

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

TADEU GUSMÃO MURITIBA

**EFEITOS DA QUITOSANA NA HIPERCOLESTEROLEMIA EXPERIMENTAL EM
COELHOS ALBINOS (*Oryctolagus Cuniculus*).**

**MACEIÓ
2013**

TADEU GUSMÃO MURITIBA

**EFEITOS DA QUITOSANA NA HIPERCOLESTEROLEMIA EXPERIMENTAL EM
COELHOS ALBINOS (*Oryctolagus Cuniculus*).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS) da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do grau em mestre em Ciências da Saúde (área de concentração: doenças crônicas).

Orientador: Prof. Dr. Célio Fernando de
Sousa Rodrigues

**MACEIÓ
2013**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

M977e

Muritiba, Tadeu Gusmão

Efeitos da quitosana na hipercolesterolemia experimental em coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculos*) experimental / Tadeu Gusmão Muritiba. – 2013.

67 f. : il.

Orientador: Célio Fernando de Sousa Rodrigues

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 59-67

1. Quitosana. 2. Hipercolesterolemia. 3. Coelho. I. Título

CDU: 661.1



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária - Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Defesa da Dissertação de Mestrado do mestrando Tadeu Gusmão Muritiba, intitulada: "Efeitos da quitosana na aterosclerose experimental em coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*)", orientado pelo Prof. Dr. Célio Fernando de Sousa Rodrigues, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 28 de fevereiro de 2013.

Os membros da Banca Examinadora consideraram o candidato Aprovado.

Banca Examinadora:

Prof.ª Dr.ª Quitéria Maria Wanderley Rocha - (Uncisal)

Prof.ª Dr.ª Daniele Gonçalves Bezerra - (ICBS/UFAL)

Prof. Dr. Carlos Augusto de Oliveira Cavalcanti - (Uncisal)

A Adriana Muritiba, Anne Muritiba, Tadeu Muritiba Filho e Antonio Muritiba Neto. Juntos construímos nossas vidas, com amor, carinho e cumplicidade

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me abençoado nesta longa caminhada. Ao professor Dr Célio Fernando De Sousa Rodrigues, digno de minha admiração, me concedeu a honra e o prazer de suas orientações e amizade. Ao amigo Rodrigo Bernardino pela sua grande contribuição nessa pesquisa a todos que fazem a UNCISAL pelo apoio e utilização das instalações e laboratórios.

RESUMO

Esta pesquisa tem por objetivo verificar os efeitos da quitosana na formação da doença aterosclerótica, através da indução de dieta hiperlipidêmica em coelhos e comparar estes efeitos aos da rosuvastatina utilizando o modelo de aterosclerose experimental de Bernardino (2008), em relação ao: peso, níveis lipídicos séricos (colesterol total, frações e triglicérido), glicemia, TGO, TGP, uréia e creatinina, sendo a quitosana um nutracêutico derivado principalmente da carapaça de crustáceos. Já a rosuvastatina é uma estatina que faz parte do grupo padrão de fármacos utilizados em pacientes com dislipidemia que diminuem a produção dos carreadores lipoprotéicos de colesterol e triacil-glicerol. A amostra foi de 36 coelhos albinos, da raça Nova Zelândia adultos e machos, alimentados com ração Socil® e água *ad libitum*. Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: G1 (grupo controle) era deixada *ad libitum* 200g de ração Socil®, G2 alimentado com 200g da mesma (*ad libitum*) ração do grupo controle, juntamente com 20mL de gema de ovo de galinha Carnaúba® associado a Rosuvastatina cálcica (2,5mg / 5mL / dia); G3 foi alimentado nas mesmas condições do grupo G2, diferenciando apenas a substituição da Rosuvastatina pela Quitosana (100 mg / 5mL / dia) via oral por sonda orofaríngea de nelaton. Grupo G4 foi alimentado com 200g da mesma ração do grupo controle, juntamente com 20 mL de gema de ovo de galinha Carnaúba®. Este experimento foi realizado durante 100 dias, fazendo-se análise bioquímica do sangue a cada 33 dias. Na análise estatística, foi utilizado One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Newman-Keuls e adotado o nível significância de 95% ($p < 0,05$). Quanto ao peso, no início do experimento, não houve diferença significativa. As taxas de colesterol total esteve abaixo de 30 em todos os grupos, com pequenas variações não significantes. Estas taxas passaram de 400 mg/ dL em todos os grupos. A rosuvastatina (G2) e a quitosana (G3), foram capazes de reduzir o colesterol total de forma significativa apenas no dia 66, enquanto a quitosana parece ter perdido o efeito na redução do colesterol total durante o tempo. Para o colesterol LDL, tanto a rosuvastatina, quanto a quitosana, foram capazes de reduzi-lo de forma semelhante e significativa em relação ao grupo G4 (gema) aos 33 dias, Em relação ao colesterol HDL, embora de forma não significativa, diminuiu com o tempo de dieta hiperlipidêmica. Apenas aos 33 dias, a quitosana teve efeito significativo e melhor que a rosuvastatina referente a este item. Já em relação ao colesterol VLDL, a rosuvastatina teve um bom efeito enquanto a quitosana foi péssima, o mesmo ocorreu em relação aos triglicédeos. A quitosana mostrou ser um excelente antihiperlipidemiante e potencialmente melhor que a rosuvastatina neste item. A rosuvastatina também demonstrou ser aparentemente agressiva ao fígado, o que não ocorreu com a quitosana. Já em relação a função renal, a rosuvastatina foi capaz de melhorar a ureia plasmática o que não ocorreu com os efeitos da quitosana, no entanto, ambas as drogas reduziram de forma significativa os níveis séricos de creatinina em relação ao grupo alimentado com ração e gema.

Palavras- Chave: Quitosana. Hipercolesterolemia. Coelho. Aterosclerose.

ABSTRACT

This research aims to verify the effects of Chitosan on the formation of atherosclerotic disease, by inducing hiperlipidêmica diet in rabbits and compare these effects to those of rosuvastatin using the experimental atherosclerosis model of Bernardino (2008), in relation to serum lipid levels, weight (total cholesterol, triglyceride and fractions), glucose, TGO, TGP, urea and creatinine, and Chitosan a nutraceutical derived mainly from the carapace of crustaceans. Already the rosuvastatin is a Statin that is part of the default group of drugs used in patients with Dyslipidemia which reduce the production of cholesterol and lipoprotéicos carrier triacil-glycerol. The sample was of albino rabbits, race 36 New Zealand adults and males fed with rations Socil ® and water *ad libitum*. The animals were distributed in the following groups: G1 (control group) was left *ad libitum* feed Socil ® 200 g, G2 powered with 200 g (*ad libitum*) control group ration, along with 20 ml of chicken egg yolk Carnaúba ® associated with Rosuvastatin calcium (2 mg/5 ml/day); G3 was fed in the same way the Group G2, differentiating only the replacement of Rosuvastatin by Chitosan (100 mg/5 ml/day) administered orally by oropharyngeal nelaton probe. G4 group was fed with 200 g of the same reaction of the control group, along with 20 mL of chicken egg yolk Carnaúba ®. This experiment was conducted during 100 days, biochemical analysis of blood every 33 days. In the statistical analysis, we used One-wey ANOVA, followed by Newman-Keuls post-test and adopted 95% significance level ($p < 0.05$). The weight, at the beginning of the experiment, there was a statistically significant difference. The rates of total cholesterol was below 30 in all groups. These rates have increased from 400 mg/dL in all groups fed chicken egg yolk after 66 days, demonstrating the effectiveness of the experimental diet cause hyperlipidemia. Rosuvastatin (G2) and Chitosan (G3) were able to reduce total cholesterol significantly just on day 66, while the Chitosan appears to have lost the effect in reducing the total cholesterol over a period of time. For LDL cholesterol, rosuvastatin, as Chitosan, were able to reduce it in a similar way and significant compared to the G4 Group (GEM) to 33 days, did not have a good effect for 66 days and 99 Chitosan increased LDL cholesterol significantly compared to other groups. In relation to HDL cholesterol, though non-significant, decreased with time hiperlipidêmica diet. Only to 33 days, Chitosan had significant effect and the best rosuvastatin on this item. Already in relation to cholesterol VLDL, rosuvastatin had a good effect while the Chitosan was terrible, the same occurred in relation to triglycerides. Chitosan has proved to be an excellent antihiperlicemiante and potentially better than rosuvastatin on this item. Rosuvastatin also proved to be aggressive liver apparently, what did not occur with Chitosan. Already in relation to renal function, rosuvastatin was able to improve the plasma urea which has not occurred with the effects of Chitosan, however, both drugs significantly lowered serum levels of creatinine in the Group fed with rations and gem.

Keywords: Chitosan. Hypercholesterolemia. Rabbits. Atherosclerosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Coleta de material na artéria auricular central.....	33
Figura 2 – Detalhe da artéria auricular central.....	34
Figura 3 – Aspecto do fígado normal em animais alimentados apenas com ração.	45
Figura 4 – Aspecto da esteatose hepática nos animais com dieta complementada com gema de ovo de galinha e rosuvastatina.....	45
Figura 5 – Aspecto do fígado nos animais com dieta complementada com gema de ovo de galinha e quitosana.....	46
Figura 6 – Aspecto da esteatose hepática nos animais com dieta complementada com gema de ovo de galinha.....	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição do peso dos coelhos na véspera, 33, 66 e 99 dias de experimento.....	36
Gráfico 2 – Valores da taxa de colesterol total dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias.....	37
Gráfico 3 – Valores da taxa de colesterol LDL dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias.....	38
Gráfico 4 – Valores da taxa de colesterol HDL dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias.....	39
Gráfico 5 – Valores da taxa de colesterol VLDL dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias.	40
Gráfico 6 – Valores da taxa de triglicerídeos dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias.....	41
Gráfico 7 – Valores dos índices glicêmicos dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias.....	41
Gráfico 8 – Índice da TGO dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias.	42
Gráfico 9 – Índice da TGP dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias.	43
Gráfico 10 – Níveis de uréia dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 Dias.....	44
Gráfico 11 – Níveis de creatinina dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil CoA	Acetilcoenzima A
CT	Colesterol total
DAC	Doenças aterocoronarianas
DIA ZERO	Início do experimento
E-SELECTINA	Molécula de adesão celular seletiva
G1	GRUPO 1 Controle 200g de ração
G2	GRUPO 2 Ração 200g, 10mL de GEMA e 1,5 g de colesterol
G3	GRUPO 3 Ração, 10mL de GEMA, COLESTEROL 1,5 g e Fitofármaco leucoantocianidina de uva
HDL	Lipoproteína de alta densidade Hipercolesterolemia
HMG-CoA redutase	Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase
ICAM 1	Molécula inter-celular de adesão 1
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPT	Lipídeos totais
n.s	Não significante

NFκB	Fator nuclear kappa – B
O.M.S.	Organização Mundial de Saúde
PAI 1	Ativador do plasminogênio-1
PDGF	Fator do crescimento derivado da plaqueta
PGI2	Prostaciclina
P-SELECTINA	Molécula de adesão celular
Q Quitosana	Fibra
R Rosuvastatina	Droga para hipercolesterolemia
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral
TRAMBOXANO A2	Membro da família de lipídeos chamada eicosanóides
VCAM 1	Molécula de adesão celular vascular 1
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Etiologia da Aterosclerose	16
3.2	Formação da Placa Aterosclerótica	17
3.3	Dislipidemias e Aterosclerose	19
3.4	Dieta Hiperlipidêmica e Aterosclerose	21
4	QUITOSANA	24
4.1	Efeitos da Quitosana	25
4.2	Rosuvastatina	27
4.3	Efeitos da Rosuvastatina	28
5	MATERIAL E MÉTODO	30
5.1	Amostra	30
5.2	Randomização da Amostra	30
5.3	Preparo e Administração da Dieta Aterogênica	32
5.4	Dosagem Bioquímica	32
5.5	Eutanásia	34
5.6	Análise Estatística	35
6	RESULTADOS	36
6.1	Peso dos Animais	36
6.2	Taxas de Colesterol Total e Frações	37
6.2.1	Colesterol Total	37
6.2.2	Colesterol LDL	38
6.2.3	Colesterol HDL	39
6.2.4	Colesterol VLDL	40
6.3	Triglicerídeos	40
6.4	Glicemia	41
6.5	TGO	42
6.6	TGP	43

6.7	Uréia	44
6.8	Creatinina.....	44
6.9	Análise dos Fígados	45
7	DISCUSSÃO	47
7.1	Etiologia da Aterosclerose	47
7.2	Formação da Placa Aterosclerótica.....	49
7.3	Quitosana	53
7.4	Efeitos da Quitosana	53
7.5	Rosuvastatina	55
7.6	Efeitos da Rosuvastatina	56
7.7	Considerações Finais a Respeito dos Fármacos Analisados.....	57
8	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

Segundo Hackam e Anand (2003), a palavra aterosclerose vem do grego atero que significa caldo ou pasta, e esclerose, endurecimento. No entanto, o termo aterosclerose foi criado para diferenciar um tipo especial de arteriosclerose, que acompanha um depósito gorduroso, sendo o mais importante, pois as placas ateromatosas levam a oclusão da artéria, levando a instalação de várias síndromes isquêmicas graves como infarto do miocárdio e encefálico (PORTO; RASSI; LEITE, 1981; DUQUE, 2001).

A arteriosclerose é responsável pelo maior índice de morbidade e mortalidade que ocorre no mundo. Esta doença ocorre inicialmente através do acúmulo de colesterol e proliferação de células musculares lisas no endotélio, que leva a sua inflamação, endurecimento e espessamento da parede das artérias. Este fenômeno originará uma placa fibrosa que se projeta para dentro do lúmen do vaso, levando a uma série de complicações circulatórias (CORRÊA-CAMACHO; DIAS-MELICIO; SOARES, 2007).

Nas sociedades ocidentais, a aterosclerose é causa primária de 50% de todas as mortes relacionadas com infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (AVC). Contudo, países como a Groenlândia, Islândia e Japão têm baixa prevalência de aterosclerose, principalmente entre os esquimós, sugerindo uma forte relação com o estilo de vida, dieta e composição genética dos indivíduos (GOTTLIEB; BONARDI; MORIGUCHI, 2005).

Entre os fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose estão às taxas elevadas de lipídeos, principalmente as LDL (lipoproteínas de baixa densidade), que tem ocupado um papel de destaque na etiologia da aterosclerose, assim como a hipercolesterolemia, combinada com o crescimento dos níveis de colesterol e triglicerídeos (DURRINGTON, 2002; VILARIÑO; ESPER; BADIMÓN, 2004; GOTTLIEB; BONARDI; MORIGUCHI, 2005). Assim também como a hiperlipidemia, hipertensão, diabetes e tabagismo, que desempenham papéis importantes na incidência e na progressão da doença (ORR et al., 2005). Além de

histórico familiar, sexo masculino, idade avançada e a dislipidemia (LICHTENFELS et al., 2007; SANTOS; BORTOLOZO, 2008).

Para realização de experimentos que envolvam espessamento da camada subendotelial e possivelmente a formação da arteriosclerose, os coelhos são os melhores modelos, devido à excreção lenta do colesterol exógeno e desenvolvimento da doença de forma rápida, ocasionando lesões em regiões da aorta proximal, mais do que na distal. A aorta em coelhos pode apresentar superfície afetada com formação de células espumosas na região subendotelial, sem ulceração, necrose, fibrose ou trombose (STEBENS, 1986).

Estudos experimentais mostraram que o uso da quitosana, por via oral, promove a redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos plasmáticos devido à sua capacidade de se ligar aos lipídeos da dieta, interferindo na absorção intestinal dessas gorduras (KOIDE, 1998). O primeiro relato sobre a capacidade da quitosana em reduzir colesterol foi provavelmente descrito por Sugano e colaboradores (SUGANO et al., 1978) desde então, têm sido inúmeros os relatos que atestam a capacidade hipocolesterolêmica da quitosana em animais.

Considerando o estudo de Hahn e Schwartz (2009), foi verificado que a quitosana reduziu significativamente o ganho de peso de ratos induzido por dieta rica em gordura; bem como diminuiu o peso hepático, melhorando assim a esteatose hepática, através da redução das concentrações plasmáticas de triglicérides, colesterol e ácidos graxos livres (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Existem vários fármacos para tratamento de doenças cardiovasculares, como as estatinas e as resinas (MARTÍNEZ-GONZALEZ; BADIMON, 2006). Para esta pesquisa foi utilizada a quitosana, que não pode ser produzida endogenamente pelos seres humanos, sendo obtida a partir da quitina por meio da desacetilação com álcalis (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Verificar os efeitos da quitosana na formação da doença aterosclerótica, através da indução de dieta hiperlipidêmica em coelhos e comparar estes efeitos aos da rosuvastatina.

