. Grupo III, coelho 94, aorta descendente ao nível da mesma área vista na Figura 10: notar, além da perda de núcleos na camada média, os espaços interlamelares ocupados por substância metacromática. Azul de toluidina. 350x.

Também ocorre depósito lipídico nas células de Kupfer do fígado de 6 animais de grau leve a moderado.

A estrutura dos espessamentos da íntima é semelhante à dos animais do grupo II, tanto os com depósito lipídico como os sem depósito (Figs. 22 a 24).

O depósito lipídico ocorre, como nos coelhos do grupo II, em células endoteliais, na substância fundamental subendotelial e nas demais células do espessamento da íntima (Fig. 14 e 15).

Eventualmente, há depósito na média subjacente à íntima e em um coelho houve depósito em ocasionais células da m.i., m.m. e m.e.

3.2.3.3. Histoquímica enzimática

O comportamento enzimático dos espessamentos da íntima e de suas células é semelhante ao dos animais do Grupo I e II, fazendo exceção (Tab.IX).(Figs.16 a 21): ausência de atividade da lipase-esterase na íntima de um animal e em trechos da íntima de outro; a ATPase na íntima comporta-se como no Grupo II, isto é, algo mais intensa do que no Grupo I; a reação fraca da ATPase em células endoteliais de dois animais (nos outros, reação mui fraca ou negativa); comportamento semelhante da fosfatase ácida nas células indiferenciadas de um animal.

A atividade enzimática nas células vacuoladas dos espessamentos da íntima é variável como no Grupo II (Tab. X).(Figs.17,19 e 20). Comparativamente a este grupo, a atividade da fosfatase ácida não é constante, permanece, porém, constante a atividade da ATPase. A DPN diaforase só pode ser avaliada no animal C.96/75 cuja atividade é moderada nas células musculares da média e mui fraca nas células endoteliais da íntima (Tab. X). (Fig.21). Nos demais animais a DPN diaforase não pode ser avaliada devido à difusão da enzima.

As células musculares da camada média mostram atividade enzimática semelhante à das células musculares da íntima, exceto a fosfatase ácida de atividade mais fraca nas últimas em 2 dentre 3 animais (Tab.IX).

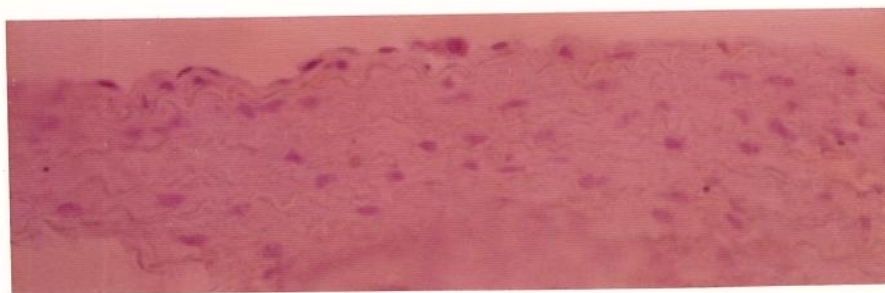


Fig. 14. Grupo III, coelho 30, aorta abdominal: nítida célula endotelial contendo depósito lipídico no citoplasma. Sudão-propileno glicol. 350x.

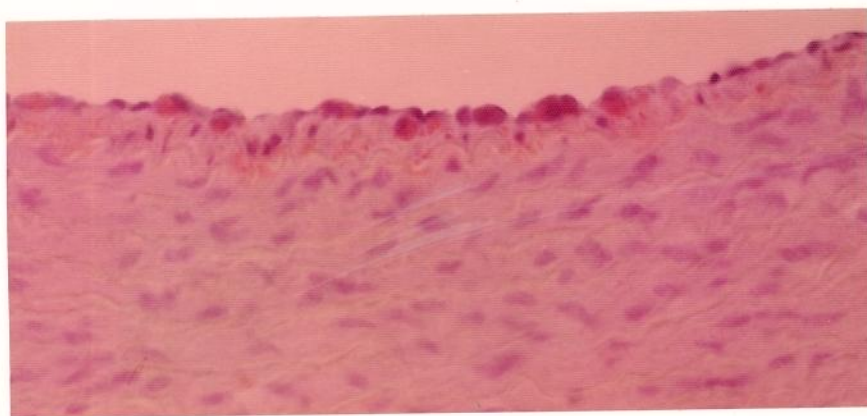


Fig. 15. O mesmo coelho da Figura anterior (aorta torácica descendente): depósito lipídico em células endoteliais, subendoteliais e na substância fundamental da íntima. Sudão-propileno glicol. 350x.

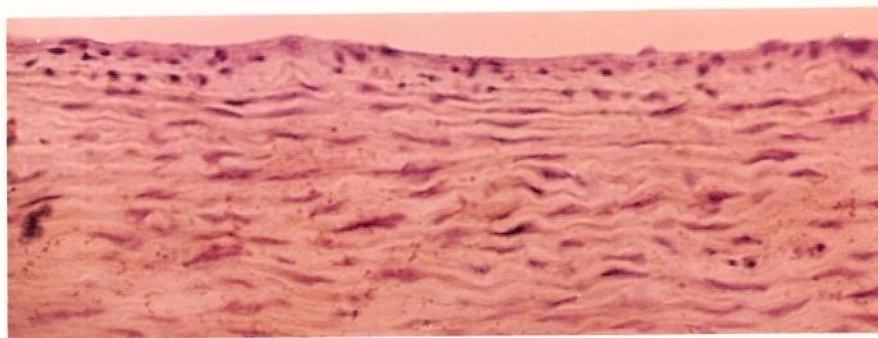


Fig. 16. Grupo III, coelho 96, aorta:moderada atividade da fosfatase ácida ao nível da camada média e atividade muito fraca da íntima. Método do chumbo de Gomori para fosfatase ácida. 350x.

