



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE**

**ESTUDO DA ATEROSCLEROSE INDUZIDA POR DIFERENTES
TIPOS DE DIETA HIPERLIPÍDICA EM COELHOS ALBINOS
(*Oryctolagus cuniculus*)**

Dissertação de Mestrado

José André Bernardino dos Santos

Maceió-Al
agosto de 2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE**

**ESTUDO DA ATEROSCLEROSE INDUZIDA POR DIFERENTES
TIPOS DE DIETA HIPERLIPÍDICA EM COELHOS ALBINOS
(*Oryctolagus cuniculus*)**

José André Bernardino dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Célio Fernando de Sousa Rodrigues

Maceió-Al
agosto de 2008

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

S237e Santos, José André Bernardino dos.
Estudo da aterosclerose induzida por diferentes tipos de dieta hiperlipídica em coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*) / José André Bernardino dos Santos, 2008. xi, 70 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, 2008.

Bibliografia: f. [61]-70.
Inclui apêndices e anexos.

1. Aterosclerose. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Coelho como animal de laboratório.
I. Título

CDU: 616.13-004.6



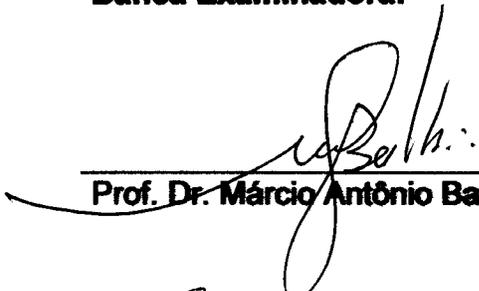
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Defesa da Dissertação de Mestrado do aluno José André Bernardino dos Santos, intitulada: "Estudo da Aterosclerose Induzida por diferentes Tipos de Dieta Hiperlipídica em Coelhos Albinos (*Oryctolagus cuniculus*)", orientada pelo Prof. Dr. Célio Fernando de Sousa Rodrigues, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 14 de agosto de 2008.

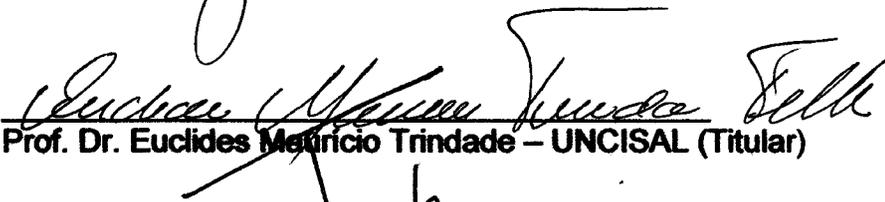
Os membros da Banca Examinadora, consideraram o candidato

aprovado.

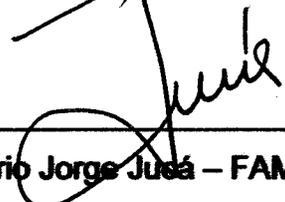
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Márcio Antônio Babinski – UFF (Titular)



Prof. Dr. Euclides Matricio Trindade – UNCISAL (Titular)



Prof. Dr. Mário Jorge Jusá – FAMED/UFAL (Titular)



Prof. Dr. Célio Fernando de Sousa Rodrigues – ICBS/UFAL (Orientador)

"O justo olha pela vida dos seus animais."

Provérbios 12:10

DEDICATÓRIA

A Deus.

A minha família que sempre ajudou de todas as formas.

Um agradecimento especial à minha esposa, Yarandi Macedo dos Santos a quem devo todo o apoio e entusiasmo que me foram decisivos no mestrado e aos meus filhos, Luiz André e Álvaro Levi que suas ternuras inspiraram tranqüilidade e desejo de alcançar o objetivo pretendido. Agradeço de coração aberto ao meu amigo pela sua grande força, estímulo e seus ensinamentos e que a todo instante foi meu ponto de apoio: Célio Fernando de Sousa Rodrigues não deixaria também de agradecer.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Alagoas, que através de seus professores valorosos conseguiram abrir as portas para o mestrado e assim termos o privilégio de realizar nossos sonhos de realizar mestrado.