2.2 Objetivos Específicos:

Analisar os efeitos da quitosana e da rosuvastatina utilizando o modelo de aterosclerose experimental de Bernardino (2008) em relação ao: peso, níveis lipídicos séricos (colesterol total, frações e triglicerídeo), glicemia, TGO, TGP, uréia e creatinina.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Etiologia da Aterosclerose

Considerada uma patologia complexa, a aterosclerose ocorre em artérias de grande e médio calibre, tendo como localizações as coronárias, carótidas e aorta (HANSSON, 2001; MA et al., 2008; DIJK et al., 2010), sendo na aorta onde mais surgem alterações ateroscleróticas precocemente (OLIVEIRA et al., 2004).

A lesão aterosclerótica é a anormalidade mais comum encontrada nas artérias decorrente inicialmente de dois processos básicos: acúmulo de colesterol e a proliferação de células musculares lisas na túnica íntima, desenvolvendo-se, portanto, sobre um substrato formado dessas células, leucócitos derivados do sangue e de uma quantidade variável de tecido conectivo formando uma placa fibrosa que se projeta para dentro do lúmen modificando a túnica média e levando a uma série de complicações circulatórias (CORRÊA-CAMACHO; DIAS-MELICIO; SOARES, 2007).

O desenvolvimento da aterosclerose é lento, com início precoce a agressão ao endotélio vascular devido a diversos fatores de risco como elevação de lipoproteínas aterogênicas, hipertensão arterial ou tabagismo e tem o ateroma, como característica do depósito de lipídeos na camada íntima da artéria, (ARAB et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004; JONGSTRA-BILEN, 2006; SPOSITO et al., 2007; BRAGA; BARLETA, 2008; LAI et al., 2009).

A formação de lesões e estreitamento luminal pode diminuir a luz das artérias gradualmente, e assim romper, conduzindo a formação de trombos e oclusão da luz arterial, sendo mais caracterizada pelo seu desenvolvimento focal em grandes artérias de regiões definidas, como bifurcações, que produz padrões de fluxo complexo (HASTINGS et al., 2007; HAHN; SCHWARTZ, 2009). Frequentemente o local mais afetado são as artérias que suprem o coração (RIBEIRO; SHIKATU 2004), sendo responsáveis por 95% das coronariopatias, 85% das claudicações intermitentes dos membros inferiores e 75% dos acidentes vasculares cerebrais (VENÂNCIO; BURINI; YOSHIDA, 2004).

Observações fisiopatológicas em seres humanos e animais levantam a hipótese de que a aterosclerose é resultante de uma resposta do organismo à lesão tecidual com enfoque para a disfunção endotelial. Evidências acumulam-se no sentido de sugerir que a lipoproteína de baixa densidade (LDL) modificada pela oxidação (LDL ox) é o principal fator envolvido no desencadeamento da lesão (CORRÊA-CAMACHO; DIAS-MELICIO; SOARES, 2007).

O processo aterosclerótico causa alteração no funcionamento do endotélio vascular, sendo considerado como extremamente dinâmico e progressivo resultante da combinação entre a disfunção endotelial e a inflamação, (DENARDI; CASELLA FILHO; CHAGAS, 2008; CHUMAEVA et al., 2010). Sendo um processo que está relacionado a uma resposta inflamatória crônica da parede arterial, cuja progressão é mantida pela interação entre as lipoproteínas modificadas, macrófagos derivados de monócitos, linfócitos T e constituintes celulares normais da parede arterial que contribuem para o crescimento e desenvolvimento da placa, e finalmente sua ruptura (CHEN; CHANG; JIANG, 1999; COTTIN et al., 2001; MASSBERG et al., 2002; CASTRO et al., 2004; HOWARD-ALPE; SEAR; FOEX, 2006; RAUDALES et al., 2006; BALLINGER; OSMAN, 2007; LITTE; ZANDBERGEN; PLUTZKY, 2007; ABDALLA; SENA, 2008; YUSOF; MILES; CALDER, 2008; HYAFIL et al., 2009; DORNAS et al., 2010; TZIAKAS et al., 2010;).

3.2 Formação da Placa Aterosclerótica:

A lesão endotelial constitui o evento inicial do processo de formação da placa aterosclerótica e a aterogênese pode ser considerada como uma resposta inflamatória protetora à agressão do endotélio. Como resultado da lesão do endotélio, monócitos sanguíneos são quimiotaticamente atraídos para a parede da artéria, penetrando no espaço subendotelial onde, através de complexos processos, transformam-se em macrófagos (FRANÇOSO; COATES, 2002). Há ainda liberação de monócitos e linfócitos T, e proliferação de células musculares lisas levando ao espessamento da parede arterial e conseqüente processo de remodelação que visa melhorar a luz do vaso para melhor irrigação distal à lesão. Essa lesão passa a apresentar uma cápsula fibrosa com núcleo de tecidos necrosados e lipídios,

levando assim a lesão a estágios mais avançados (SUNG; FRIEDLANDER; KOBASHIGAWA, 2004).

Em sua fisiopatologia, segundo Wilmore e Costill (2001) o surgimento da arteriosclerose ocorre a partir do momento que um irritante sanguíneo lesa ou arranha a parede arterial e expõe o tecido conjuntivo subjacente, desta forma as plaquetas e os monócitos circulantes são então atraídos ao local da lesão e aderem ao tecido conjuntivo exposto. As plaquetas liberam uma substância denominada fator do crescimento derivado da plaqueta (PDGF), que promove a migração das células musculares lisas da túnica média para a túnica íntima. Uma placa composta basicamente por células musculares lisas, tecido conjuntivo e resíduos formam-se no local da lesão. À medida que a placa cresce, ela estreita a luz arterial e impede o fluxo sanguíneo adequado. Os lipídeos séricos, especificamente as LDL são depositados na placa. Quando pedaços da placa são desprendidos, podem iniciar a formação de coágulos que se alojam em outras partes do vaso.

Dessa forma, a placa de ateroma é formada por depósitos de gordura, principalmente de colesterol, na camada íntima da artéria e que tem sua formação iniciada por lesões endoteliais decorrentes dos fatores de risco aos quais o indivíduo está exposto. Um aumento da espessura da camada íntima é observado, podendo sofrer deposição de sais de cálcio, produzindo diferentes graus de calcificação distrófica que recebem o nome de ateromas (SUNG; FRIEDLANDER; KOBASHIGAWA, 2004).

A placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico. Estes elementos formam na placa aterosclerótica, o núcleo lipídico, rico em colesterol e a capa fibrosa, rica em colágeno. As placas estáveis caracterizam-se por predomínio de colágeno, organizado em capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico de proporções menores. As instáveis apresentam atividade inflamatória intensa, especialmente nas suas bordas laterais, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico proeminente e capa fibrótica tênue. A ruptura desta capa expõe material lipídico altamente trombogênico, levando à formação de um trombo sobrejacente. Este processo, também conhecido por aterotrombose, é um dos

principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose (SPOSITO et al., 2007).

Localiza-se preferencialmente na aorta abdominal, nas artérias coronárias, no segmento arterial ílio-femoral e na região encefálica; nas artérias carótidas internas e nas artérias do polígono de Willis, poupando as artérias dos membros superiores, as mesentéricas e renais, à exceção dos seus óstios (BECKSTROM et al., 2007). Estudos sugerem duas fases interdependentes na evolução da aterosclerose: na primeira fase predomina uma formação anatômica de lesão aterosclerótica sob influência dos fatores de risco aterogênico e que leva décadas para evoluir. Devido a sua história insidiosa, sua evolução, comumente, não traz manifestação clínica severa. A segunda fase, conhecida como trombogênica, determina a formação aguda de trombo sobre a placa aterosclerótica e está envolvida nos eventos agudos coronários como infarto do miocárdio, angina instável e morte súbita, que é geralmente desencadeada por desestabilização da placa aterosclerótica com redução significativa e abrupta da luz do vaso devida à formação local do trombo (FUSTER, 1994).

3.3 Dislipidemia e Aterosclerose

A dislipidemia, condição na qual há concentrações anormais de lipídios ou lipoproteínas no sangue, é um fator de risco importante para o desenvolvimento de complicações da aterosclerose (ROMALDINI et al., 2004).

Os níveis de colesterol plasmáticos variam conforme a idade e sexo, iniciando sua produção com o nascimento, mostrando leve depressão na adolescência e sofrendo elevação na idade adulta, as mulheres costumam apresentar menores níveis de colesterol, quando comparados a homens da mesma idade (MELO; FRÉZ, E.; FRÉZ, M., 2008). A concentração das lipoproteínas LDL e HDL, na corrente sanguínea, além de estar relacionada com o perfil genético, também são influenciadas por hábitos alimentares (GIROLD, 2007; KOLANKIEWICZ; GIOVELLI; BELLINASSO, 2008).

Entre as lipoproteínas (frações do colesterol total), a de baixa densidade “Low Density Lipoprotein (LDL colesterol)”, tem sido apontada como a mais importante

constituente da composição do ateroma. Por outro lado, a de alta densidade “High Density Lipoprotein (HDL colesterol)”, atuaria no transporte reverso do colesterol, diminuindo ou estagnando a formação da placa (MARTINS et al.,1996).

As dislipidemias primárias ou sem causa aparente podem ser classificadas genotipicamente ou fenotipicamente através de análises bioquímicas, considera os valores do CT, LDL, TG e HDL. Compreendem quatro tipos principais bem definidos em hipercolesterolemia isolada, hipertrigliceridemia isolada, hiperlipidemia mista e diminuição isolada do HDL ou associada ao aumento dos triglicéridos ou LDL (CASTRO et al., 2004; CHACRA; DIAMENT; FORTI, 2005).

Um dos primeiros eventos na patogenia da aterosclerose é o acúmulo de LDL (lipoproteína de baixa densidade) na camada íntima. Esta proteína fica retida neste local por se ligar a certos proteoglicanos da matriz extracelular. Por estar afastada dos antioxidantes plasmáticos, torna-se propensa a sofrer reações de oxidação, tanto da sua porção lipídica como a sua porção protéica. As partículas de LDL oxidado podem aumentar a expressão de moléculas de adesão leucocitária na superfície das células endoteliais, como VCAM-1, o ICAM-1 e a P-selectina. Além disso, possuem propriedades quimiotáticas e estimulam o endotélio a secretar citocinas, como a IL-1 (interleucina 1) e o TNF-alfa. Estes fenômenos estão relacionados com o acúmulo lipídico na camada íntima com recrutamento de leucócitos que é um processo fundamental da patogênese da aterosclerose. A adesão de leucócitos ao endotélio também é influenciada por fatores hemodinâmicos. O fluxo laminar de sangue é capaz de suprimir (talvez pelo aumento da produção endotelial de óxido nítrico) a expressão das moléculas de adesão, enquanto que o fluxo turbulento não tem essa capacidade. Isto justifica por que as placas de ateroma predominam em regiões de bifurcação arterial (FRUEBIS et al., 1999; RODRIGUES et al., 2003).

Existe evidência que os níveis elevados de CT, LDL e triglicérido, assim como os níveis baixos de HDL aumentam o risco cardiovascular, entre os fatores de risco o mais importante são os bioquímicos, como lipídeos e marcadores de inflamação (CARVAJAL; ÂNGULO, 1997; FREITAS, 2004; SHI et al., 2005; MELO; FRÉZ, E.; FRÉZ, M., 2008; YUSOF; MILES, CALDER, 2008; KUNSTMANN;

GAINZA, 2009). Portanto o HDL exerce efeito protetor contra o desenvolvimento da aterosclerose, contribuindo para o transporte reverso de colesterol das células para o fígado, inibição da oxidação e agregação da LDL e prevenção do dano vascular causado pelas LDL oxidadas, promovendo uma diminuição na morbimortalidade da doença arterial coronariana (GIROLDO; ALVES; BAPTISTA, 2007; SANTOS; BORTOLOZO, 2008).

3.4 Dieta Hiperlipidêmica e Aterosclerose

Estudos populacionais têm mostrado estreita correlação entre hiperlipidemia, aterosclerose, doença coronária e dieta. A interrelação é complexa e, como há considerável variação entre os indivíduos, outros fatores devem estar envolvidos. Contudo, a evidência sugere, basicamente, a existência de distúrbios nutricionais (CAMPO; CARVALHO, 2007).

A dieta gordurosa com ácido graxo saturado, é um importante fator que eleva o nível de LDL, assim a hiperlipidemia está associada com a aceleração da aterosclerose, de modo que a substituição isocalórica dos ácidos graxos saturados por ácidos graxos poli-insaturados reduz os níveis do CT e o LDL plasmáticos (COTTIN et al., 2001; SPOSITO et al., 2007; WAQAR et al., 2010). Desta forma os padrões dietéticos estão relacionados com as doenças cardiovasculares, sendo associadas à alimentação, principalmente com ingestão elevada de lipídios e colesterol (CASTRO et al., 2004).

O colesterol plasmático em coelhos da raça Nova Zelândia é baixo, numa média de 1,3 mmol/l, mas pode aumentar até 2-8 vezes após a administração de uma dieta enriquecida com 0,1-2% de colesterol, dentro de 20 dias (FINKING; HANKE, 1997). Como coelhos têm sido utilizados vastamente para estudar o desenvolvimento de aterosclerose em humanos, pelo rápido desenvolvimento das lesões produzidas com suplemento de colesterol na dieta, alcançando hipercolesterolemia moderada com níveis de colesterol plasmáticos na faixa de 200 a 800 mg/dl, podendo ser superior a 1.000 mg/dl que causa lesão (SUZUKI; YEUNG; IKENO, 2008; DORNAS et al., 2010), por terem baixa concentração plasmática de colesterol total e lipoproteínas HDL como dominante, o VLDL passa a

ser a principal classe de lipoproteínas plasmáticas, quando expostos à dieta rica em colesterol (SINGH; RAY, 1994).

O coelho (*Oryctolagus cuniculus*) é filogeneticamente o parente mais próximo dos roedores e tem sido utilizado para a investigação da patogênese e tratamento de muitas doenças humanas incluindo a aterosclerose (CONSTANT, 2004; ZHANG; XU; LI, 2009), quando alimentados com dietas ricas enriquecida em gordura saturada aumentam os níveis plasmáticos de colesterol devido à lenta excreção de colesterol exógeno (IHARA et al., 1998; LANCELOTI et al., 2010), este aumento significativo na concentração de colesterol plasmático é devido a alimentação com ração suplementada com gema de ovo (JALDIN et al., 2006), pois cada ovo de galinha apresenta concentração de colesterol de 956 mg/dl (RAMALHO et al., 2007).

A primeira vez que aterosclerose foi induzida em coelhos alimentando-os com gema de ovo e colesterol puro teve resposta em algumas semanas de dieta: a aorta de 90% dos coelhos apresentou placas acinzentadas semelhantes às das coronárias de homens vítimas de infarto do miocárdio. Posteriormente, o autor concluiu que o colesterol não era o único responsável pelos aparecimentos das placas ateroscleróticas, uma vez que repetiu os experimentos em ratos e cachorros e não obteve o mesmo resultado (ANITSCHKOW; CHALATOW, 1913).

Segundo Martinello (2006) o coelho foi o primeiro modelo de animal usado na pesquisa da aterosclerose. Acrescenta ainda que esta espécie possui um metabolismo lipoprotéico muito semelhante ao de humanos, exceto por sua deficiência na lipase hepática. Devido à fácil absorção, os coelhos respondem muito bem à dieta altamente gordurosa ou colesterolêmica e desenvolvem lesões em curto período de tempo. No entanto, as lesões contêm mais gordura e macrófagos que as de humanos e os níveis plasmáticos de colesterol são extremamente altos, diferente dos humanos. Luz, Laurindo e Chagas (2003) acrescentam que estudos experimentais demonstraram que, em animais submetidos a dieta hipercolesterolêmica, a reatividade vascular encontra-se diminuída em cerca de dez semanas após a instituição da dieta.

O modelo experimental em roedores é frequentemente usado para avaliar os efeitos hipolipemiantes de muitos compostos naturais e sintéticos, contudo, nem todas as espécies apresentam o metabolismo lipoprotéico comparável ao de humanos (MARTINEZ-GONZALES; BADIMON, 2006).

Em 2008, Bernardino testou com sucesso uma dieta experimental baseada em gema de ovo, para a produção de aterosclerose experimental em coelhos albinos *Oryctolagus cuniculus*, descrevendo em detalhes o procedimento. Esta dieta foi tão eficaz quanto modelos amplamente descritos que utilizam colesterol puro dissolvido em peletas ou administrado por qualquer outra forma.