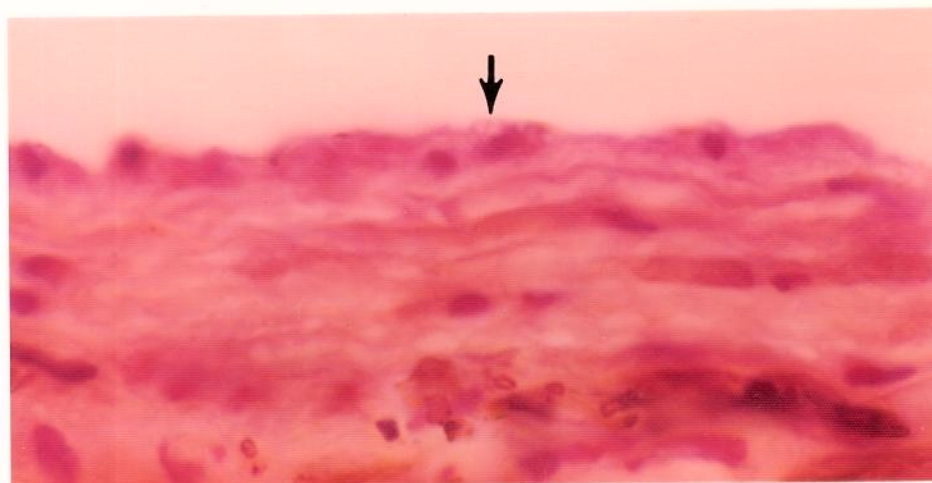


Fig. 17. Grupo III, coelho 93, aorta: a atividade da fosfatase ácida é muito fraca nas células vacuoladas da íntima (uma indicada pela seta) e fraca nas células musculares da mesma camada. (As áreas escuras são de calcificação espontânea da média). Método do chumbo de Gomori para fosfatase ácida. 1400x.

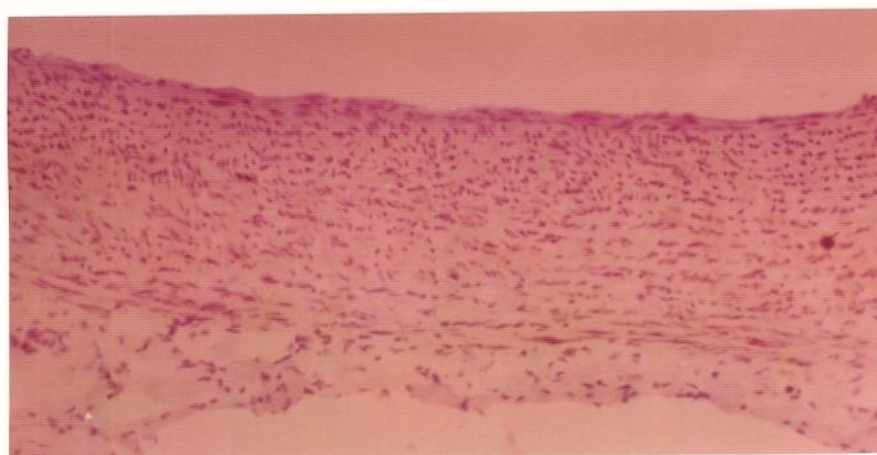


Fig. 18. Grupo III, coelho 96, aorta: atividade fraca da lipase-esterase na camada média e inatividade na íntima. Método de Gomori pelo "tween" 80. 140x.

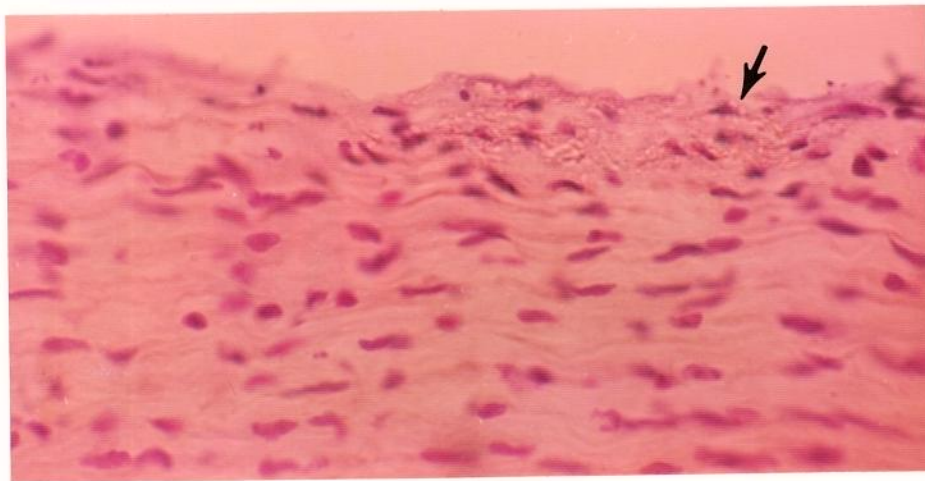


Fig. 19. Grupo III, coelho 93, aorta: atividade fraca da lipase-esterase na camada média e muito fraca em célula vacuolada (lípidos) da íntima (seta). Método de Gomori pelo "tween" 80. 560x.

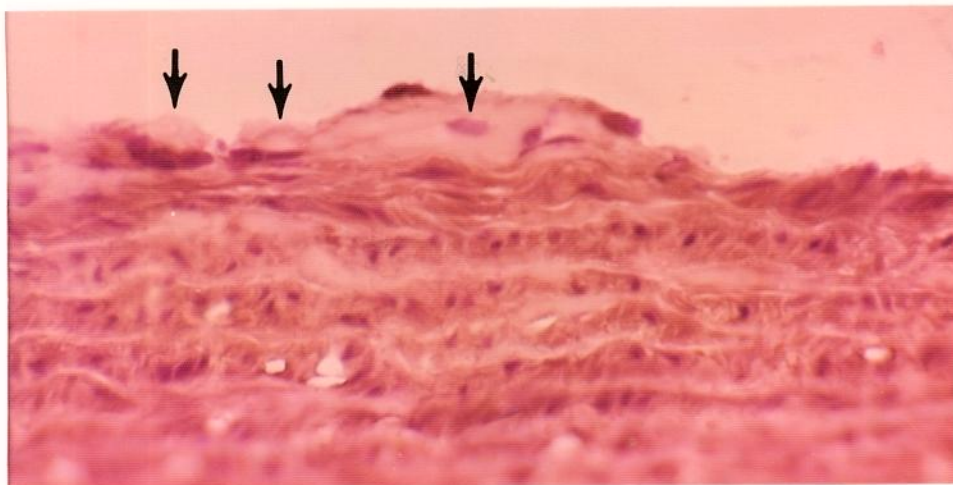


Fig. 20. Grupo III, coelho 92, aorta: atividade intensa da ATPase na camada média, fraca em células vacuoladas (setas à esquerda) e inatividade na célula indiferenciada da íntima (seta à direita). Método do cálcio para adenosina trifosfatase. 560x.