4 QUITOSANA

Os nutracêuticos são alimentos potencialmente saudáveis que desenvolvem um papel na manutenção de bem-estar humano, melhorando a saúde (MASSARO et al., 2010). Essa variedade de produtos não pode ser verdadeiramente classificada como alimentos, estão entre um híbrido de “nutrientes” e “farmacêuticos” definidos como: uma substância que pode ser um alimento ou parte de um alimento que proporciona benefícios medicinais (ANDLAUER; FURST, 2002; LIRA et al., 2009), e podem ser classificados como fibras dietéticas, ácidos graxos poli-insaturados, proteínas, peptídeos, aminoácidos, minerais e antioxidantes (MORAES; COLLA, 2006).

Quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina (copolímero de β -(1 \rightarrow 4)-D-glucosamina e β -(1 \rightarrow 4)-N-acetil-D-glucosamina), que é encontrada em abundância na natureza, principalmente em carapaça de crustáceos. Devido ao caráter básico, atribuído à presença do grupamento amina nas unidades repetidas, e à sua biodegradabilidade, esses dois polímeros vem despertando bastante interesse de cientistas e tecnólogos, que têm descoberto diversas aplicações, especialmente na área biomédica (CANELLA; GARCIA, 2001).

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos; sua presença ocorre também em nematóides e parede celular de fungos e leveduras. A quitosana pode ser obtida a partir da quitina por meio da desacetilação com álcalis, podendo também estar naturalmente presente em alguns fungos, como aqueles pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

A quitosana não é solúvel em água, mas forma gel em pH estomacal, comportando-se, desta forma, como as demais fibras hidrossolúveis (CRAVEIRO, Afranio; CRAVEIRO, Alexandre; QUEIROZ, 2003). É considerada uma fibra dietética, uma vez que possui uma estrutura química muito semelhante à celulose, não sendo também digerida pelas enzimas digestivas (EBIHARA; SCHNEEMAN, 1982; MAEZAKI ; TSUJI; NAKAGAWA, 1993; MUZZARELI, 1983;).

Partindo do princípio que derivados de quitina e quitosana podem ser preparados a fim de se melhorar sua solubilidade em água, as aplicações destes polímeros podem aumentar significativamente (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

4.1 Efeitos da Quitosana

Dietas ricas em fibras alimentares promovem efeitos benéficos para a saúde do homem, tendo sido verificado que alimentos ricos em fibras solúveis apresentam importante efeito no metabolismo da glicose e de lipídios (PERIAGO et al., 1993; GREGORIO; AREAS; REYES, 2001).

A relação entre fibra e dislipidemia tem sido relatada como um fator importante sobre os níveis de colesterol, os quais são reduzidos a partir da adição de fibra na dieta (KRITCHEVSKY; STORY, 1986; JENKINS et al., 1998; DERIVI; MENDEZ, 2001). A redução na absorção de ácidos biliares, devido à ligação dos mesmos com a fibra no lúmen intestinal, é um possível mecanismo pelo qual as fibras alimentares reduzem os níveis de lipídios séricos (KRITCHEVSKY; STORY, 1986). Estudos sugerem, ainda, que o propionato, produzido pela fermentação bacteriana das fibras no cólon, pode exercer um controle na síntese do colesterol (BERGMAN, 1990).

Maezaki et al. (1996) relataram o efeito hipocolesterolemiante de quitosana em seres humanos, pela primeira vez e descobriu que a quitosana tem efetiva diminuição dos níveis de lipídicos no plasma sem efeitos colaterais (XIA et al., 2011). Em particular, a quitosana pode diminuir a concentração de colesterol no soro e fígado (KIM et al., 1997).

Ela tem a capacidade única de reduzir o colesterol LDL enquanto aumenta o colesterol HDL. Testes laboratoriais realizados em ratos mostraram que a quitosana deprime os níveis de colesterol no soro e no fígado de ratos alimentados com colesterol sem afetar o desempenho, peso do órgão ou da natureza das fezes (HENNEN, 1996).

Lehoux e Grondin (apud KIM et al., 1997) relataram que 7,5% de quitosana (que tem um peso molecular de 70 kDa), desempenha um papel na manutenção da

homeostase do colesterol hepático. No entanto, não há quaisquer outros relatórios sobre os efeitos da quitosana sobre as funções do fígado em outros animais (KIM et al.,1997).

O fígado desempenha um papel central no metabolismo das lipoproteínas. Além da produção de várias apolipoproteínas; o fígado também produz enzimas e receptores envolvidos no metabolismo das lipoproteínas tais como 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A redutase (HMG-CoA), e o receptor de lipoproteína de baixa densidade. A função específica do receptor de LDL é remover as partículas de lipoproteínas ricas em colesterol da circulação (XU et al., 2007).

Um estudo publicado no American Journal of Clinical Nutrition constatou que a quitosana é tão eficaz em mamíferos como cholestyramine (um medicamento hipolipemiante) no sangue controlando o colesterol sérico sem os efeitos secundários deletérios típicos de cholestyramine. A diminuição dos níveis de colesterol no sangue é cerca de 66,2 por cento após o uso de quitosana (HENNEN, 1996).

A quitosana tem sido sugerida para reduzir absorção de gordura a partir do trato gastrointestinal através da ligação com os grupos carboxilo aniônicos das gorduras e os ácidos biliares, além de interferir com a emulsão de lípidos neutros (isto é, o colesterol, outros esteróis), ligando-os com ligações hidrofóbicas (YLITALO et al., 2002). A inibição da absorção do colesterol reduz a absorção do colesterol dietético, mas o mais importante é que a quitosana previne a reabsorção do colesterol biliar, que será eliminada nas fezes (COHEN, 2004). Administrado por via oral a quitosana liga-se a gordura no intestino, bloqueando a absorção, e tem sido demonstrada a diminuição do colesterol plasmático em animais e humanos (OMROD; HOLMES; MILLER, 1998).

Houve também muitos relatos sobre efeitos anticâncer, antimicrobianos e efeitos imunorreativos após o uso de quitosana. Muito interesse tem sido concentrado em aplicações de quitosana em na área biomédica (KIM et al.,1997).

4.2 Rosuvastatina

O tratamento da arteriosclerose se dá através de fármacos anti-hiperlipidêmicos e têm como alvo o problema dos lipídios séricos elevados com intervenções complementares, alguns destes agentes diminuem a produção dos carreadores lipoprotéicos de colesterol e triacil-glicerol, enquanto outros aumentam a degradação de lipoproteínas. Outros, ainda, aumentam diretamente a remoção de colesterol do organismo. Estes fármacos podem ser usados isoladamente ou em combinações, mas estão sempre acompanhados da necessidade de dieta significativamente pobre em lipídios, especialmente o colesterol e gorduras saturadas, e o conteúdo calórico da dieta deve ser acompanhado rigorosamente (HARVEY; CHAMPE, 1997).

As principais classes de substâncias utilizadas clinicamente são: as estatinas inibidoras HMG-CoA redutase (sinvastatina, lovastatina, pravastatina e atorvastatina), fibratos (bezafibrato, ciprofibrato, genfibrozila, fenofibrato e clofibrato), resinas de ligação de ácidos biliares (colestiramina e colestipol), ácido nicotínico, probucol e óleo de peixe ômega 3 (RANG et al., 2004).

Estudos clínicos randomizados realizados nos últimos anos, tanto com prevenção primária quanto com prevenção secundária, demonstraram que as estatinas reduzem a incidência de eventos isquêmicos coronarianos, a necessidade de revascularização miocárdica, a mortalidade cardíaca e o acidente vascular cerebral. Demonstrou-se também que o maior benefício em termos de risco absoluto foi observado em pacientes com maior risco para a ocorrência de doença arterial coronariana (CHAGAS; GALVÃO, 2007).

Trata-se de um grupo farmacológico amplamente utilizado para o tratamento da hipercolesterolemia, são as estatinas substâncias que atuam inibindo a HMG-CoA redutase, enzima que limita a velocidade na síntese do colesterol. Este grupo farmacológico é eficaz no tratamento da hipercolesterolemia e possui uma excelente tolerabilidade na população de dislipidêmicos (HARVEY; CHAMPE, 1997; RANG et al., 2004; SILVA, 2010).

Jorge et al (2005) realizaram um experimento sobre o efeito das estatinas atorvastatina, fluvastatina, pravastatina e sinvastatina sobre a função endotelial, a peroxidação lipídica e a aterosclerose aórtica em coelhos hipercolesterolêmicos utilizando 0,5 de colesterol na dieta durante 45 dias, e concluíram que todas as estatinas tiveram efeito significativo e similar em reduzir a peroxidação lipídica nas LDL e na parede arterial, na regressão da aterosclerose aórtica e na reversão da disfunção endotelial, na redução do colesterol total plasmático, no teor de malonodialdeído na parede arterial.

Estudos recentes têm comparado a eficácia da rosuvastatina com as estatinas existentes no mercado. Isto é possível porque as estatinas possuem um perfil de resposta previsível em relação à redução de LDL-c, o que permite que a eficácia de diferentes estatinas seja diretamente comparada. Para os agentes disponíveis no mercado, as reduções nos níveis de LDL-c variam de 20% a 25% para a fluvastatina e 39% a 60% para a atorvastatina. Além disso, a relação dose/resposta para todas as estatinas é bastante previsível, com cada dobro da dose de uma dada estatina ocasionando uma redução adicional de LDL-c de 7%.

Em todos estudos com a rosuvastatina, o uso desta medicação determinou uma maior porcentagem de pacientes que atingiram as metas preconizadas para o LDL-c, com uso de doses menores para o alcance de tal objetivo (CHAGAS; GALVÃO, 2007).

4.3 Efeitos da Rosuvastatina

As estatinas são inibidores da HMG-CoA redutase, uma das enzimas chave na síntese intracelular do colesterol. Sua inibição reduz o conteúdo intracelular de colesterol e, como consequência, há aumento do número de receptores de LDL nos hepatócitos que então removem mais VLDL, IDL e LDL da circulação para repor o colesterol intracelular. Estes medicamentos reduzem o LDL-c de 15% a 55% em adultos. A duplicação das doses acrescenta em média 6% na redução de LDL-c. Reduzem os TG de 7% a 28% e elevam o HDL-c de 2% a 10%.

A diminuição de colesterol plasmático é acompanhada pela redução dos níveis de LDL. Apesar da importância deste mecanismo no efeito

hipocolesterolêmico, as estatinas também induzem o aumento de receptores LDL, onde a lipoproteína LDL se fixa no tecido hepático, ocorrendo depuração de partículas com apo B-100, por endocitose. O aumento de atividade dos receptores de LDL hepático é um dos fatores mais importantes para diminuição dos níveis de LDL plasmático. Por esta razão os inibidores de HMG-CoA redutase possuem dupla ação, diminuem a biossíntese de colesterol e causam aumento do número de receptores LDL hepático, aumentando a remoção de IDL e LDL circulantes (CAMPO; CARVALHO, 2007).

As estatinas reduzem a mortalidade cardiovascular e a incidência de eventos isquêmicos coronários agudos, necessidade de revascularização do miocárdio, AVC (grau de recomendação I e nível de evidência A) (SPOSITO et al., 2007).

Ainda que inicialmente as estatinas se introduziram no mercado como fármacos para diminuir o colesterol, estas possuem múltiplas atividades ateroprotetoras independentes como: melhorar a disfunção endotelial, inibir a inflamação vascular, inibir trombose, além de diminuir o estresse oxidativo. Essas ações são conhecidas como efeitos pleiotrópicos das estatinas, pois os benefícios não são observados apenas em pacientes hiperlipidêmicos, mas também, nos pacientes normolipidêmicos (MENNICKENT et al., 2008).

Os efeitos adversos são raros durante tratamento com estatinas. Os mais graves, como hepatite, miosite e rabdomiólise, são observados ainda mais raramente. No entanto, para identificar possíveis efeitos adversos recomenda-se a dosagem dos níveis basais de creatinofosfoquinase (CK) e de transaminases (especialmente de ALT) e a repetição na primeira reavaliação ou a cada aumento de dose (SPOSITO et al., 2007).

5 MATERIAL E MÉTODO

5.1 Amostra

O experimento foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (protocolo de pesquisa nº 74 - A).

Foram utilizados 24 coelhos albinos, da raça Nova Zelândia adultos e machos. Os animais foram desmamados após 40 dias, sendo nessa época admitidos ao experimento com peso que variou entre 1,5Kg e 1,6Kg, alimentados com ração Socil® e água *ad libitum*. Quando os animais atingiram entre 7 e 8 meses iniciou-se o experimento, apesar de serem criados nas mesmas condições e local, em gaiolas individuais, nessa época, o peso variou entre 2250 e 4200 g. Estes coelhos ficaram no biotério da Universidade Estadual de Ciências da saúde de Alagoas - UNCISAL, a temperatura e luz natural onde foram acompanhados por médica veterinária antes e durante o experimento.

O tamanho da amostra foi definido baseado na maioria dos protocolos internacionais que utilizam esse modelo experimental.

Se aplicarmos o cálculo do tamanho da amostra, quanto maior o valor de p ($1 - p$) maior será o tamanho da amostra. Não dispondo de qualquer informação sobre o valor de p , usa-se $p = 0,05$ e assim trabalhando-se com uma amostra de tamanho grande, há maior segurança nos resultados encontrados. Dessa forma foi utilizado $p = 0,05$, ou seja, intervalo de confiança de 95% para população infinita seguindo a fórmula: $n = z^2 [p (1 - p) / e^2]$.

5.2 Randomização da Amostra

Os animais foram randomizados por sorteio, pesados e alocados em quatro grupos, cada um com seis animais, sendo denominados de G1 (Grupo controle), e Grupos teste a saber: G2, G3 e G4. Assim, foi determinado um coelho por gaiola. Os coelhos foram pesados com uma balança digital de precisão Marte®, modelo AS 5000 C com carga máxima de 5 kg e mínima 5 g. Para evitar a mistura de animais

durante as manipulações, cada animal foi marcado com um número na face interna da orelha esquerda, através de pincel atômico de cor preta.

O peso da ração em 200 g foi baseado em estudos anteriores (MARTINEZ-GONZÁLE; BADIMON, 2006; BERNADINO, 2008), onde foi pesada e oferecida pela manhã e deixada à disposição do animal. A descrição dos grupos randomizados é descrita a seguir:

- a) Para o grupo G1 (grupo controle) era deixada *ad libitum* 200g de ração Socil® que tem a composição básica necessária ao animal: proteína bruta (15%), extrato etéreo (2,5%), matéria fibrosa (16%), matéria mineral (10%), cálcio (2,5%), fósforo (0,42%), umidade (13%), carboidrato (31,58%). Como os coelhos são roedores, necessitam de ração em forma de peletas, quando a ração não tinha mais esta forma, era desprezada e substituída por nova.
- b) O grupo G2 foi alimentado com 200g da mesma (*ad libitum*) ração do grupo controle, juntamente com 20mL de gema de ovo de galinha Carnáuba® associado a Rosuvastatina cálcica (2,5mg / 5mL / dia).
- c) O grupo G3 foi alimentado nas mesmas condições do grupo G2, diferenciando apenas a substituição da Rosuvastatina pela Quitosana (100 mg / 5mL / dia) via oral por sonda orofaríngea de nelaton.
- d) O grupo G4 foi alimentado com 200g da mesma reação do grupo controle, juntamente com 20 mL de gema de ovo de galinha Carnáuba®.

A administração de gema, bem como da rosuvastatina cálcica e quitosana nos animais dos grupos 2, 3 e 4, foi realizada com sondagem orofaríngea, através de sonda de nelaton número 18 conectada a uma seringa descartável de 10mL. A rosuvastatina cálcica e a quitosana, foram administrada uma vez ao dia. A dieta complementar foi preparada diariamente, durante 100 dias.

Para todos os grupos, foi oferecida diariamente, 200 gramas de ração e água *ad libitum*, havendo sobra, a dieta era novamente complementada até 200 g.

5.3 Preparo e Administração da Dieta Aterogênica

O preparo da dieta foi diário para evitar contaminação dos animais ou do alimento. Antes da sondagem orofaríngea, o ovo era lavado com hipoclorito de sódio diluído em água e deixando-os durante 5min imersos nessa solução. A retirada da gema foi realizada com a ajuda de uma colher em seguida foi separada a gema da clara em um recipiente plástico. Utilizando uma seringa de 20mL retirou-se 10mL de gema. A administração foi realizada utilizando uma sonda que foi introduzida na cavidade oral, de forma que ao ser injetada, o animal degluti espontaneamente, evitando assim pneumonia química. O animal foi mantido em posição inclinada (com a cavidade bucal e patas para cima) por tempo de 3 minutos para garantir a ingestão da dieta.

Como o coelho tem um metabolismo lento, para evitar problemas gastrointestinais e óbitos, a gema era administrada em duas tomadas, ou seja, 10 mL pela manhã e mais 10 a tarde.

O grupo de pesquisa encaminhou gemas de ovo para análise do Instituto de Tecnologia de Alimentos do Estado de São Paulo, cuja composição encontra-se anexa.