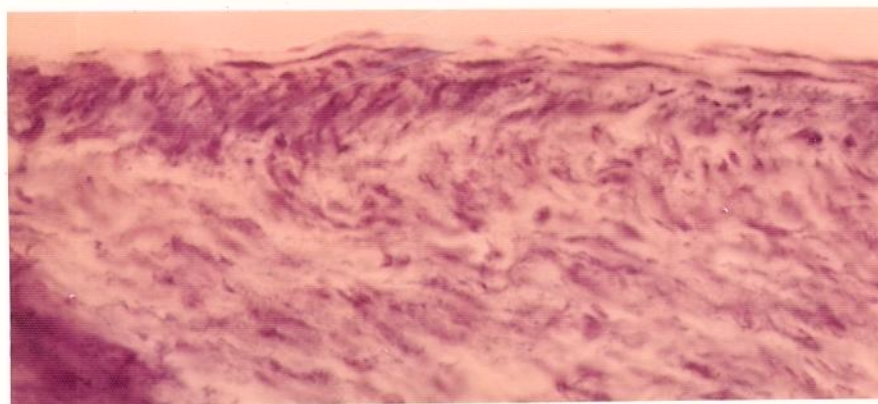


Fig. 21. Grupo II, coelho 90, aorta: atividade intensa da DPN diaforase na camada média e atividade fraca a moderada no espessamento da íntima. Método do tetrazólio para DPN diaforase. 350x.

4. DISCUSSÃO

4.1. Finalidades do trabalho

Este trabalho confirma, na raça de coelhos "Norfolk," linhagem "cross," os resultados de nosso trabalho anterior (47). Nesse a raça utilizada foi a Nova Zelândia branca e a mista desta com "Chinchilla". O colesterol é depositado em áreas de prévio espessamento espontâneo da íntima da aorta (Figs. 22 a 24). Tal conclusão fundamenta-se no fato de que o aspecto histológico dos espessamentos com depósito é igual aos dos espessamentos espontâneos dos animais controles sem depósito. Diferem, porém, uns dos outros apenas naquilo que se relaciona com os lípidos, que são depositados na substância fundamental e em células da íntima. Além disto, numa mesma aorta há áreas de espessamentos com depósito e outras sem depósito (Fig. 24).

O depósito lipídico nos espessamentos da íntima é precoce e não após a sobrecarga do sistema retículo—endotelial do fígado, baço, medula óssea e supra-renais como referido por Duff (15). Em nossos coelhos o depósito lipídico nas células de Kupfer do fígado era discreto e só atingia algumas células (Fig.8).

Os lípidos depositados podem estimular a proliferação conjuntiva da íntima, que é tardia, quando o acúmulo de células espumosas atinge certo grau (36) e após vários meses (67). O sulfato radioativo, como indicador de mucopolissacarídes ácidos sulfatados, que entram na composição do colágeno, tem pouca propensão de se acumular na íntima da artéria do animal até 45 dias de dieta com colesterol (18). Só se forma cápsula fibrosa na placa de células espumosas pela interrupção da dieta de colesterol, cápsula esta iniciada a partir do 6º mês (10). A hipercolesterolemia retarda e altera a hiperplasia, havendo pobreza de fibras elásticas e degeneração hialina prematura das fibras colágenas (26).

Schenk e colaboradores (54) mencionam proliferação conjuntiva já depois de 8 semanas com a dieta de coles



Fig. 22. Grupo III, coelho 78, segmento A da aorta: nítidas células vacuoladas em leve espessamento da íntima. Hematoxilina-eosina. 350x.

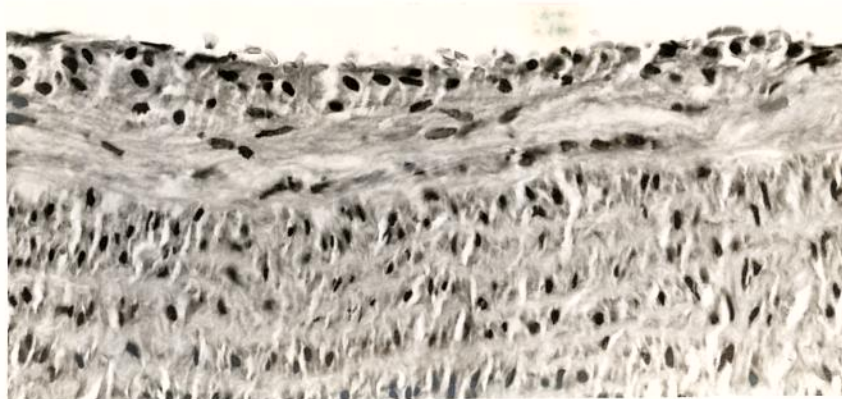


Fig. 23. Grupo III, coelho 96, aorta descendente: acúmulo de células (contendo lípidos) acima de espessamento da íntima constituído de células musculares. Hematoxilina-eosina. 350x.

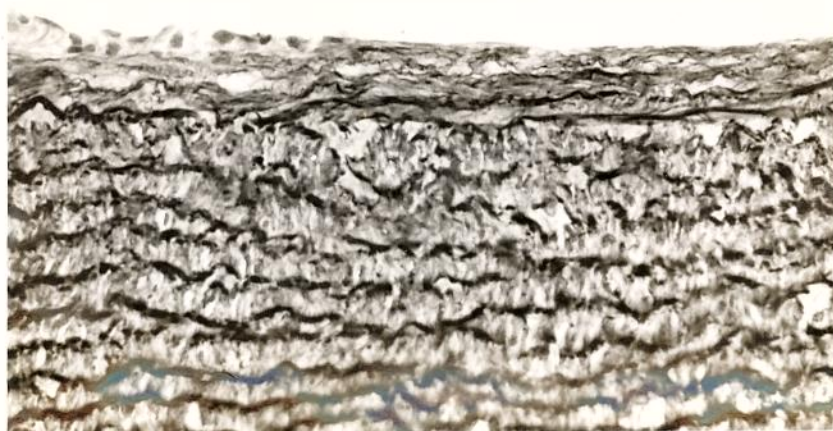


Fig. 24. O mesmo coelho da Figura anterior em área próxima: à direita espessamento espontâneo sem células com depósito lipídico, que estão presentes à esquerda. Weigert-van Gieson. 350x.

terol. Admitimos, porém, baseados em nossos resultados, que tal proliferação conjuntiva seja pré-existente e não causada pelos lípidos depositados.

Os animais que sofreram o colapso não apresentaram maior frequência de espessamentos hiperplásicos na íntima, como se esperava, baseando-se nos trabalhos anteriores de Lopes de Faria. Este observou espessamentos intensos da íntima da aorta (39,45) e artérias coronárias (42) após o colapso, secundários à medionecrose extensa. Esta não fora vista em nossos animais com tal intensidade e conseqüentemente a hiperplasia secundária da íntima não ocorrera ou confundira-se com os espessamentos espontâneos.

Entretanto, o depósito lipídico na íntima foi mais freqüente nos animais que sofreram o colapso do que naqueles que não sofreram (Grafs. 1A e 1B, Fig.2). Explica-se a maior frequência nos primeiros animais pela maior permeabilidade do endotélio da aorta aos elementos do sangue, inclusive o colesterol, causada por anoxia (33,34) ou pelo colapso (25).

O colapso lesa a parede arterial por perturbação de sua nutrição e principalmente por anoxia (Lopes 1955). Nas fases aguda e sub-aguda da medionecrose a camada endotelial é lesada e torna-se mais permeável (39,40,45). Assim o fator lesivo da parede arterial, favorecedor do depósito lipídico, foi o colapso.

Além do colapso, conhecem-se ainda vários outros fatores lesivos, favorecedores do depósito lipídico, como imobilização mecânica da parede arterial (64), hipertensão arterial postural (65), congelamento (32), mínimo trauma mecânico da íntima (23), água fisiológica quente sobre a íntima (11), ação da adrenalina, reação imune (50) etc. (62).

Também a anoxia pelo colapso deve ser um fator que favorece o depósito de lípidos na íntima por dificultar a remoção deles. Por causa da anoxia há deficiente síntese de fosfolípidos e de proteínas necessárias a esta remoção (14).

Não há dúvida de que os animais submetidos ao colapso apresentaram medionecrose da aorta, evidenciada por áreas necróticas maiores e pela maior frequência de lacunas na aorta torácica descendente (Fig.10 e 13). As lacunas, além de mais freqüentes, localizaram-se preferencialmente no terço mé-

dio da média (ver adiante). As células musculares nesta localização sofrem mais o efeito do distúrbio nutritivo, principalmente anóxico, durante o colapso, do que as células dos terços interno e externo (39).

A aorta descendente é mais adequada para avaliar a medionecrose pelo colapso do que a ascendente e o arco, por ser mais extensa a parte examinada e as lacunas espontâneas serem menos freqüentes, conforme os resultados deste próprio trabalho.

Do exposto, admitimos que, na aorta descendente, uma parte das lacunas da média é espontânea e a outra parte é consequência da necrose pelo colapso. As últimas formam-se após absorção das células musculares necróticas (39). Também apóia a origem de parte das lacunas pelo colapso o predomínio de lacunas mais jovens, constituídas principalmente de substância metacromática (Fig.9).

Para o exame microscópico da aorta evitamos tirar fragmentos nas áreas de calcificação espontânea porque a íntima suprajacente a estas áreas dificulta a aterosclerose da íntima (22); e, quando as áreas de calcificação eram microscópicas, também evitamos examiná-las.

4.2. Histoquímica enzimática

O estudo histoquímico enzimático foi feito com a finalidade de se ter mais um elemento para reconhecer as células dos espessamentos hiperplásicos da íntima. Realmente, os tipos de células reconhecidos nestes espessamentos através das colorações clássicas (28) e da ultramicroscopia (31,57,62) são facilmente distintos pela atividade enzimática (Tab.IX e X) (Fig.17,20): endotélio, células musculares e células mesenquimatosas indiferenciadas. As últimas têm outros nomes, tais como: célula subendotelial, célula endotelial modificada, célula monócitoide, macrófago da íntima etc (62). São semelhantes a fibroblastos (Fig.7a) e formam células musculares, fibras colágenas e elásticas (45).

Ultimamente, só se admite que quase só a célula muscular seja a depositária de lípidos (3,29,52,56) por se lhe atribuírem múltiplas funções, dentre as quais formação

de mucopolissacárides ácidos, fibras reticulínicas, colágenas e elásticas e síntese de lípidos (62). Este trabalho, porém, mostra, de modo claro, que, além das células musculares, células endoteliais e células indiferenciadas armazenam lípidos (Tab.X) . (Figs.14,15,17 e 20). Esta afirmativa baseia-se no reconhecimento destes tipos de células através de sua topografia na íntima, de seu aspecto nas colorações clássicas e da citoquímica enzimática, comparativamente às células normais, sem a vacuolização lipídica.

Portanto, o trabalho apóia os poucos autores que, ultimamente, descrevem outras células, e principalmente macrófagos, além das musculares, como depositárias de lípidos (3, 6,9,57,58). É possível que macrófagos participem em fase mais tardia, na qual apareceriam as células mononucleadas referidas por Anitschkow. Se já existem raros macrófagos nos espessamentos da íntima na fase precoce deste trabalho, não sabemos. A histoquímica e a citoquímica enzimática dos espessamentos, porém, são contrárias à existência de macrófagos (Tab.IX e X), pois nos macrófagos fagocitando lípidos há maior atividade da fosfatase ácida, principalmente quando são células menores (67), e da lipase-esterase (9). A atividade maior de tais enzimas não foi observada aqui.