A rosuvastatina cálcica e a quitosana, também foram injetadas com a utilização de uma seringa de 10mL acoplada a uma sonda de nelaton número 18, por via oral, semelhante ao processo realizado com a gema

5.4 Dosagem Bioquímica

Foi realizada análise bioquímica do sangue após jejum de 12 a 14 horas em todos os coelhos, para verificação de suas taxas de colesterol Total, HDL, VLDL, LDL, lipídeos totais, bem como de triglicerídeos. O procedimento foi realizado 4 vezes (Um dia antes do experimento (Início), dias 33, 66 e 99) em todos os animais. O sangue foi coletado na artéria auricular central, com seringa de 10 mL e armazenado para análise em tubos de ensaio de 5 mL sem anticoagulante. Ao fim da coleta amostras eram encaminhadas ao laboratório de patologia e medicina

laboratorial (CPML) onde foram centrifugadas e seguiu o procedimento operacional padrão para análise do colesterol total e frações.

Figura 1 – Coleta de material na artéria auricular central



Fonte: Autor. Acervo pessoal, 2012.

Figura 2 – Detalhe da artéria auricular central



Fonte: Autor. Acervo pessoal, 2012,

5.5 Eutanásia

Ao término do experimento os coelhos foram submetidos à eutanásia (100º dia). Para tanto, foi realizada inicialmente anestesia geral (Xilazina a 2% - Rompum® – e Quetamina a 5% - Ketalar®), via intramuscular. Com o animal profundamente sedado e anestesiado, foi aplicado lentamente 10mL de cloreto de potássio 19,1%, via endovenosa, monitorando o animal até o óbito, (este procedimento era acompanhado pela veterinária responsável), respeitando a recomendação do Conselho Federal de Medicina Veterinária, resolução nº 714 Art. 13, de 20 de junho de 2002.

Cada animal foi submetido a procedimento para a retirada de fragmento das artérias carótidas comuns (direita e esquerda) próximo de sua bifurcação, do arco aórtico e as artérias femorais (direita e esquerda); para isto foi realizada a incisão mediana cervico-toraco-abdominal, bem como na face medial de cada coxa e cada

animal foi dissecado por planos até expor os vasos para a retirada dos fragmentos que foram limpos e fixados com formaldeído a 10%. Os vasos retirados serão posteriormente analisados e submetidos à rotina histológica para microscopia de luz e coradas com Tricrômico de Masson.

O fígado de cada animal também foi retirado e analisado macroscopicamente, para verificar e esteatose hepática em cada grupo estudado.

5.6 Análise Estatística

Os resultados foram analisados através da estatística descritiva usando como ferramenta software GraphPad Prism (versão 5.0). Os dados desta análise foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). Primeiramente foi feito o teste de normalidade em cada grupo (G1, G2, G3 e G4), para verificar se os dados seguem ou não a distribuição normal. Para comparações entre os grupos (G1, G2, G3 e G4) foi utilizado One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Newman-Keuls. Para saber se existiam ou não diferenças significantes entre as médias, foi adotado o nível significância de 95% ($p < 0,05$).

Para facilitar a análise e visualização, os resultados são apresentados a seguir em forma de gráficos. O termo “Início”, foi utilizado para o dia anterior a administração das dietas experimentais (véspera do experimento).

A análise dos dados, foi realizada utilizando-se One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Newman-Keuls. Para saber se existia ou não diferença significativa entre as médias, foi adotado o nível significância de 95% ($p < 0,05$).

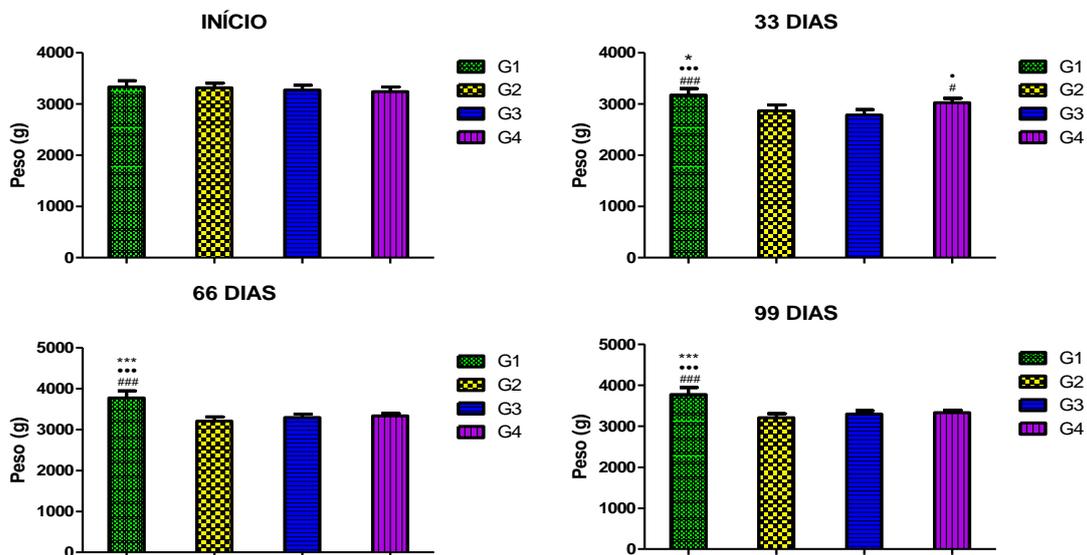
Os testes foram realizados calculando-se média \pm erro padrão da média.

6 RESULTADOS

6.1 Peso dos Animais

Os animais não apresentaram diferenças perceptíveis no que se refere ao peso, permanecendo com aspecto saudável. O manejo destes foi eficiente e o aumento de lipídios em sua alimentação demonstrou alterações aparentes antes da eutanásia e dissecação. Durante o experimento, observou-se aumento do peso similar entre os grupos, e não houve diferença significativa entre estes ao final da administração das dietas, conforme gráficos a seguir.

Gráfico 1 – Distribuição do peso dos coelhos na véspera, 33, 66 e 99 dias de experimento.



Fonte: Autor. Dados da pesquisa, 2012.

Nota: Peso (g) de G1 (controle ração), G2 (gema + rosuvastatina), G3 (gema + quitosana) e G4 (controle gema) no início, 33, 66 e 99 dias de protocolo experimental. Resultados expressos em média \pm E.P.M., (n =6). ***P<0,001 e *P<0,05 vs. G4; ###P<0,001 e #P<0,05 vs. G3; ***P<0,001 e *P<0,05 vs. G2. One-way ANOVA, seguido de Newman-Keuls.

Observa-se que, no início do experimento, não houve diferença significativa no que se refere ao peso. Sendo que apenas o Grupo G1 (Ração) teve ganho de peso durante o experimento, os demais grupos se mantiveram com peso relativamente estável.

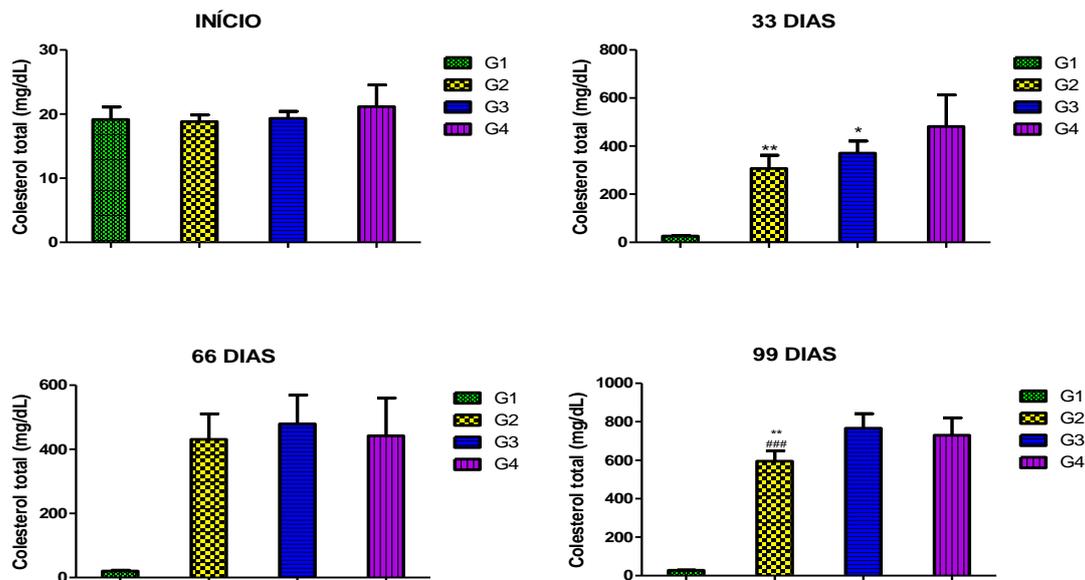
Conforme esperado, os grupos alimentados com gema de ovo de galinha apresentaram menor ganho de peso, o que foi significativo em comparação ao grupo G1 e não significativo ao se compararem aos demais grupos (G1, G2 e G3).

6.2 Taxas de colesterol total e frações

Os gráficos abaixo mostram a concentração sérica de Colesterol Total, assim como o LDL, VLDL, HDL e Triglicerídeos dos coelhos, antes e durante o experimento.

6.2.1 Colesterol Total

Gráfico 2 – Valores da taxa de colesterol total dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias.



Fonte: Autor. Dados da pesquisa, 2012.

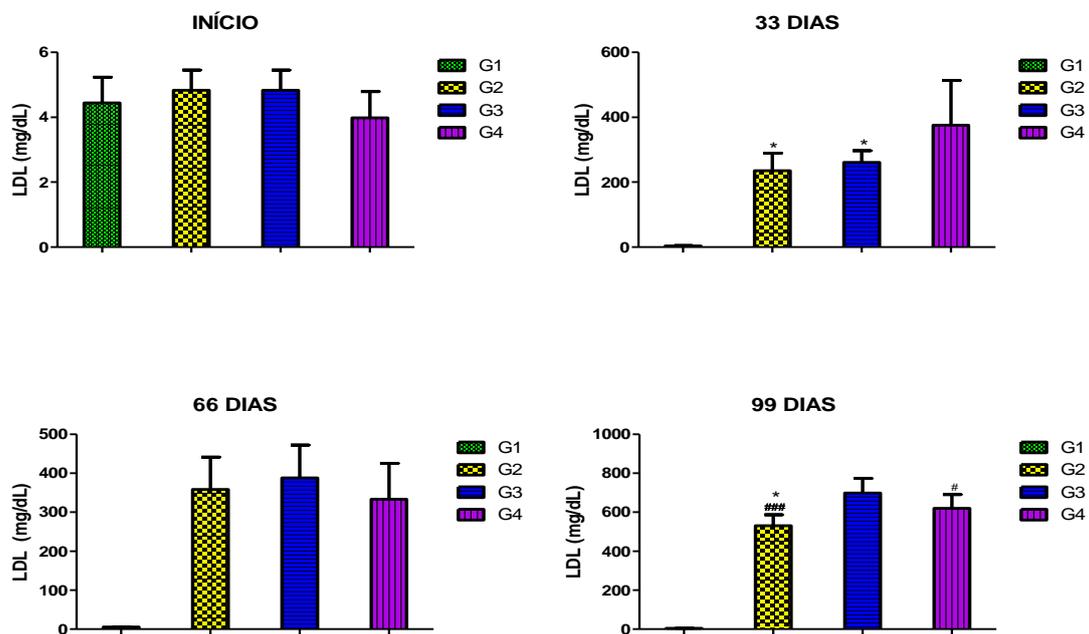
Nota: Colesterol Total (mg/dL) de G1 (controle ração), G2 (gema + rosuvastatina), G3 (gema + quitosana) e G4 (controle gema) no início, 33, 66 e 99 dias de protocolo experimental. Resultados expressos em média \pm E.P.M., (n =6). *P<0,05 e **P<0,01 vs. G4; ###P<0,001 vs. G3. One-way ANOVA, seguido de Newman-Keuls.

Observa-se que a véspera do experimento, as taxas de colesterol total esteve abaixo de 30 em todos os grupos, com pequenas variações não significantes. Estas taxas passaram de 400 mg/ dL em todos os grupos alimentados com gema de ovo de galinha após 66 dias, demonstrando a eficácia da dieta experimental em provocar hiperlipidemia.

A rosuvastatina (G2) e a quitosana (G3), foram capazes de reduzir o colesterol total de forma significativa apenas no dia 33. Ao final do experimento, aumentou as taxas de colesterol total em todos os grupos experimentais, apenas a rosuvastatina teve uma redução significativa em relação aos demais grupos, enquanto a quitosana parece ter perdido o efeito na redução do colesterol total.

6.2.2 Colesterol LDL

Gráfico 3 – Valores da taxa de colesterol LDL dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias



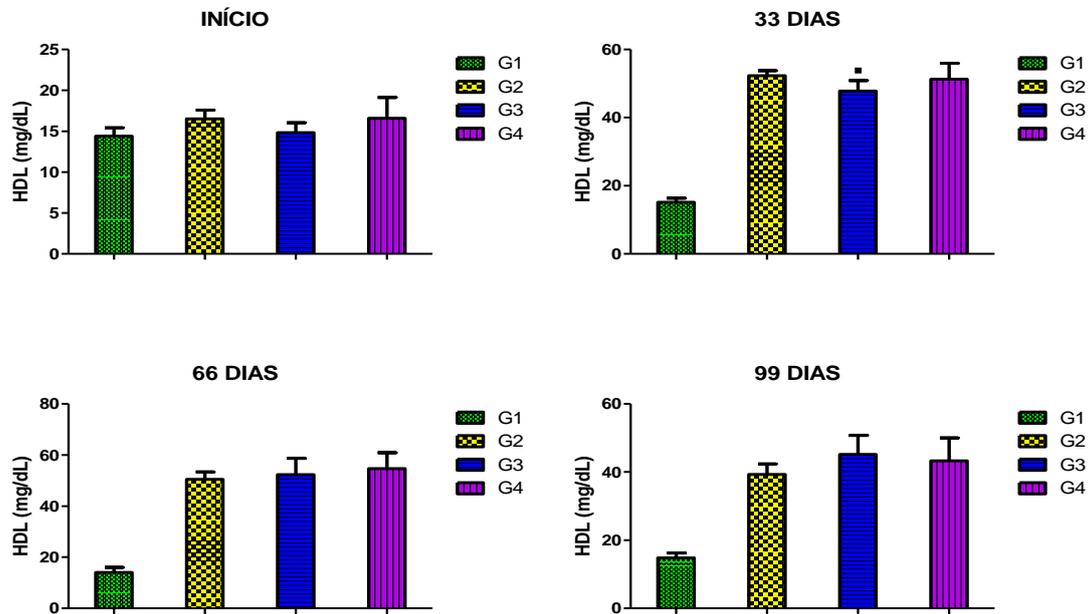
Fonte: Autor. Dados da pesquisa, 2012.

Nota: Colesterol LDL (mg/dL) de G1 (controle ração), G2 (gema + rosuvastatina), G3 (gema + quitosana) e G4 (controle gema) no início, 33, 66 e 99 dias de protocolo experimental. Resultados expressos em média \pm E.P.M., (n =6). *P<0,05 vs. G4; #P<0,05 e ###P<0,001 vs. G3. One-way ANOVA, seguido de Newman-Keuls.

Observa-se que no que se refere ao colesterol LDL, tanto a rosuvastatina, quanto a quitosana, foram capazes de reduzi-lo de forma semelhante e significativa em relação ao grupo G4 (gema) aos 33 dias, não tiveram um bom efeito aos 66 dias e aos 99 a quitosana aumentou o colesterol LDL de forma significativa em relação aos demais grupos.

6.2.3 Colesterol HDL

Gráfico 4 – Valores da taxa de colesterol HDL dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias.



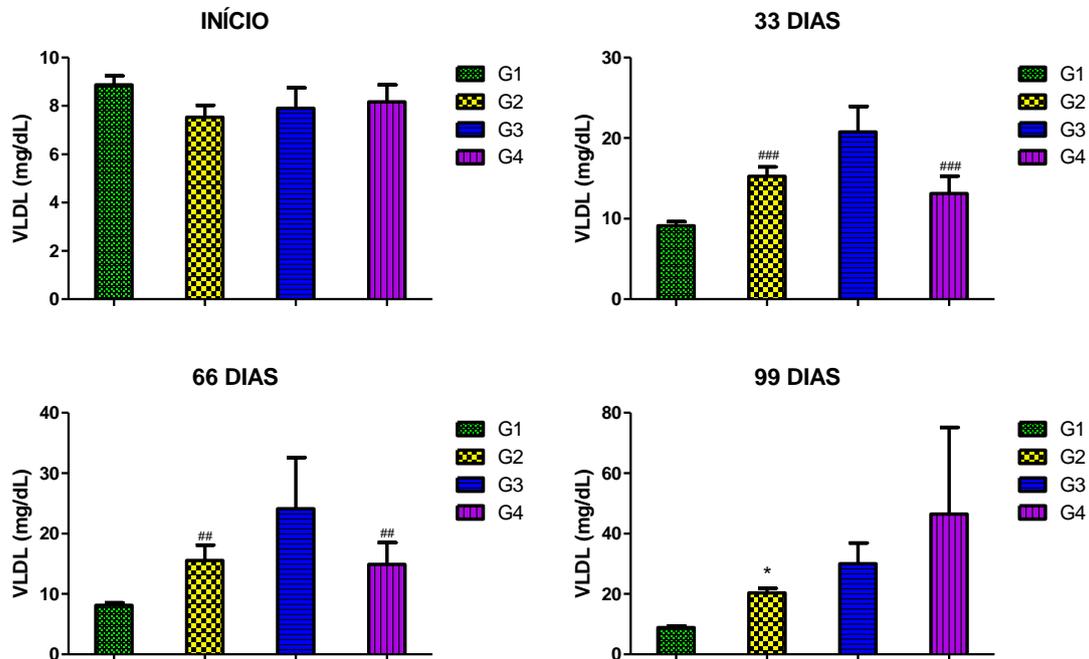
Fonte: Autor. Dados da pesquisa, 2012.

Nota: Colesterol HDL (mg/dL) de G1 (controle ração), G2 (gema + rosuvastatina), G3 (gema + quitosana) e G4 (controle gema) no início, 33, 66 e 99 dias de protocolo experimental. Resultados expressos em média \pm E.P.M., (n =6). [■]P<0,05 vs. G2. One-way ANOVA, seguido de Newman-Keuls.

Neste caso, observa-se que os índices de colesterol HDL, embora de forma não significante, diminuiu com o tempo de dieta hiperlipidêmica. Apenas aos 33 dias, a quitosana teve efeito significante e melhor que a rosuvastatina no que se refere a este item.

6.2.4 Colesterol VLDL

Gráfico 5 – Valores da taxa de colesterol VLDL dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias.



Fonte: Autor. Dados da pesquisa, 2012.

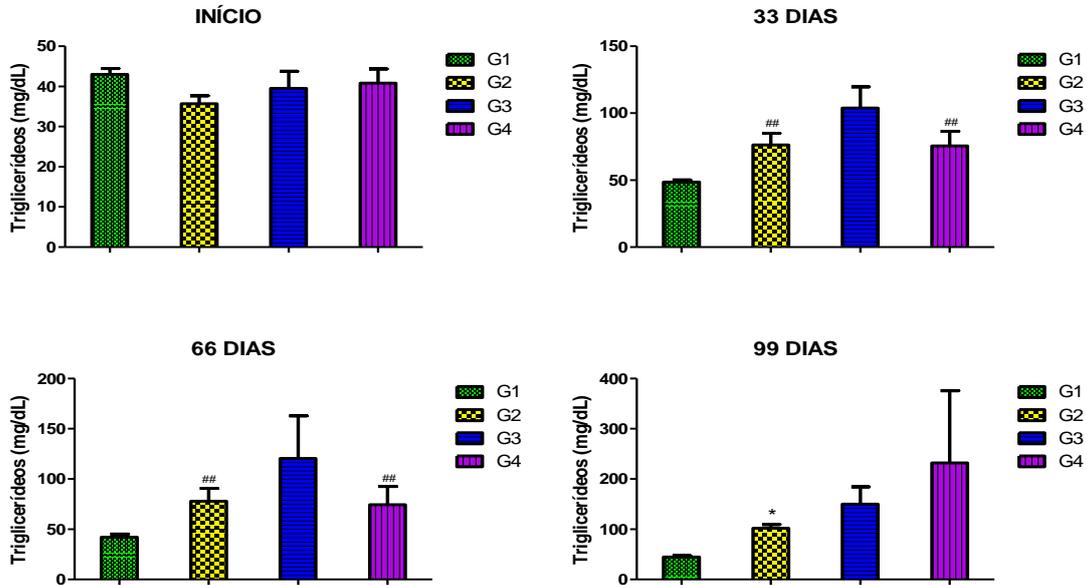
Nota: Colesterol VLDL (mg/dL) de G1 (controle ração), G2 (gema + rosuvastatina), G3 (gema + quitosana) e G4 (controle gema) no início, 33, 66 e 99 dias de protocolo experimental. Resultados expressos em média \pm E.P.M., (n =6). * $P < 0,05$ vs. G4; ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ vs. G3. One-way ANOVA, seguido de Newman-Keuls.

O colesterol VLDL esteve em níveis próximos no início do experimento, subiu em todos os grupos experimentais durante todo experimento, sendo que, comparativamente aos demais grupos, a quitosana não foi capaz de reduzi-lo aos 33 dias, estando maior até que o grupo alimentado apenas com gema de ovo de galinha. Apenas ao final do experimento, a quitosana foi capaz de reduzir o colesterol VLDL, no entanto o resultado foi não significativo. A rosuvastatina, teve sempre um melhor efeito durante todo o experimento, no que tange ao colesterol VLDL.

6.3 Triglicerídeos

Na análise dos níveis de Triglicerídeos, observou-se que como esperado, o resultado foi semelhante ao do colesterol VLDL.

Gráfico 6 – Valores da taxa de triglicerídeos dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias.

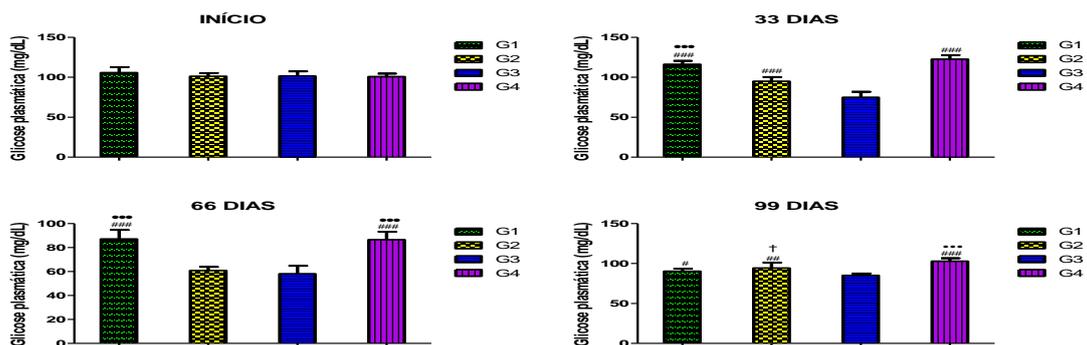


Fonte: Autor. Dados da pesquisa, 2012.

Nota: Triglicerídeos (mg/dL) de G1 (controle ração), G2 (gema + rosuvastatina), G3 (gema + quitosana) e G4 (controle gema) no início, 33, 66 e 99 dias de protocolo experimental. Resultados expressos em média \pm E.P.M., (n =6). *P<0,05 vs. G4; ##P<0,01 vs. G3. One-way ANOVA, seguido de Newman-Keuls.

6.4 Glicemia

Gráfico 7 – Valores dos índices glicêmicos dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias.



Fonte: Autor. Dados da pesquisa, 2012.

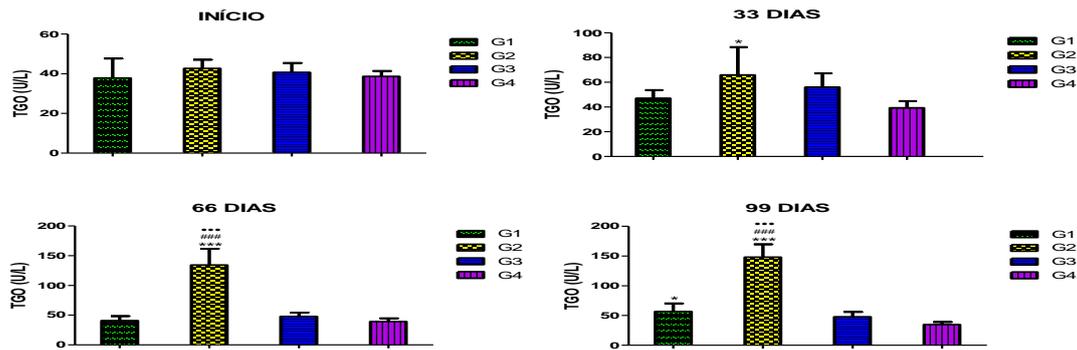
Nota: Glicose plasmática (mg/dL) de G1 (controle ração), G2 (gema + rosuvastatina), G3 (gema + quitosana) e G4 (controle gema) no início, 33, 66 e 99 dias de protocolo experimental. Resultados expressos em média \pm E.P.M., (n =6). ###P<0,001/ ####P<0,0001 e ****P<0,0001 vs. G2; †P<0,05 vs. G1. One-way ANOVA, seguido de Newman-Keuls.

Em relação a glicemia, observou-se um excelente efeito anti-hiperglicemiante

da quitosana, significativa ao ser comparada em todos os grupos experimentais, apesar da rosuvastatina também ter demonstrado um bom efeito em relação a este item, a quitosana foi bem melhor.

6.5 T.G.O.

Gráfico 8 – Índice da TGO dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias.



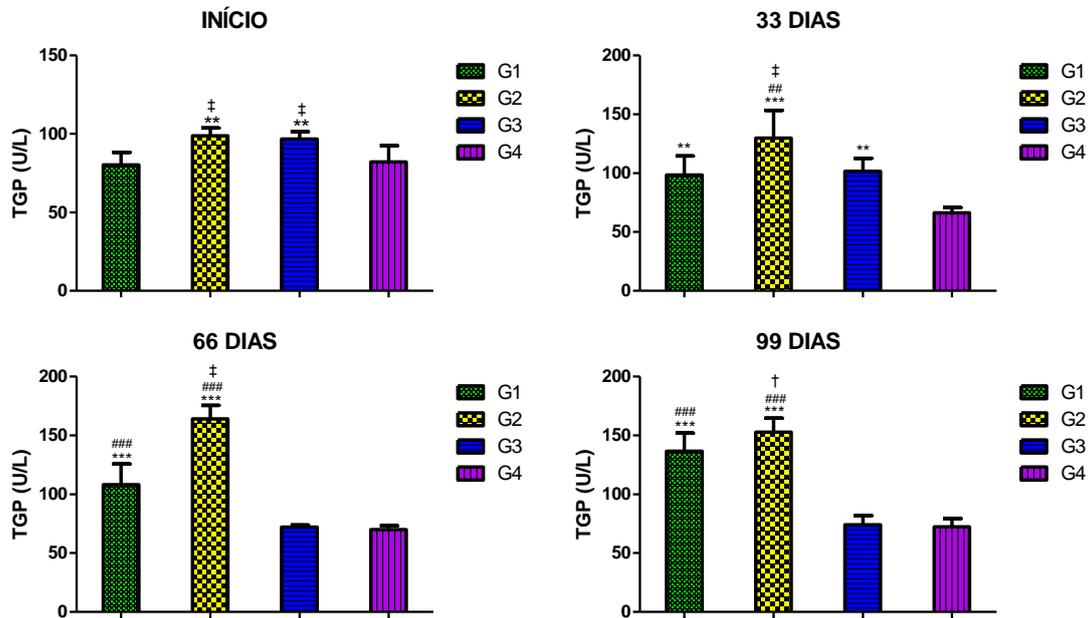
Fonte: Autor. Dados da pesquisa, 2012.

Nota: TGO (U/L) de G1 (controle ração), G2 (gema + rosuvastatina), G3 (gema + quitosana) e G4 (controle gema) no início, 33, 66 e 99 dias de protocolo experimental. Resultados expressos em média \pm E.P.M., (n =6). *P<0,05 e ***P<0,001 vs. G4; ###P<0,001 vs. G3; ***P<0,001 vs. G1. One-way ANOVA, seguido de Newman-Keuls.

O resultado das estatinas ocorreu conforme o esperado, pois como se sabe todas elas são hepatotóxicas. Quanto ao G4(Grupo Gema) para que se chegue a um nível de aumentar a TGO. Isso só ocorreria a longo prazo, por vários anos, para acumular um nível importante de gordura no fígado.

6.6 T.G.P.

Gráfico 9 – Índice da TGP dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias.



Fonte: Autor. Dados da pesquisa, 2012.

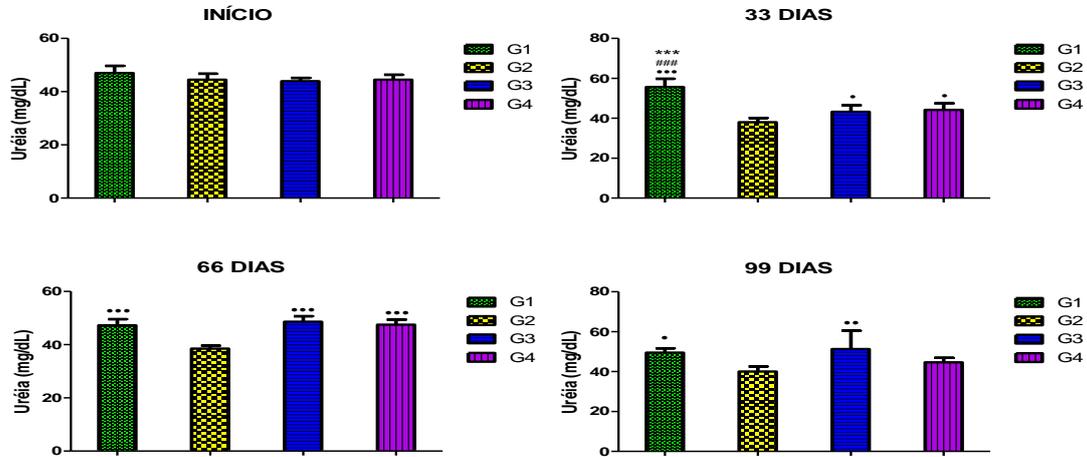
Nota: Índice da TGP dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias. TGP (U/L) de G1 (controle ração), G2 (gema + rosuvastatina), G3 (gema + quitosana) e G4 (controle gema) no início, 33, 66 e 99 dias de protocolo experimental. Resultados expressos em média \pm E.P.M., (n =6).

P<0,01 e *P<0,001 vs. G4; ##P<0,01 e ###P<0,001 vs. G3; †P<0,001 e †P<0,05 vs. G1. One-way ANOVA, seguido de Newman-Keuls.

O resultado das estatinas ocorreu conforme o esperado, pois como se sabe todas elas são hepatotóxicas. Quanto ao G4 (Grupo Gema) para que se chegue a um nível de aumentar a TGO. Isso só ocorreria a longo prazo, por vários anos, para acumular um nível importante de gordura no fígado.

6.7 Uréia

Gráfico 10 – Níveis de uréia dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias.



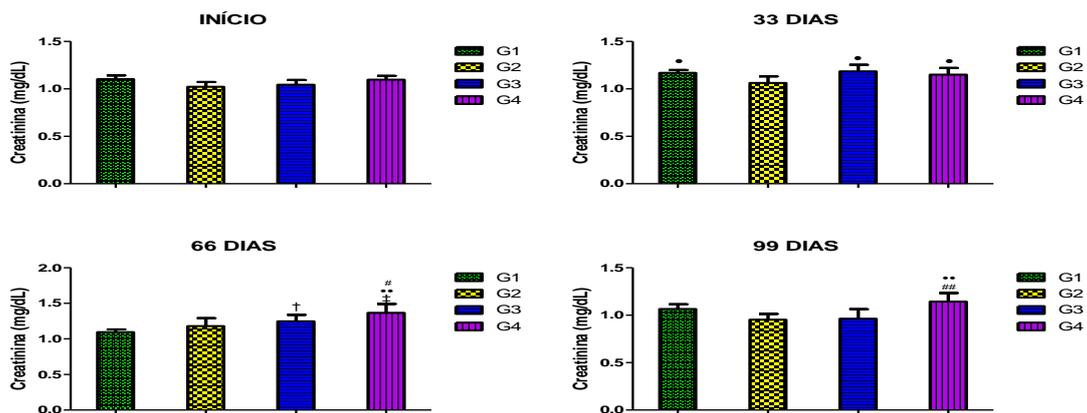
Fonte: Autor. Dados da pesquisa, 2012.

Nota: Uréia plasmática (U/L) de G1 (controle ração), G2 (gema + rosuvastatina), G3 (gema + quitosana) e G4 (controle gema) no início, 33, 66 e 99 dias de protocolo experimental. Resultados expressos em média \pm E.P.M., (n =6). ***P<0,001 vs. G4; ###P<0,001 vs. G3; **P<0,001/ *P<0,01 e †P<0,01 vs. G2. One-way ANOVA, seguido de Newman-Keuls.