Na aterosclerose experimental do coelho descreve-se aumento da atividade da fosfatase ácida (1) e da esterase não específica (1,6,9) nas células espumosas da íntima ou nas células musculares da íntima (62). Como a lipase também é demonstrada com o "tween" (1), é preferível dizer-se as enzimas lipase e esterase (49); tais enzimas têm ação lipolítica na aorta (67). Posteriormente, com o desenvolvimento de fibrose na placa aterosclerótica, a fosfatase ácida e a esterase diminuem sua atividade (9). O comportamento da ATPase é variado: diminuída na íntima na fase inicial da aterosclerose experimental para uns (9,67) e aumentada para outros (19); para aqueles, aumentaria de atividade posteriormente e para estes decairia.

A lesão de células musculares causa-lhes a diminuição da ATPase (67) e ativação da DPN diaforase (62). A diminuição de ATPase, por sua vez, reduz a remoção de lípidos esclerogênicos (67).

Neste trabalho, observou-se que a atividade enzimática nos espessamentos da íntima com depósito lipídico, como um todo e em suas próprias células de modo particular, permanece a mesma que a dos animais sem colesterol na dieta. As poucas diferenças assinaladas na Tabela IX entre os animais do grupo I sem receber colesterol e os dos grupos II e III, recebendo-o, bem como entre as células vacuoladas dos últimos grupos e as não vacuoladas do grupo I (Tab.X), não nos parecem relevantes. Talvez seja relevante a maior atividade da ATPase nos espessamentos dos animais que ingeriram colesterol (grupos II e III), que passou de reação fraca para reação moderada; e também a maior atividade da lipase-esterase que passou nas células musculares da íntima de intensidade muito fraca para fraca (Tab.IX).

A diferença entre as células vacuoladas da íntima (pelo depósito lipídico) e as células não vacuoladas também não é relevante, a não ser, talvez, a maior atividade da ATPase nas células musculares vacuoladas, cuja atividade passou de moderada em animais do grupo I para intensa nos grupos II e III (comparar a Tab.X com a Tab.IX).

Outras diferenças entre o comportamento enzimático das células vacuoladas e as não vacuoladas ainda são menos distintas, inconstantes e desprezíveis: nas células vacuoladas, a atividade da ATPase é mais positiva nas células endoteliais (de $\pm$ para $+$), a fosfatase ácida menos positiva nas células musculares (de $+$ para $\pm$) e a lipase-esterase mais positiva também nas células musculares (de $\pm$ para $+$) (Tab.IX e X).

Segundo Vellican, no estado atual de nosso conhecimento, não se pode concluir se as alterações enzimáticas descritas pelos autores são primariamente responsáveis pelo aparecimento de aterosclerose ou se se desenvolvem secundariamente. Os nossos resultados apóiam a última hipótese.

4.3. Lesões espontâneas da aorta

Os coelhos desta experiência pertencentes ao grupo I, mas também os dos grupos II e III, apresentaram com mais frequência espessamentos espontâneos da íntima do que os animais de nosso trabalho anterior (47). A causa destes espessamentos é discutida e várias hipóteses foram aventadas (62). Ad

mitimos, baseados nos trabalhos de Lopes de Faria (39,41,42,43), que sejam secundários à necrose espontânea na camada média, manifestadas por lacunas nesta camada (ver abaixo), de caráter hiperplásico e reparador. A diminuição em frequência dos espessamentos da íntima em sentido distal, como sói acontecer com as lacunas espontâneas na camada média, observada neste trabalho, também apóia a origem de tais espessamentos como resposta à lesão da camada média.

A variação de frequência dos espessamentos da íntima também é observada noutros trabalhos da literatura (48,67) e é vista no próprio homem (43,44). Dahme não cita a existência de espessamentos na íntima da aorta do coelho. É possível mesmo que a baixa incidência de espessamentos espontâneos seja um dos fatores responsáveis pela dificuldade em se produzir a aterosclerose em certos coelhos pela dieta de colesterol (55), ou o seu aparecimento só em tempos mais tardios, como seja, só após a 4ª semana de dieta (67).

Os resultados deste trabalho são também importantes para se pôr em destaque as lacunas ou lagos, de ocorrência espontânea, na camada média e a topografia das lesões da esclerose ou calcificação espontânea da aorta do coelho.

Aquelas lacunas são referidas por outros autores, se bem que haja muita variação de incidência conforme a linhagem de animais (53). Talvez por isto, elas não sejam citadas por Dahme. Os autores, porém, não mencionam sua topografia ao longo da aorta. Os nossos resultados mostram que estão presentes em todos os animais e são mais frequentes na parte proximal da aorta do que na distal (Graf.2 e 3). São numerosas na aorta ascendente e arco aórtico e raras na aorta descendente (Fig.5). Localizam-se preferencialmente no terço interno da camada média da aorta (Graf.4 e 5), como referiram Sckenk e colaboradores (53). O mesmo comportamento mostra a calcificação espontânea da aorta com relação à distribuição ao longo dela (Fig. 1) e à localização na média das lesões iniciais. Em nossos animais de idade baixa (entre 6 e 8 meses), a calcificação espontânea, de incidência muito variada (38), ocorreu em 44,7% deles (13 animais dentre 29).

As lacunas da camada média precedem a fibrose e a calcificação (38,53). Também admitimos, como para o

colapso (39), que a causa da necrose focal da média, responsável pela formação de lacunas, seja um distúrbio nutritivo, desta camada, principalmente anóxico.

A contribuição que este trabalho trouxe ao conhecimento da aterosclerose experimental do coelho com eventual aplicação aos problemas da doença humana está mencionada nas conclusões .

4.4. Problemas da aterosclerose

A grande pergunta na aterosclerose experimental do coelho e na doença humana é:

Por que o colesterol que penetrou na íntima nela se deposita e não é eliminado ? Sai do âmbito deste trabalho discutir as hipóteses aventadas para a explicação do fenômeno e para isto deve-se recorrer à copiosa literatura existente (62). Em nosso Departamento, baseando-se em trabalhos anteriores de Lopes de Faria (39,41,42,43,44) e do próprio autor (47), defende-se a hipótese de que a perturbação do metabolismo do colesterol na parede arterial seja o fator mais importante responsável pelo depósito.

Também são importantes na aterogênese outras questões como as barreiras oferecidas pela parede arterial à penetração do colesterol, o aumento da permeabilidade da íntima, o transporte lipídico através do endotélio e da própria parede arterial (1,62). Consideramos, porém, estas questões como de menor importância do que a anteriormente formulada, uma vez que admitimos que a lesão da camada média seja mais responsável pela maior permeabilidade da íntima e conseqüente penetração do colesterol na parede.

5. RESUMO

Neste trabalho foram empregados 29 coelhos da raça "Norfolk cross", divididos em 3 grupos: I. controles, 7 animais; II. com dieta de colesterol, 7 animais e III. com dieta de colesterol e colapso ortostático, 15 animais. A duração da experiência foi entre 4 e 11 semanas.

Todos os animais receberam uma ração estandarizada, própria para coelhos.

O colesterol foi administrado por sonda gástrica em dias alternados e em quantidade em torno de 1 g, durante todo o período de experimentação.

Semanalmente retirava-se sangue para a dosagem de colesterol total no soro e procurava-se manter o nível de colesterol em torno de 3 a 4 vezes o valor normal.

O colapso ortostático foi produzido uma semana após o início da dieta de colesterol.

Os animais foram sacrificados com uma pancada na nuca, seguida de secção dos vasos do pescoço. A necropsia foi imediata, tendo sido retirada toda a aorta e fixada durante 24 horas. A seguir ela foi corada pelo sudão IV para o exame macroscópico.

De cada segmento da aorta foram retirados fragmentos transversos para cortes em congelação a fim de serem corados pelo sudão IV-propileno glicol; também do fígado foi feito um corte em congelação e corado pela mesma técnica. Toda a sobra dos fragmentos da aorta e as porções dela restantes foram incluídas em parafina, cortadas e feitas as várias colorações.

Para o estudo histoquímico enzimático, utilizaram-se 8 coelhos, sendo 3 do grupo I, 2 do grupo II e 3 do grupo III. Para tanto, toda a aorta ascendente e o arco eram cortados e congelados imediatamente após a retirada da aorta em nitrogênio líquido e, a seguir, procederam-se os diversos métodos para as enzimas.

Não houve depósito lipídico na íntima da aorta de todos os coelhos normais, sem dieta de colesterol, em contraposição a todos os coelhos que receberam colesterol. Nes

tes, houve depósito em todos, de frequência decrescente na aorta em sentido distal.

Os coelhos dos grupos I e II mostraram lacunas na camada média de mesma constituição e frequência. Entretanto, nos coelhos do grupo III, por causa do colapso, houve, além de áreas mais extensas de necrose, maior frequência destas lacunas na aorta descendente. Em todos os grupos as lacunas da média diminuíram de frequência em sentido distal.

Na íntima da aorta, nos 3 grupos de animais, ocorreram espessamentos de intensidade variada, geralmente frequentes, diminuindo, porém, irregularmente, no sentido distal da aorta. Estes espessamentos são de constituição histológica semelhante, hiperplásicos, diferindo apenas os espessamentos pelo depósito de lípidos.

O estudo histoquímico enzimático pela fosfatase ácida, lipase-esterase, ATPase e DPN diaforase permitiu a caracterização dos tipos celulares dos espessamentos da íntima.

6. CONCLUSÕES

6.1. Em coelhos com hipercolesterolemia 3 a 4 vezes o valor normal e com a duração de 4 a 11 semanas, o depósito lipídico na aorta se faz sempre sobre espessamentos prévios da camada íntima.

6.2. O colapso ortostático predispõe à aterosclerose experimental do coelho, avaliada pela maior frequência do depósito lipídico na íntima.

6.3. A atividade das enzimas adenosina trifosfatase, difosforopiridina nucleótide-diaforase, fosfatase ácida e lipase-esterase não está alterada no início do depósito de colesterol.

6.4. O depósito de colesterol na íntima se faz inicialmente em células endoteliais, na substância fundamental subendotelial, em células mesenquimatosas indiferenciadas e em células musculares e não somente nestas.

6.5. A maior ou menor susceptibilidade da média da aorta do coelho ao colapso, avaliada pela necrose, varia conforme a raça do animal.

6.6. Na camada média da aorta do coelho, ocorrem espontaneamente lacunas em toda a sua extensão. Tais lacunas diminuem em frequência distalmente e localizam-se, de preferência, no terço interno da camada média.

6.7. A frequência de esclerose espontânea da aorta (calcificação da média) é maior no arco aórtico (60%) e diminui em sentido distal. Como, para as lacunas da camada média, a esclerose atinge preferencialmente, em seu início, o terço interno desta camada.

6.8. Nos coelhos experimentados ("Norfolk

cross") é constante e freqüente a ocorrência de espessamentos espontâneos na íntima da aorta, de natureza hiperplásica.

6.9. As lacunas espontâneas na média da aorta do coelho são atribuídas à medioneecrose e os espessamentos da íntima secundários a esta.

7 - REFERÊNCIAS

1. Adams, C.V.M.: Vascular Histochemistry. Chicago, Year Book Medical Publishers, 1967, p.83, 314.
2. Adams, C.V.M.; O.B. Bayliss; e M.Z. Ibrahim: A hypothesis to explain the accumulation of cholesterol in atherosclerosis. *Lancet* 1: 890-892, 1962.
3. Adams, C.V.M.; O.B. Bayliss; e D.R. Turner: Phagocytes, lipid-removal and regression of atheroma. *J.Path.* 116: 225-238 , 1975.
4. Anitschikow, N.N.: A history of experimentation on animal atherosclerosis. Em Cowdry's Arteriosclerosis. A Survey of the Problem. Edit. by H. T. Blumenthal. Springfield, Ill., Charles C. Thoma, 1967, p.21.
5. Anitschkow, N. e S. Charlatov: Über experimentelle Cholesterinsteatose und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. *Centralbl. allg. Path. u. path. Anat.* 24: 1-9, 1913.
6. Barbolini, G.; A. Botticelli, e S. Boticelli: On the origin of foam cells in cholesterol-induced atherosclerosis of the rabbit. *Virchows Arch. Abt. B Zellpath.* 3: 24-32, 1969.
- 6a. Barka, T. e P.J. Anderson: Histochemistry. New York, Harper & Row, Publishers, Inc. 1963, p.311.
7. Birge, W.J. e F.D. Tibbits: The use of sodium chloride fixatives in minimizing cellular distortion in histochemistry and cytochemical preparations. *J. Histochem. & Cytochem.* 9: 409-414, 1961.
8. Buck, R.C.: Lesions in the rabbit aorta produced by feeding a high cholesterol diet followed by a normal diet. An electron microscopic study. *Brit. J. Exper. Path.* 43: 236-240, 1962 .
9. Cavallero, C.; E. Turolla e E. Solcia: Aterosclerosi umana e sperimentale ricerche di enzimoistochimica. *Riv. di Istochim. norm. e patol.* 9: 5-50, 1963.
10. Constantinides, P.: Experimental Atherosclerosis. Amsterdam,

Elsevier Publishing Company, 1965, p.25.