Observa-se que ao final do experimento, apenas a rosuvastatina foi capaz de reduzir os níveis de ureia plasmática.

6.8 Creatinina

Gráfico 11 – Níveis de creatinina dos grupos no início do experimento, 33, 66 e 99 dias.



Fonte: Autor. Dados da pesquisa, 2012.

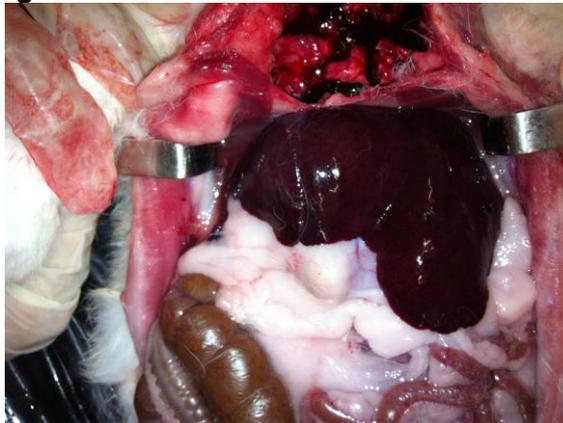
Nota: Creatinina plasmática (U/L) de G1 (controle ração), G2 (gema + rosuvastatina), G3 (gema + quitosana) e G4 (controle gema) no início, 33, 66 e 99 dias de protocolo experimental. Resultados expressos em média \pm E.P.M., (n =6). ##P<0,01 e #P<0,05 vs. G3; **P<0,01 e †P<0,05 vs. G2; ‡P<0,001 e †P<0,5 vs. G1. One-way ANOVA, seguido de Newman-Keuls.

Observa-se que ao final do experimento, a rosuvastatina e a quitosana foram capazes de reduzir de forma semelhante os níveis de creatinina plasmática em relação ao grupo onde houve complemento apenas de gema na dieta.

6.9 Análise dos Fígados

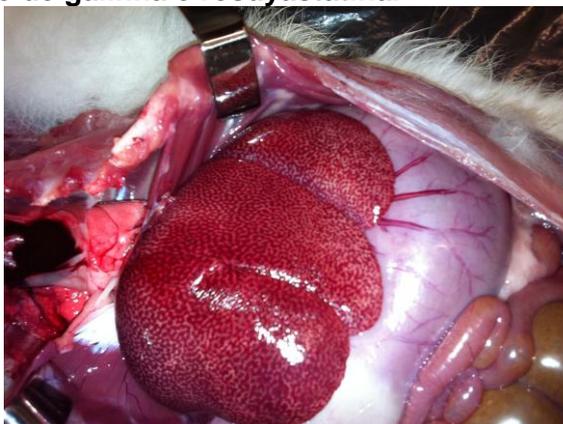
A análise macroscópica dos fígados realizada demonstrou que o modelo experimental foi capaz de produzir esteatose hepática e que tanto a rosuvastatina quanto a quitosana foram capazes de melhorar os efeitos da dieta hiperlipidêmica sobre o fígado.

Figura 3 – Aspecto do fígado normal em animais alimentados apenas com ração.



Fonte: Autor. Acervo pessoal, 2012.

Figura 4 – Aspecto da esteatose hepática nos animais com dieta complementada com gema de ovo de galinha e rosuyastatina.



Fonte: Autor. Acervo pessoal, 2012.

Figura 5 – Aspecto do fígado nos animais com dieta complementada com gema de ovo de galinha e quitosana.



Fonte: Autor. Acervo pessoal, 2012.

Figura 6 – Aspecto da esteatose hepática nos animais com dieta complementada com gema de ovo de galinha.



Fonte: Autor. Acervo pessoal, 2012.

7 DISCUSSÃO

7.1 Etiologia da Aterosclerose

Considerada uma patologia complexa, a aterosclerose ocorre em artérias de grande e médio calibre, tendo como localizações as coronárias, carótidas e aorta (HANSSON, 2001; MA et al., 2008; DIJK et al., 2010;), sendo na aorta onde mais surgem alterações ateroscleróticas precocemente (OLIVEIRA et al., 2004). No modelo experimental em coelhos observamos que as lesões ateroscleróticas são mais visíveis macroscopicamente na aorta, particularmente no arco.

A lesão aterosclerótica é a anormalidade mais comum encontrada nas artérias decorrente inicialmente de dois processos básicos: acúmulo de colesterol e a proliferação de células musculares lisas na túnica íntima, desenvolvendo-se, portanto, sobre um substrato formado dessas células, leucócitos derivados do sangue e de uma quantidade variável de tecido conectivo formando uma placa fibrosa que se projeta para dentro do lúmen modificando a túnica média e levando a uma série de complicações circulatórias (CORRÊA-CAMACHO; DIAS-MELICIO; SOARES, 2007). Em todos os trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa, não seria possível chegar ao nível de placa fibrosa, haja vista que nós realizamos apenas 100 dias de experimento, passando disso, alguns animais sofriam acidente vascular encefálico, ou infarto do miocárdio, ou ainda poderiam vir a óbito devido a transtornos gastrintestinais.

O desenvolvimento da aterosclerose é lento, com início precoce a agressão ao endotélio vascular devido a diversos fatores de risco como elevação de lipoproteínas aterogênicas, hipertensão arterial ou tabagismo e tem o ateroma, como característica do depósito de lipídeos na camada íntima da artéria, (ARAB et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004; JONGSTRA-BILEN, 2006; BRAGA; BARLETA, 2007; SPOSITO et al., 2007; LAI et al., 2009). Também Hastings et al., 2007; Hahn; Schwartz, 2009, bem como Ribeiro; Shikatu, 2004; Venâncio; Burini; Yoshida, 2004, descreveram alterações importantes na luz arterial. Neste trabalho, a elevação de lipoproteínas na dieta, foi capaz de produzir aterosclerose e tanto a rosuvastatina quanto a quitosana, foram capazes de melhorar a esteatose, bem como a

bioquímica sanguínea, contudo, não concluímos a análise histológica dos vasos, a qual pretendemos realizar posteriormente.

Observações fisiopatológicas em seres humanos e animais levantam a hipótese de que a aterosclerose é resultante de uma resposta do organismo à lesão tecidual com enfoque para a disfunção endotelial. Evidências acumulam-se no sentido de sugerir que a lipoproteína de baixa densidade (LDL) modificada pela oxidação (LDL ox) é o principal fator envolvido no desencadeamento da lesão (CORRÊA-CAMACHO; DIAS-MELICIO; SOARES, 2007).

O processo aterosclerótico causa alteração no funcionamento do endotélio vascular, sendo considerado como extremamente dinâmico e progressivo resultante da combinação entre a disfunção endotelial e a inflamação, (DENARDI; CASELLA FILHO; CHAGAS, 2008; CHUMAEVA et al., 2010). Sendo um processo que está relacionado a uma resposta inflamatória crônica da parede arterial, cuja progressão é mantida pela interação entre as lipoproteínas modificadas, macrófagos derivados de monócitos, linfócitos T e constituintes celulares normais da parede arterial que contribuem para o crescimento e desenvolvimento da placa, e finalmente sua ruptura (CHEN; CHANG; JIANG, 1999; COTTIN et al., 2001; MASSBERG et al., 2002; HOWARD-ALPE; RAUDALES et al., 2006; SEAR; FOEX, 2006; CASTRO et al., 2004; LITTE; BALLINGER; OSMAN, 2007; ZANDBERGEN; PLUTZKY, 2007; ABDALLA; SENA, 2008; YUSOF; MILES; CALDER., 2008; HYAFIL et al., 2009; DORNAS et al., 2010; TZIAKAS et al., 2010).

Já são claros os efeitos do colesterol, conforme mencionado pelos autores acima. No presente experimento, observou-se que tanto a rosuvastatina, quanto a quitosana, foram capazes de reduzir os níveis de colesterol LDL de forma semelhante e significativa em relação ao grupo G4 (gema) aos 33 dias, não tiveram um bom efeito aos 66 dias e aos 99 a quitosana aumentou o colesterol LDL de forma significativa em relação aos demais grupos.

7.2 Formação da Placa Aterosclerótica

Segundo Wilmore e Costill (2001) o surgimento da arteriosclerose ocorre a partir do momento que um irritante sanguíneo lesa ou arranha a parede arterial e expõe o tecido conjuntivo subjacente, desta forma as plaquetas e os monócitos circulantes são então atraídos ao local da lesão e aderem ao tecido conjuntivo exposto. As plaquetas liberam uma substância denominada fator do crescimento derivado da plaqueta (PDGF), que promove a migração das células musculares lisas da túnica média para a túnica íntima. Os lipídeos séricos, especificamente as LDL são depositados na placa. Quando pedaços da placa são desprendidos, podem iniciar a formação de coágulos que se alojam em outras partes do vaso.

Dessa forma, a placa de ateroma é formada por depósitos de gordura, principalmente de colesterol, na camada íntima da artéria e que tem sua formação iniciada por lesões endoteliais decorrentes dos fatores de risco aos quais o indivíduo está exposto. Um aumento da espessura da camada íntima é observado, podendo sofrer deposição de sais de cálcio, produzindo diferentes graus de calcificação distrófica que recebem o nome de ateromas (SUNG; FRIEDLANDER; KOBASHIGAWA, 2004).

Sposito et al. (2007) refere que a aterotrombose, é um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose.

Localiza-se preferencialmente na aorta abdominal, nas artérias coronárias, no segmento arterial ílio-femoral e na região encefálica; nas artérias carótidas internas e nas artérias do polígono de Willis, poupando as artérias dos membros superiores, as mesentéricas e renais, à exceção dos seus óstios (BECKSTROM et al., 2007). Estudos sugerem duas fases interdependentes na evolução da aterosclerose: na primeira fase predomina uma formação anatômica de lesão aterosclerótica sob influência dos fatores de risco aterogênico e que leva décadas para evoluir. Tem uma história insidiosa (FUSTER, 1994).

A dislipidemia, condição na qual há concentrações anormais de lipídios ou lipoproteínas no sangue, é um fator de risco importante para o desenvolvimento de complicações da aterosclerose (ROMALDINI et al., 2004).

Os níveis de colesterol plasmáticos variam conforme a idade e sexo, iniciando sua produção com o nascimento, mostrando leve depressão na adolescência e sofrendo elevação na idade adulta, as mulheres costumam apresentar menores níveis de colesterol, quando comparados a homens da mesma idade (MELO; FRÉZ, E.; FRÉZ, M., 2008). A concentração das lipoproteínas LDL e HDL, na corrente sanguínea, além de estar relacionada com o perfil genético, também são influenciadas por hábitos alimentares (GIROLDO; ALVES; BAPTISTA, 2007; KOLANKIEWICZ; GIOVELLI; BELLINASSO, 2008). Esta descrição corrobora com o que foi encontrado em nosso experimento, com o aumento de lipídios na dieta, aumentaram também os níveis plasmáticos de colesterol.

Entre as lipoproteínas (frações do colesterol total), a de baixa densidade “Low Density Lipoprotein (LDL colesterol)”, tem sido apontada como a mais importante constituinte da composição do ateroma. Por outro lado, a de alta densidade “High Density Lipoprotein (HDL colesterol)”, atuaria no transporte reverso do colesterol, diminuindo ou estagnando a formação da placa (MARTINS et al.,1996). Apesar de não termos estudado estagnação de placas nesta pesquisa, devido ao tempo de experimento, consideramos que esta informação já é um consenso científico. A interferência da dieta sobre os lipídios, também foi mencionada por Carvalho (1988).

As dislipidemias primárias ou sem causa aparente podem ser classificadas genotipicamente ou fenotipicamente através de análises bioquímicas, considera os valores do CT, LDL, TG e HDL. Compreendem quatro tipos principais bem definidos em hipercolesterolemia isolada, hipertrigliceridemia isolada, hiperlipidemia mista e diminuição isolada do HDL ou associada ao aumento dos triglicéridos ou LDL (CASTRO et al., 2004; CHACRA; DIAMENT; FORTI, 2005). Em nosso modelo experimental, observamos aumento de todos indicadores, conforme descrito por estes autores.

A dieta gordurosa com ácido graxo saturado, é um importante fator que eleva o nível de LDL, assim a hiperlipidemia está associada com a aceleração da aterosclerose, de modo que a substituição isocalórica dos ácidos graxos saturados por ácidos graxos poli-insaturados reduz os níveis do CT e o LDL plasmáticos (COTTIN et al., 2001; SPOSITO et al., 2007; WAQAR et al., 2010). Desta forma os

padrões dietéticos estão relacionados com as doenças cardiovasculares, sendo associadas à alimentação, principalmente com ingestão elevada de lipídios e colesterol (CASTRO et al., 2004). Pudemos constatar com nossos resultados, que estes autores estão corretos ao afirmar que a dieta influi nos índices lipídêmicos, conforme amplamente demonstrado nesta pesquisa.

O colesterol plasmático em coelhos da raça Nova Zelândia é baixo, numa média de 1,3 mmol/l, mas pode aumentar até 2-8 vezes após a administração de uma dieta enriquecida com 0,1-2% de colesterol, dentro de 20 dias (FINKING; HANKE, 1997). Como coelhos têm sido utilizados vastamente para estudar o desenvolvimento de aterosclerose em humanos, pelo rápido desenvolvimento das lesões produzidas com suplemento de colesterol na dieta, alcançando hipercolesterolemia moderada com níveis de colesterol plasmáticos na faixa de 200 a 800 mg/dl, podendo ser superior a 1.000 mg/dl que causa lesão (SUZUKI; YEUNG; IKENO, 2008; DORNAS et al., 2010; SUZUKI), por terem baixa concentração plasmática de colesterol total e lipoproteínas HDL como dominante, o VLDL passa a ser a principal classe de lipoproteínas plasmáticas, quando expostos à dieta rica em colesterol (SINGH; RAY, 1994).

Quando alimentados com dietas ricas enriquecida em gordura saturada aumentam os níveis plasmáticos de colesterol devido à lenta excreção de colesterol exógeno (IHARA et al., 1998; LANCELOTTI et al., 2010), também mencionado por (CONSTANT, 2004; ZHANG; XU; LI, 2009), este aumento significativo na concentração de colesterol plasmático é devido a alimentação com ração suplementada com gema de ovo (JALDIN et al., 2006), pois cada ovo de galinha apresenta concentração de colesterol de 956 mg/dl (RAMALHO et al., 2007). No modelo descrito por Bernardino (2008), a dieta suplementada com gema de ovo, foi capaz de aumentar o colesterol total em mais de 15 vezes o valor inicial no grupo não tratado. Em nosso entendimento, isso demonstra que a dieta é o principal fator responsável pela hipercolesterolemia.

A primeira vez que aterosclerose foi induzida em coelhos alimentando-os com gema de ovo e colesterol puro teve resposta em algumas semanas de dieta: a aorta de 90% dos coelhos apresentou placas acinzentadas semelhantes às das coronárias

de homens vítimas de infarto do miocárdio. Posteriormente, o autor concluiu que o colesterol não era o único responsável pelos aparecimentos das placas ateroscleróticas, uma vez que repetiu os experimentos em ratos e cachorros e não obteve o mesmo resultado (ANITSCHKOW; CHALATOW, 1913). Em nosso grupo de pesquisa, observamos que o coelho tem metabolismo mais lento e isso o faz desenvolver aterosclerose com mais facilidade.

Segundo Martinello (2006) o coelho foi o primeiro modelo de animal usado na pesquisa da aterosclerose. Acrescenta ainda que esta espécie possui um metabolismo lipoprotéico muito semelhante ao de humanos, exceto por sua deficiência na lipase hepática. Devido à fácil absorção, os coelhos respondem muito bem à dieta altamente gordurosa ou colesterolêmica e desenvolvem lesões em curto período de tempo. No entanto, as lesões contêm mais gordura e macrófagos que as de humanos e os níveis plasmáticos de colesterol são extremamente altos, diferente dos humanos. Luz, Laurindo e Chagas (2003) acrescentam que estudos experimentais demonstraram que, em animais submetidos a dieta hipercolesterolêmica, a reatividade vascular encontra-se diminuída em cerca de dez semanas após a instituição da dieta. Observamos em nossos resultados intensa hipercolesterolemia, sem a necessidade de administrar colesterol puro, a dieta com gema é capaz sozinha de produzir intensas alterações hiperlipidêmicas.

O modelo experimental em roedores é frequentemente usado para avaliar os efeitos hipolipemiantes de muitos compostos naturais e sintéticos, contudo, nem todas as espécies apresentam o metabolismo lipoprotéico comparável ao de humanos (MARTINELLO, 2006).