11. Courtice, F.C. e A. Schmidt-Diedrichs: Lipid deposition in the injured wall of the carotid artery in the hypercholesterolaemic and hyperlipaemic rabbit. *Quart. J.Exper. Physiol.* 47: 228-237, 1962.
12. Dahme, E.: *Em Handbuch d. spez. path. Anat. d. Haustiere*, editado por Joest, Berlin, Verlag Paul Parey, 1962, p.262.
13. Dayton S. e S. Hashimoto: Recent advances in molecular pathology: a review . Cholesterol flux and metabolism in arterial tissue and in atheromata. *Exp. & Mol. Path.* 13:253-268, 1970.
14. Dixon, K.C. : Deposition of globular lipid in arterial cells in relation to anoxia. *Am. J. Path.* 39: 65-74, 1961.
15. Duff, G.L.: Experimental cholesterol arteriosclerosis and its relationship to human arteriosclerosis. *Arch.Path.* 20: 81-123; 259-304, 1935.
16. Duff, G.L.: The nature of experimental cholesterol arteriosclerosis in the rabbit. *Arch. Path.* 22: 161-182, 1936.
17. Duff, G.L., G.C. MacMillan e A.C. Ritchie: The morphology of early atherosclerotic lesions of the aorta demonstrated by the surface technique in rabbits fed cholesterol. *Am. J. Path.* 33: 845-873, 1957.
18. Forman, D.T.; S. Shik; e C.B. Taylor: Sulfate content of aortic wall in experimentally induced atherosclerosis. *Arch. Path.* 85: 80-88, 1968.
19. Fouquet, J.P.: Dépôt expérimental de cholesterol dans l'aorte du lapin, modifications histoenzymologiques correlatives. *Ann. Histochem.* 6: 153-178, 1961.
20. Gomori, G.: *Microscopic Histochemistry*. Chicago. The University of Chicago Press, 1952, p.193,205.
21. Gore, I. e R. Barr: Mucopolysaccharides and experimental atherosclerosis in rabbits. *Labor. Investig.* 8: 395-402 , 1959.
22. Gore, I. e M.L. Goodman: Intimal thickening and dietary

- atherosclerosis. Arch. Path. 84: 49-53, 1967.
23. Gutstein, W.H.; A Lazzarini-Robertson Jr. e J.N. Lataillade: The role of local arterial irritability in the development of arterio-atherosclerosis. Am.J.Path. 42: 61-71, 1963.
 24. Hass, G.M., W. Landerholm e A. Hemmens: Production of cal cific athero-arteriosclerosis and thromboarteritis with nicotine, vitamin D and dietary cholesterol. Am. J. Path. 49: 739-771, 1966.
 25. Haus, W.H.; Junge-Hülsing; J.K. Matthes; e W. Wirth. "Über den Einfluss von Schock und Hyperlipidämie auf den Lipidgehalt, die Lipidsynthese und die Mucopolysaccharid-synthese der Gefäßwand. J.Atheroscl.Res. 5: 451-465, 1965.
 26. Haust, M.D.: Injury and Repair in the Pathogenesis of Atherosclerotic Lesions. Em Atherosclerosis, Proc. Second Internat. Symposium, editado por R.J. Jones. New York, Springer-Verlag, 1970, p.12.
 27. Haust, M.D.: The morphogenesis and fate of potential and early atherosclerotic lesions in man. Human Path. 2: 1-29, 1971.
 28. Haust, M.D.; R.H. More; e H.Z. Movat: The role of smooth muscle cells in the fibrogenesis of arteriosclerosis. Am. J. Path. 37: 377-389, 1960.
 29. Holle, G.; J. Massmann e H. Weidenbach: Experimentally in duced aerly changes in arteries. Path. Europ. 9: 125-132, 1974.
 30. Holman, R.L.; H.C. McGill Jr.; J.P. Strong; e J.C. Geer : Technics for studying atherosclerotic lesions. Labor. In- vestig. 7: 42-47, 1958.
 31. Imai, H.; T. Lee; S. Pastori; E. Panlilio; R. Florentin; e W. A. Thomas: Atherosclerosis in rabbits. Architectural and subcellular alterations of smooth muscle cells in res- ponse to hiperlipemia. Exp. & Molec. Path. 5: 273-310, 1966.
 32. Kelly Jr., F.B.; C.B. Taylor e G.M. Hass: Experimental atheroarteriosclerosis. Localization of lipids in experi- mental arterial lesions of rabbits with hypercholestere -

- mia. Arch. Path. 53: 419-436, 1952.
33. Kerényi, T.; G. Horvath, Z. Detre; S. Kurunczi; e H. Jellinek: Permeability of the post-ischemic rat aorta. Acta morph. Acad. Sci. Hung. 23: 83-93, 1975.
 34. Kjeldsen K e H. K. Thomsen: The effect of hypoxia on the fine structure of the aortic intima in rabbits. Labor. Investig. 33: 533-543, 1975.
 35. Klotz, O.: Vascular changes following intravenous intravenous injections of fat and cholesterin. J. Med. Res. 33: 157-170, 1915-1916.
 36. Leary, T.: Experimental atherosclerosis in the rabbit compared with human (coronary) atherosclerosis. Arch. Path. 17: 453-492, 1934.
 37. Lillie, R.D.: Histopathologic Technic and Practical Histochemistry. New York, The Blakiston Division, McGraw-Hill Book Co., 1965, p.654.
 - 37a. Lison, L.: Histochemie et Cytochemie Animales. Paris, Gauthier-Villars, 3^e ed., vol. 2, 1960, p. 743.
 38. Loewenthal, K.: Anat. u. Histol. der Spontanerkr. der Kleinen Laboratoriumstiere, ed. por R. Jaffé, Berlin, 1931, p.4.
 39. Lopes de Faria, J.: Medionekrose der grossen und mittelgrossen Arterien nach orthostatischem Kollaps des Kaninchens. Zum Problem der Medionecrosis aortae des Menschen und der spontanen Aortensklerose des Kaninchens. Beit. path. Anat. 115: 373-404, 1955.
 40. Lopes de Faria, J.: Medianecrosis aortae after collapse in rabbits. Schw. Ztschr. allg. Path. u. Bakt. 21: 103-114, 1958.
 41. Lopes de Faria, J.: Aortenmedionekrose mit sekundärer Arteriosklerose bei den kongenitalen zyanotischen Herzkrankheiten. Beit. path. Anat. 125: 129-147, 1961.
 42. Lopes de Faria, J.: Histopathological changes in the coronary artery of rabbits after orthostatic collapse with ar

- teriosclerotic features. Path. Microbiol. 25: 1-12, 1962.
43. Lopes de Faria, J.: Role of medial changes in the pathogenesis of the diffuse intimal thickening and in atherogenesis. An approach based upon quantitative histological changes in the media of the ascending aorta. J. Atheroscler. Res. 5: 509-515, 1965.
 44. Lopes de Faria, J.: Über die Rolle der Mediaveränderungen für die Pathogenese der Intimasclerose sowie die Begrenzung der Arteriosklerose in der Aorta ascendens des Menschen. Beitr. path. Anat. 132: 114-128, 1965.
 45. Lopes de Faria, J.: On the origin of smooth muscle cells in the intimal thickening of rabbit aorta following orthostatic collapse. Beitr. path. Anat. 140: 333-344, 1970.
 46. Lopes de Faria, J.: Anatomia Patológica, vol. 2, Parte Especial, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 1975, p. 42.
 47. Lopes de Faria e Lacordaire L. Faria: Predisposing effect of spontaneous mesenchymal intimal thickenings of rabbit aorta to early lipid deposition. Virchows Arch. Abt. A Path. Anat. 353: 1-9, 1971.
 48. Lorenzen, I.: Experimental arteriosclerosis. Biochemical and morphological changes induced by adrenalin and thyroxine. Thesis, Copenhagen, Munksgaard, 1963.
 49. McMillan, G.C.; I. Katzo e G.L. Duff: Histochemical and staining reactions of tissues and organs of cholesterol-fed rabbits. Labor. Investig. 3: 451-468, 1954.
 50. Minick, C.R. e G.E. Murphy: Experimental induction of atheroarteriosclerosis by the synergy of allergic injury to arteries and lipid-rich diet. II. Effect of repeatedly foreign protein in rabbits fed a lipid-rich, cholesterol-poor diet. Am. J. Path. 73: 265-300, 1973.
 51. Padykula, H. A. e E. Herman: Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatases as measured by histochemical studies. J. Histochem. & Cytochem. 3: 161-169, 1955.

52. Parker, F. e G. F. Odland: A correlative, histochemical, biochemical and electron microscopic study of experimental atherosclerosis in the rabbit aorta with special reference to the myo-intimal cell. *Am. J. Path.* 48:197-239, 1966.
53. Schenk, E. A.; E. Gaman e A.S. Feigenbaum: Spontaneous aortic lesions in rabbits. I. Morphologic characteristics. *Circ. Res.* 19: 80-88, 1966.
54. Schenck, E.A.; E. Gaman e A. S. Feigenbaum: Spontaneous aortic lesions in rabbits. II. Relationship to experimental atherosclerosis. *Circ. Res.* 19: 89-95, 1966.
55. Schönholzer, G.: Die experimentelle Arterioskleroseforschung und ihre Ergebnisse für Pathogenese und Klinik. *Ergeb. inn. Med.* 62: 794-868, 1942.
56. Shio H.; M. G. Farquhar; e C. de Duve: Lysosomes of the arterial wall. Cytochemical localization of acid phosphatase and catalase in smooth muscle cells from rabbit atherosclerotic aorta. *Am. J. Path.* 76: 1-16, 1974.
57. Still, W. J. S.: An electron microscopic study of cholesterol atherosclerosis in the rabbit. *Exper. & Molec. Path.* 2: 491-502, 1963.
58. Still, W.J.S.: The topography of cholesterol-induced fatty streaks. *Exp. & Mol. Path.* 20: 374-386, 1974.
59. Still, W.J.S. e S.M. Dennison: Relation of the arterial intima of the rabbit to trauma and hyperlipemia. *Exper. & Molec. Path.* 6: 245-257, 1967.
60. Taylor, C. B.: The reaction of arteries to injury by physical agents. With a discussion of arterial repair and its relationship to atherosclerosis. In Symposium on Atherosclerosis, Publication 338, Washington D.C., 1954, National Academy of Sciences, National Research Council, p. 74-90.
61. Thompson, S.W. e R. D. Hunt: Selected Histochemical and Histopathological Methods. Springfield, Ill., Charles C.

Thomas Publisher, 1966, p. 639, 651, 671, 693.

62. Velican, C.: Em Hanb. d. Histochemie, Edit. por W.Graumann e K. Neumann, vol.8, Parte 2, suplementos. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 1974, p. 27,32,42,79,341,421,457.
63. Wang, C. - I ; L. Strauss e D. Adlersberg: The role of acid mucopolysaccharides in the development of atherosclerosis in the rabbit. *Circulation* 14: 481, 1956.
64. Willens, S.L.: The distribution of intimal atheromatous lesions in the arteries of rabbits on high cholesterol diets. *Am. J. Path.* 18: 63-77, 1942.
65. Willens, S.L.: The effect of postural hypertension on the development of atheromatosis in rabbits fed cholesterol. *Am. J. Path.* 19: 293-305, 1943.
66. Woolfrey, B.F. e H. Pearson: A reliable method for the histologic evaluation of tissue lipid. The joint use of sudan IV-propylene glycol, phosphin 3 R (an aqueous fluorochrome) and the cryostat. *Am. J. Clin. Path.* 37: 437-441, 1962.
67. Zemplényi, T.: Enzyme Biochemistry of the Arterial Wall. London, Lloyd-Luke (Medical Books) Ltd., 1968, p. 119.