Em 2008, Bernardino testou com sucesso uma dieta experimental baseada em gema de ovo, para a produção de aterosclerose experimental em coelhos albinos *Oryctolagus cuniculus*, descrevendo em detalhes o procedimento. Esta dieta foi tão eficaz quanto modelos amplamente descritos que utilizam colesterol puro dissolvido em peletas ou administrado por qualquer outra forma. Este foi o primeiro trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa, a dieta foi idealizada pelo orientador (Sousa-Rodrigues), o que permitiu a execução de 5 trabalhos experimentais antes deste, com resultados amplamente eficazes.

7.3 Quitosana

A quitosana, é um polissacarídeo nutracêutico são alimentos potencialmente saudáveis que desenvolvem um papel na manutenção de bem-estar humano, melhorando a saúde (MASSARO et al., 2010). Essa substância não é verdadeiramente um alimento, está entre um híbrido de “nutrientes” e “farmacêuticos” que proporciona benefícios medicinais (ANDLAUER; FURST, 2002; LIRA et al., 2009), e podem ser classificados como fibras dietéticas, ácidos graxos poli-insaturados, proteínas, peptídeos, aminoácidos, minerais e antioxidantes (MORAES; COLLA, 2006). É encontrada em abundância na natureza, principalmente em carapaça de crustáceos. (CANELLA; GARCIA, 2001). Pode também estar naturalmente presente em alguns fungos, como aqueles pertencentes aos gêneros Mucor e Zygomycetes (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006) e não é digerida pelas enzimas digestivas (EBIHARA; SCHNEEMAN, 1982; MAEZAKI; TSUJI; NAKAGAWA, 1993; MUZZARELI, 1983).

Na presente pesquisa, não estudamos as propriedades físico-químicas da quitosana por estas, a nosso ver já estarem bem estabelecidas, nos preocupamos em verificar seus efeitos, no modelo em coelhos, ao que parece, é mais eficiente no início do tratamento para a redução do colesterol LDL, não sendo portanto tão eficiente como os efeitos da rosuvastatina. O autor acredita que talvez, o organismo se adapte a ingestão de quitosana e com o tempo consiga absorver com mais eficácia os lipídios ingeridos.

Partindo do princípio que derivados de quitina e quitosana podem ser preparados a fim de se melhorar sua solubilidade em água, as aplicações destes polímeros podem aumentar significativamente (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). Acreditamos que talvez este autor possa ter razão, contudo não vemos os resultados como tão confiáveis e animadores.

7.4 Efeitos da Quitosana

Autores referem com frequência que dietas ricas em fibras alimentares promovem efeitos benéficos para a saúde do homem, tendo sido verificado que alimentos ricos em fibras solúveis apresentam importante efeito no metabolismo da

glicose e de lipídios (KRITCHEVSKY; STORY, 1986; PERIAGO et al., 1993; HENNEN, 1996; MAEZAKI et al., 1996; KRITCHEVSKY, 1997; JENKINS et al., 1998; OMROD; HOLMES; MILLER, 1998; DERIVI; MENDEZ, 2001; GREGORIO; AREAS; REYES, 2001; YLITALO et al., 2002; COHEN, 2004; XIA et al., 2011). Estudos sugerem, ainda, que o propionato, produzido pela fermentação bacteriana das fibras no cólon, pode exercer um controle na síntese do colesterol (BERGMAN, 1990).

Em particular, a quitosana pode diminuir a concentração de colesterol no soro e fígado. No entanto, não há quaisquer outros relatórios sobre os efeitos da quitosana sobre as funções do fígado em outros animais (KIM et al., 1997).

A função específica do receptor de LDL é remover as partículas de lipoproteínas ricas em colesterol da circulação (XU et al., 2007).

Não foi objetivo do presente estudo realizar análise das atividades hepáticas da quitosana, contudo, observamos sua eficácia na redução do colesterol (particularmente o LDL), nos primeiros dias de experimento.

Um estudo publicado no American Journal of Clinical Nutrition constatou que a quitosana é tão eficaz em mamíferos como cholestyramine (um medicamento hipolipemiante) no sangue controlando o colesterol sérico sem os efeitos secundários deletérios típicos de cholestyramine. A diminuição dos níveis de colesterol no sangue é cerca de 66,2 por cento após o uso de quitosana (HENNEN, 1996). Concordamos com estes autores quando referem que a quitosana não tem efeitos deletérios, pois encontramos bons resultados da quitosana na redução do TGO e TGP (melhor que a rosuvastatina que teve nesse caso um péssimo efeito), assim como da creatinina, onde a quitosana foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de forma semelhante a da rosuvastatina. A quitosana não foi tão eficiente apenas na redução dos níveis plasmáticos de ureia em relação a rosuvastatina. Acreditamos que os efeitos sobre a ureia devem ser melhor analisados.

Houve também muitos relatos sobre efeitos anticâncer, antimicrobianos e efeitos imunorreativos após o uso de quitosana, (KIM et al., 1997). Diante destes

relatos, acreditamos que o papel da quitosana ainda não foi totalmente definido, embora pudéssemos constatar alguma eficácia, não acreditamos que seja assim tão boa no tratamento da hiperlipidemia, embora possa ser utilizada de forma complementar a tratamentos mais tradicionais.

7.5 Rosuvastatina

Este fármaco pode ser usado isoladamente ou em combinação, mas estão sempre acompanhados da necessidade de dieta significativamente pobre em lipídios, especialmente o colesterol e gorduras saturadas, e o conteúdo calórico da dieta deve ser acompanhado rigorosamente (HARVEY; CHAMPE, 1997). Nos parece óbvio que o tratamento é muito melhor com a redução da ingestão de lipídios na dieta. A rosuvastatina apesar de ter reduzido o colesterol LDL, em nossos resultados pudemos constatar que mesmo com alguma redução, este ainda se manteve extremamente alto.

As principais classes de substâncias utilizadas clinicamente são: as estatinas inibidoras HMG-CoA redutase (sinvastatina, lovastatina, pravastatina e atorvastatina), fibratos (bezafibrato, ciprofibrato, genfibrozila, fenofibrato e clofibrato), resinas de ligação de ácidos biliares (colestiramina e colestipol), ácido nicotínico, probucol e óleo de peixe ômega 3 (RANG et al., 2004).

Este grupo farmacológico é eficaz no tratamento da hipercolesterolemia e possui uma excelente tolerabilidade na população de dislipidêmicos (HARVEY; CHAMPE, 1997; RANG et al., 2003; CHAGAS; GALVÃO, 2007; SILVA, 2010). Concordamos que as estatinas tem um excepcional efeito na redução da hipercolesterolemia, pois estes efeitos foram bem evidenciados nos resultados deste experimento.

Jorge et al (2005) realizaram um experimento sobre o efeito das estatinas atorvastatina, fluvastatina, pravastatina e sinvastatina sobre a função endotelial, a peroxidação lipídica e a aterosclerose aórtica em coelhos hipercolesterolêmicos utilizando 0,5 de colesterol na dieta durante 45 dias, e concluíram que todas as estatinas tiveram efeito significativo e similar em reduzir a peroxidação lipídica nas LDL e na parede arterial, na regressão da aterosclerose aórtica e na reversão da

disfunção endotelial, na redução do colesterol total plasmático, no teor de malonodialdeído na parede arterial.

A comparação da eficácia da rosuvastatina com as estatinas existentes no mercado descrita por Chagas e Galvão (2007) foi semelhante ao que pudemos observar em nossos resultados, quando afirmaram que este fármaco seria capaz de reduzir entre 20 e 25% desta fração de colesterol.

7.6 Efeitos da Rosuvastatina

Campo e Carvalho, 2007, afirmaram que medicamentos reduzem o LDL-c de 15% a 55% em adultos. Este resultado também foi constatado em coelhos, contudo o resultado foi pior com o decorrer do tempo, o que sugere que a dieta hipolipidêmica também é extremamente importante para diminuir os efeitos nocivos a saúde provocados pelo acúmulo lipídico.

Ainda que inicialmente as estatinas se introduziram no mercado como fármacos para diminuir o colesterol, estas possuem múltiplas atividades ateroprotetoras independentes como: melhorar a disfunção endotelial, inibir a inflamação vascular, inibir trombose, além de diminuir o estresse oxidativo. Essas ações são conhecidas como efeitos pleiotrópicos das estatinas, pois os benefícios não são observados apenas em pacientes hiperlipidêmicos, mas também, nos pacientes normolipidêmicos (MENNICKENT et al., 2008). Neste trabalho, não estudamos estes efeitos, contudo acreditamos que eles já estão bem definidos em inúmeros experimentos.

Os efeitos adversos são raros durante tratamento com estatinas. Os mais graves, como hepatite, miosite e rabdomiólise, são observados ainda mais raramente. No entanto, para identificar possíveis efeitos adversos recomenda-se a dosagem dos níveis basais de creatinofosfoquinase (CK) e de transaminases (especialmente de ALT) e a repetição na primeira reavaliação ou a cada aumento de dose (SPOSITO et al., 2007).

Neste trabalho, não analisamos a CK, nem transaminases, contudo não observamos bom efeito na redução da TGO e da TGP, observamos que este fármaco não conseguiu ser hepatoprotetor.

7.7 Considerações Finais a Respeito dos Fármacos Analisados

Nos resultados observamos que apenas a rosuvastatina manteve um efeito constante em reduzir o colesterol total durante todo o experimento, já em relação ao colesterol LDL, a quitosana demonstrou um ótimo efeito a princípio, mas com o passar do tempo aumentaram seus índices, como comentamos antes, parece ter perdido seu efeito e inclusive aumentou mais do que no grupo alimentado apenas com ração e gema de ovo. Em relação ao colesterol HDL, nenhum dos fármacos teve efeito significativo.

Observamos também que a rosuvastatina teve um bom efeito no que se refere aos índices de colesterol VLDL, enquanto a quitosana teve um péssimo efeito, como era de se esperar o mesmo comportamento foi observado no que se refere aos triglicérides.

Observamos um efeito animador no que tange a glicemia, tanto a rosuvastatina quanto a quitosana, foram capazes de reduzir a glicemia, contudo a quitosana demonstrou um resultado extremamente melhor, demonstrando um excepcional e significativo efeito antihiperlipêmico.

CONCLUSÃO

Considerando o modelo experimental em coelhos, podemos concluir que:

1. Coelhos com dieta complementada com gema de ovo de galinha ganham menos peso do que os animais com dieta convencional.
2. A rosuvastatina reduz as taxas de colesterol total e mantém esta redução com o tempo, já a quitosana não é capaz de manter uma redução constante.
3. Com o passar do tempo, a quitosana perde efeito na redução do colesterol LDL e leva a um aumento de seus níveis plasmáticos.
4. Nem a rosuvastatina, nem a quitosana melhoram de forma significativa os níveis de colesterol HDL nos casos de dietas hiperlipidêmicas.
5. A rosuvastatina tem um bom efeito, tanto na redução de colesterol VLDL quanto dos triglicérides, enquanto a quitosana tem efeito contrário, aumenta muito os índices hemáticos destes lipídios.
6. A quitosana tem um efeito hepatoprotetor, reduz a TGO e a TGP, enquanto a rosuvastatina agride os hepatócitos.
7. Tanto a a rosuvastatina quanto a quitosana não interferem na função renal
8. Diferentemente da quitosana, apenas a rosuvastatina é capaz de reduzir de forma satisfatória os níveis de ureia, mostrando não ter efeito agressivo ao rim.
9. A rosuvastatina tem um bom efeito antihiperglicemiante, enquanto a quitosana tem este mesmo efeito de forma excelente e bem melhor.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, D. S. P.; SENA, K. C. M. Lipid peroxidation biomarkers in atherosclerosis. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 21, n. 6, p. 749-756, 2008. ISSN1415-5273.
- ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Res. Int.**, Essex, v. 35, p. 171-176, 2002. ISSN 0963-9969.
- ANITSCHKOW, N.; CHALATOW, S. Ueber expermentalle cholesterinsteatose und ihre bedeutung für die entstehung einiger pathologischer prozesse. **Centralbl. Zent.Bl. Allg. Pathol. Patol. Anat.**, Jena, v. 24, p. 1-9, 1913. ISSN 0044-4030.
- ARAB, G. et al. Función de los inhibidores de la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa en la enfermedad cardiovascular. **Arch. Venez. Farmacol. Ter.**, Caracas, v. 22, n.1, p. 13-18, 2003. ISSN 0798-0264.
- BECKSTROM, B. W. et al. Correlation between carotid area calcifications and periodontitis: a retrospective study of digital panoramic radiographic findings in pretreatment cancer patients. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, Saint Louis, v. 103, n. 3, p. 359-366, 2007. ISSN 1079-2104.
- BENARDINO, J. A. S. **Estudo da aterosclerose induzida por diferentes tipos de dieta hiperlipídica em coelhos albinos (*Oryctolagus Cuniculus*)**. 2008. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.
- BERGMAN, E. N. Energy contribution of volatile fatty acids in the gastrointestinal tract in various species. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v. 70, p. 567-590, 1990. ISSN 0031-9333.
- BRAGA, A. A. D.; BARLETA, V. C. N. Alimento funcional: uma nova abordagem terapêutica das dislipidemias como prevalência da doença aterosclerótica. **Cadernos UniFOA**, Volta Redonda, Ano 2, n.3, março 2007. Disponível em: <http://www.unifoa.edu.br/pesquisa/caderno/edição/o3/100.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2008.
- CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Quim. Nova**, São Paulo, v.30, n. 2, p. 425-430, 2007. ISSN 1678-7064.
- CANELLA, K. M. N. C; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel- influência do método de preparação e do solvente. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001. ISSN 1678-7064.
- CARVAJAL, O.; ÂNGULO, O. Effect on n-3 polyunsaturated fatty acids on the lipidic profile of healthy Mexican volunteers. **Salud Pública Mex.**, México, v. 35, p. 3. 1997. ISSN 0036-3634.
- CASTRO, L. C. V. et al. Nutrition and cardiovascular diseases: the risk markers in adults. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 369-377, 2004. ISSN 1415-5273.

CHACRA, A. P. M.; DIAMENT, J.; FORTI, N. A. Classificação das dislipidemias. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 6, p. 465-72, 2005. ISSN 0103-8559.

CHAGAS, A. C. P.; GALVÃO, T. F. G. Novas evidências no tratamento das dislipidemias: há justificativas para uma nova estatina? **Rev. Bras. Med.**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 10, 2007.

CHEN, Y. L.; CHANG, Y.; JIANG, M. J. Monocyte chemotactic protein-1 gene and protein expression in atherogenesis of hypercholesterolemic rabbits. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 143, p. 115-123, 1999. ISSN 0021-9150.

CHUMAEVA, N. et al. Sex differences in the combined effect of chronic stress with impaired vascular endothelium functioning and the development of early atherosclerosis: the cardiovascular risk in young finns study. **BMC Cardiovasc. Disord.**, London, v. 10, Jul. 2010.

COHEN, D. E. Cholesterol absorption as a target for lipid-lowering therapy. **Formulary.**, Cleveland, v. 39, p. 3-7, 2004. ISSN 1082-801X.

CONSTANT, J. The role of eggs, margarines and fish oils in the nutritional management of coronary artery disease and strokes. **Keio J. Med.**, Takyō, v. 53, n. 3, p. 131-136, 2004. ISSN 0022-9717.

CORRÊA-CAMACHO, C. R.; DIAS-MELICIO, L. A.; SOARES, A. M. V. C. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. **Arq. Ciênc. Saúde**, Rio de Janeiro, v. 14, p. 41-48, 2007. ISSN 1807-1325.

COTTIN, Y. et al. Intravascular radiation accelerates atherosclerotic lesion formation of hypercholesteremic rabbits. **Cardiovasc. Radiat. Med.**, New York, v. 2, p. 231-240, 2001. ISSN 1522-1865.

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO A. C.; QUEIROZ, D. C. **Quitosana**: a fibra do futuro. Fortaleza: Eletrônica S. Vasconcelos, 2003. 281 p.

DENARDI, C. A. S.; CASELLA FILHO, A.; CHAGAS A. C. P. A proteína C-reativa na atualidade. **Rev. Socerj.**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 5, p. 329-334, 2008. ISSN 2177-6024.

DERIVI S. C. et al. Efeito hipoglicêmico de reações à base de berinjela (*Solanum melongena* L.) em ratos **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, maio/ago. 2002.

DERIVI, S. C. N.; MENDES, M. H. M. Uma visão retrospectiva da fibra e doenças cardiovasculares. In: LAJOLO, F. M. et al. **Fibra dietética en Iberoamérica: tecnología y salud: obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos**, São Paulo: Livraria Varela, 2001, p. 411-430.

- DIJK, R. A. et al. The natural history of aortic atherosclerosis: a systematic histopathological evaluation of the peri-renal region. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 210, p. 100-106, 2010. ISSN 0021-9150.
- DORNAS, W. C. et al. Experimental atherosclerosis in rabbits. **Arq. Bras Cardiol.**, São Paulo, v. 95, n. 2, p. 272-278, 2010. ISSN 0066-782X.
- DUQUE, F. L. V. Aterosclerose: aterogênese e fatores de risco. **Rev. Angiol. Cir. Vasc.**, Rio de Janeiro: SBACV, v. 8, 10; 2001. ISSN 1677-7301.
- DURRINGTON, P. Dyslipidaemia. **Lancet.**, London, v. 362, p. 717-731, 2002. ISSN 1474-547X.
- EBIHARA, K.; KIRIMA, S. Comparative effects of water-soluble and waterinsoluble dietary fibers on various parameters relating to glucose tolerance in rats. **Nut. Rep. Int.**, Los Altos, v. 26, n. 2, p. 139-202, 1982. ISSN 0009-6635.
- FINKING, G.; HANKE, H. Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. **Atherosclerosis.**, Amsterdam, v. 135, n. 1, p. 1-7, 1997. ISSN 0021-9150.
- FRANÇOSO, L. A.; COATES, V. Evidências anatomopatológicas do início da aterosclerose na infância e adolescência. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 131-6, 2002. ISSN 0066-782X.
- FREITAS, E. V. Triglicerídeos e doenças arterial coronariana. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**. São Paulo, v. 6, p. 465-472, 2004. ISSN 0103-8559.
- FRUEBIS, J. et al. Inhibition of VCAM-1 expression in the arterial wall is shared by structurally different antioxidants that reduce early atherosclerosis in NZW rabbits. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 40, p. 1958-1966., Nov. 1999. ISSN 0022-2275.
- FUSTER, V. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. **Circulation.**, Dallas, v. 90, p. 2126-2146, 1994. ISSN 0009-7322.
- GIROLDO, M. L.; ALVES, A. S.; BAPTISTA, F. Doença aterosclerótica: uma patologia multifatorial. **Rev. Saúde Biol.**, Campo do Mourão, v. 2, n. 1, p. 2007. ISSN 1980-0002.
- GOTTLIEB M. G. V.; BONARDI G.; MORIGUCHI E. H. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. **Sci. Med.**, Porto Alegre, v. 15, 3; 2005. ISSN 1806-5562.
- GREGORIO, S. R.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. Fibras alimentares e doença cardiovascular. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr.**, São Paulo, v. 22, p. 109-120, dez., 2001. ISSN 1519-8928.

- HACKAM, G. D.; ANAND, S. S. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. **JAMA.**, Chicago, v. 290, p. 932-940, 2003. ISSN 0098-7484.
- HAHN, C.; SCHWARTZ M, A. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, London, v. 10, p. 53-62, 2009. ISSN 1471-0072.
- HANSSON, G. K. Immune Mechanisms in Atherosclerosis. **Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v. 21, p. 1876-1890, 2001. ISSN 1524-4636.
- HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C. **Farmacologia ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1997.
- HASTINGS, N. G. et al. Atherosclerosis-prone hemodynamics differentially regulates endothelial and smooth muscle cell phenotypes and promotes pro-inflammatory priming. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, Bethesda, v. 293, p. C1824-C1833, 2007. ISSN 0363-6143.
- HENNEN, W. J. **Chitosan natural fat blocker**. Salt Lake City: Woodland Publishing, 1996. p. 2 -31.
- HOWARD-ALPE, G. M.; SEAR, J. W.; FOEX, P. Methods of detecting atherosclerosis in non-cardiac surgical patients; the role of biochemical markers. **Br. J. Anaesth.**, Altrincham, v. 97, n. 6, p. 758-69, 2006. ISSN 0007-0912.
- HYAFIL, F. et al. Quantification of Inflammation within rabbit atherosclerotic plaques using the macrophage-specific CT contrast agent N1177: a comparison with ¹⁸F-FDG PET/CT and histology. **J. Nucl. Med.**, Neyw York, v. 50, n. 6, p. 959-965, 2009.
- IHARA, S. S. M. et al. Coelhos alimentados com dieta rica em colesterol: modelo experimental para o estudo da aterosclerose. **News Lab.**, v. 6, n.27, 1998.
- JALDIN, R. G. et al. O processo aterosclerótico em artérias de coelhos submetidos a dieta suplementada com gema de ovo: modelo experimental de baixo custo. **J. Vasc. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 4, p. 247-256, 2006. ISSN 1677-5449.
- JENKINS, D. J. A. et al. Physiological effects of resistant starches on fecal bulk, short chain fatty acids, blood lipids and glycemic index. **J. Am. College Nutr.**, New York, v.17, n.6, p. 609-616, 1998. ISSN 0731-5724.
- JONGSTRA-BILEN, J. et al. Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis. **JEM.**, Chichester, v. 203, n. 4, p. 2073-2083, 2006. ISSN 1095-1539.
- JORGE, P. A. et al. Effects of atorvastatin, fluvastatin, pravastatin, and simvastatin on endothelial function, lipid peroxidation, and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 84, n. 4, p. 314-319, 2005. ISSN 0066-782X.

- KIM, C. H. et al. Synthesis of chitosan derivatives with quaternary ammonium salt and their antibacterial activity. **Polymer Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 387-393, 1997. ISSN 0170-0839.
- KOIDE, S. S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. **Nutr. Res.**, New York, v. 18, p. 1091-1101, 1998. ISSN 0271-5317.
- KOLANKIEWICZ, F.; GIOVELLI, F. M. H.; BELLINASSO, M. L. Estudo do perfil lipídico e da prevalência de dislipidemias em adultos, **Rev. Bras. Anal. Clín.**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 4, p. 317-320, 2008. ISSN 0370-369X.
- KRITCHEVSKY, D.; STORY, J. A. Influence of dietary fiber on cholesterol metabolism in experimental animals. In: SPILLER, G. A.(Ed.). **Handbook of dietary fiber in human nutrition**, New York: CRC, 1986. p.129-142.
- KUNSTMANN F. S.; GAINZA, D.K. Dislipidemia en la mujer: Diagnóstico, clasificación y manejo. **Rev. Méd. Clin. Condes.**, Santiago, v. 20, n. 1, p. 47-52, 2009. ISSN 0716-8640.
- LAI, S. et al. Serum IL-6 levels are associated with significant coronary stenosis in cardiovascularly asymptomatic inner-city black adults in the US. **Inflamm. Res.**, Basel, v. 58, n. 1, p. 15-21, 2009. ISSN 1023-3830.
- LANCELLOTTI, T. E. S. et al. Hypercholesterolemia impaired sperm functionality in rabbits. **PLOS ONE**., v. 5, n. 10 e 13457, p. 1-8, 2010.
- LICHTENFELS, E. et al. Monckeberg's arteriosclerosis as a cause of lower limb critical ischemia: case report. **J. Vasc. Bras.**, Rio de Janeiro, v.6, n. 1, p. 97-100, 2007. ISSN 1677-5449.
- LIRA, C. R. G. et al. Nutraceuticals: na overview on safety, quality control and legislation. **Rev. Bras. Farm.**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 1, p. 45-49, 2009. ISSN 0370-372X.
- LITTE, P. J.; BALLINGER, M.L.; OSMAN, N. Vascular wall proteoglycan synthesis and structure as a target for the prevention of atherosclerosis. **Vascular Health and Risk Management**., v. 3, n. 1, p. 117-124, 2007.
- LUZ, P. L.; LAURINDO, F. R. M.; CHAGAS, A. C. P. **Endotélio & doenças cardiovasculares**. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 203-220.
- MA, Z.-L. et al. A rabbit model of atherosclerosis at carotid artery: MRI visualization and histopathological characterization. **Eur. Radiol.**, v. 18, p. 2174-2181, 2008. doi 10.1007/s00330-008-0978-x.
- MAEZAKI, Y.; TSUJI, K.; NAKAGAWA Y. Hypocholesterolemia effect of chitosan in adult ales. **Biosci. Biotech. Biochem.**, Japan v. 57, n. 9, p.1439-1444, 1993.
- _____. et al. **Chitin enzymology**. Lyon: European Chitin Society. p. 217-232, 1996.

MARTINELLO, F. **Avaliação da atividade biológica do extrato hidroalcoólico de *Tamarindus indica* L. sobre o metabolismo lipídico e na carcinogênese coloretal em hamster.** 2006. Tese (Doutorado em Biociências aplicada à Farmácia) – Universidade de São Paulo, Riberão Preto, 2006.

MARTINS, E. C. O. et al. Lesão renal aguda por glicerol: efeito antioxidante da *Vitis vinifera* L. **Rev. Bras. Ter. Intens.** v. 19, n. 3, p. 92-96, 2007. ISSN 1982-4335.

MARTINS, I. S. et al. Doenças cardiovasculares ateroscleróticas, dislipidemias, hipertensão, obesidade e diabetes melito em população da área metropolitana da região Sudeste do Brasil: II – Dislipidemias. **Rev. Saúde Pública.**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 75-84, 1996. ISSN 0034-8910.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J.; BADIMON, L. Estatinas y ácidos grasos omega-3. Disminución de La mortalidad cardiovascular dependiente e Independiente de La reducción de La colesterolemia. **Rev. Esp. Cardiol. Supl.**, Barcelona, v. 6, p. 20D-30D, 2006. ISSN 1131-3587.

MASSARO, M. et al. Omega-3 fatty acids, inflammation and angiogenesis: basic mechanism behind cardioprotective effects of fish and oils. **Cell. Mol. Biol.**, Elmsford, v. 56, n.1, p. 59-82, 2010. ISSN 0145-5680.

MASSBERG, S. et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. **J. Exp. Med.**, New York, v. 196, n. 7, p. 887-896, 2002. ISSN 0022-1007.

MELO, D. S.; FRÉZ, E. C.; FRÉZ, M. C. R. Total cholesterol level versus regional factores on three cities of Paraná state. **RBAC: Revista Brasileira De Análises Clínicas.**, v. 40, n. 2, p. 133-135, 2008.

MENNICKENT, C. S. et al. Efectos pleiotrópicos de las estatinas. **Rev. Méd. Chile.**, Santiago, v. 136, p. 775-782, 2008. ISSN 0034-9887.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições. **Rev. Eletr. Farm.**, v. 3, n. 2, p. 99-112, 2006.

MUZZARELI, R. A. A. et al. (CABOXYMETHYLIDENE) Chitosans: novel chelating polyampholytes obtained from chitosan glyoxylat. **Carboydr. Res.**, v. 107, p. 199-210, 1983.

OLIVEIRA, T. T. et al. Different doses of the flavonoid ritin on the levels of serum lipids in male and female rabbits. **RBAC: Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 4, p. 213-215, 2004. ISSN 0370-369X.

ORMROD, D. J.; HOLMES, C. C.; MILLER, T. E. Dietary chitosan inhibits hypercholesterolaemia and atherogenesis in the apolipoprotein E-deficient mouse model of atherosclerosis. **Atherosclerosis.**, Amsterdam, v. 138, p. 329-334, 1998. ISSN 0021-9150.

- ORR, A. W. et al. The subendothelial extracellular matrix modulates NF- κ B activation by flow: a potential role in atherosclerosis. **J. Cell Biol.**, New York, v. 169, n. 1, p.191-292, 2005. ISSN 0021-9525.
- PERIAGO, M. J. et al. The dietary fiber components and their physiological effects. **Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.**, Valencia, v. 33, n. 3, p. 229-246, 1993. ISSN 1678-457X.
- PORTO, C. C.; RASSI, S.; LEITE, B. S. M. Afinal, o que é Arteriosclerose? **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 1-4, 1981. ISSN 0066-782X.
- RAMALHO, H. M. M. et al. Cholesterol levels in country chicken eggs, in those of farm raised chickens, and in quail eggs stored under different conditions. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.**, São Paulo, v. 66, n. 3, p. 256-260, 2007. ISSN 0073-9855.
- RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5. ed., São Paulo, Elsevier, 2004.
- RAUDALES, J. C. et al. Placa coronária aterosclerótica vulnerável: estado atual. **Rev. Bras. Cardiol. Invas.**, São Paulo, v.14, n. 3, p. 314-323, 2006. ISSN 2179-8397.
- RIBEIRO, K. C.; SHINTAKU, R. C. O. The influence of the lipids of the diet on arteriosclerose. **Conscientiae Saúde**, São Paulo, v. 3, p. 73-83, 2004. ISSN 1677-1028.
- RODRIGUES, H. G. et al. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol HDL. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 315-320, jul./set. 2003. ISSN 1415-5273.
- ROMALDINI, C. C. et al. Risk factors for atherosclerosis in children and adolescents with family history or premature coronary artery disease. **J. Pediatr.**, Rio de Janeiro, v. 80, p. 2, 2004. ISSN 0021-7557.
- ROSS, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 340, n. 2, p. 115-126, 1999. ISSN 0028-4793.
- SANTOS, L. E. S.; BORTOLOZO, E. A. F. Q. Ingestão de ômega-3: Consideração sobre potenciais benefícios no metabolismo lipídico. **Exata Terra**. Ponta Grossa: UEPG, v. 14, n. 2, p. 161-170, 2008.
- SHI, Q. et al. Arterial endothelial dysfunction in baboons fed a highcholesterol, high-fat diet-1,3. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 82, n. 4, p. 751-759, 2005. ISSN 0002-9165.
- SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006. ISSN 1678-7064.
- SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2010.

SING, D. K.; RAY, A. R. Graft copolymerization of 2-hydroxyethylmethacrylate onto chitosan films and their blood compatibility. **J. Appl. Polym. Sci.**, New York, v. 53, n. 8, p. 1115-1121, 1994. ISSN 1097-4628.

SPOSITO, A. C. et al. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 88, p. 2-19, abr. 2007. Supl.1. ISSN 0066-782X.

STEBBENS, W. E. An appraisal of cholesterol feeding in experimental atherogenesis. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, New York, v. 29, p.107-128, 1986. ISSN 0033-0620.

SUGANO, M. et al. Hypocholesterolemic effects of chitosan in cholesterol-fed rats. **Nutr. Rep. Int.**, Los Altos, v. 18, p. 531-537, 1978. ISSN 0029-6635.

SUNG, E. C.; FRIEDLANDER, A. H.; KOBASHIGAWA, J. A. The prevalence of calcified carotid atheromas on the panoramic radiographs of patients with dilated cardiomyopathy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, Saint Louis, v. 97, p. 404-407, 2004. ISSN 1079-2104.

SUZUKI, Y.; YEUNG, A. C.; IKENO, F. The importance of pre-clinical animal testing in interventional cardiology. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 91,n. 5, p. 231-332, 2008. ISSN 0066-782X.

TZIAKAS, D. N. et al. The role of red blood cells in the progression and instability of atherosclerotic plaque. **Int. J. Cardiol.**, Amsterdam, v. 142,p. 2-7, 2010. ISSN 0167-5273.

VENÂNCIO, L. S.; BURINI, R. C.; YOSHIDA, W. B. Hiper-homocisteinemia na doença arterial periférica. **J. Vasc. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, p. 31-7, 2004. ISSN 1677-5449.

VILARIÑO, J. O; ESPER, R; BADIMÓN, J. Fisiopatología de los síndromes coronarios agudos: tres paradigmas para un nuevo dogma. **Rev. Esp. Cardiol. Supl.**, Barcelona, v. 4, p. 13G-24G, 2004. ISSN 1131-3587.

WAQAR, A.B. et al. High-fat diet without excess calories induces metabolic disorders and enhances atherosclerosis in rabbits. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 213, p. 148-155, 2010. ISSN 0021-9150.

WILMORE, J. H.; COSTILL, D. L. **Fisiologia do esporte e do exercício**. 2. ed., São Paulo, Manole, 2001. 693 p.

XIA, W. et al..Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 2, p. 170-179, 2011. ISSN 0258-005X.

XU, G. et al. Mechanism study of chitosan on lipid metabolism in hyperlipidemic rats. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, London, v. 16, suppl. 1, p.313-317, 2007. ISSN 0964-7058.

YLITALO, R. et al. Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan. **Arzneim.-Forsch.-Drug Res.**, Aulendorf, v. 52, p. 1-7, 2002. ISSN 0004-4172.

YUSOF, H. M.; MILES, E. A. M., CALDER, P. Influence of very long-chain n-3 fatty acids on plasma markers of inflammation in middle-aged men. **Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids.**, Edinburgh, v. 78, p. 219-228, 2008. ISSN 0952-3278.

ZANDBERGEN, F.; PLUTZKY J.. PPAR α in atherosclerosis and inflammation. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1771,p. 972-982, 2007. ISSN 0006-3002.

ZHANG J.P.; XU, Y.Z.; LI, M. Effect of bushen kangshuai tablet on NF-kappaB signal pathway and inflammation factors in rabbits with experimental atherosclerosis. **Zhongguo. Zhong. Xi Yi Jie He Za Zhi.**, Beijing, v. 29, n. 9, p. 816-20; 2009. ISSN 1003-5370.