Ao orientador no mestrado, Célio Fernando de Sousa Rodrigues, com extrema competência, sabedoria e atenção com que me orientou para o meu engajamento no meio experimental.

Todos os membros do grupo de pesquisa em aterosclerose que de uma forma ou de outra acrescentaram muito neste trabalho.

Aos professores Antonio José Casado Ramalho, Katharina Jucá, Rodrigo Freitas, Walter Toledo de Lima, Fernando Wagner que contribuirão deveras para consolidar minha pesquisa experimental e que muitas vezes me substituíram na minha ausência no meu trabalho.

Ao prof. Mauro Guilherme de Barros Quirino Martins, diretor da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde –FCBS –CESMAC, que através de seus estímulos e permissão para realização dos experimentos da Faculdade de medicina Veterinária. A Professora Flaviana Santos Wanderley, pela atenção e toda preocupação com o manejo dos coelhos na cunicultura.

A todos os meus colegas do laboratório de Anatomia Humana e Animal: Carlos, Júnior, Girleide, Nazaré, Anacleto e Petrócio por terem me ajudado, tanto no reforço positivo como no material para dissecação dos animais.

Ao senhor, Elinaldo, o obrigado por ter me ajudado tanto durante os experimentos. A professora Teresinha do curso de nutrição da Universidade Federal de Alagoas que me deu toda atenção durante a formatação do projeto. A Delma do laboratório de histologia da ICBS e o Maciel do Hospital Universitário pela atenção e ajuda nos preparos das lâminas histológicas e a minha amiga Claudjane que me ajudou ativamente nos experimentos. A todos aos meus professores de Pós-graduação, muito obrigado pela dedicação, interesse, seus conhecimentos e experiências compartilhadas nas aulas.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 ATEROSCLEROSE.....	4
2.2 FORMAÇÃO DA PLACA ATEROSCLERÓTICA	5
2.3 CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES ATEROSCLERÓTICAS.....	7
2.3.1 LESÃO DO TIPO I.....	7
2.3.2 LESÃO DO TIPO II.....	8
2.3.3 LESÃO DO TIPO III.....	9
2.3.4 LESÃO DO TIPO IV	9
2.3.5 LESÃO DO TIPO V	9
2.3.6 LESÃO DO TIPO VI	10
2.4 MODELO EXPERIMENTAL DE ATEROGÊNESE EM COELHOS	10
2.5 HEMOANÁLISE EM COELHOS COM DIETA ATEROGÊNICA.....	14
3. MATERIAL E MÉTODO.....	20
3.1 AMOSTRA.....	21
3.2 RANDOMIZAÇÃO DA AMOSTRA	22
3.3 DIETA	23
3.4 PREPARO E ADMINISTRAÇÃO DA DIETA ATEROGÊNICA	24
3.5 DOSAGEM BIOQUÍMICA	25

3.6 EUTANÁSIA E HISTOPATOLOGIA	26
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1 ADAPTAÇÃO À DIETA	29
4.2 TAXAS DE COLESTEROL	33
4.2.1 COLESTEROL TOTAL POR GRUPOS	33
4.2.2 COLESTEROL HDL	34
4.2.3 COLESTEROL LDL.....	35
4.3 DOSAGENS DE TRIGLICERÍDEOS	36
4.4 PESO DO ANIMAL.....	37
4.5 ALTERAÇÕES CUTÂNEAS E FECAIS	38
4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	41
5. DISCUSSÃO	49
5.1 ADAPTAÇÃO À DIETA	50
5.2 COLESTEROLEMIA	51
5.3 DOSAGENS DE TRIGLICERÍDEOS.....	53
5.4 PESO DO ANIMAL.....	54
5.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	56
6. CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS.....	61
REFERÊNCIAS CONSULTADAS	69
APÊNDICES	71
ANEXOS	77

LISTA DE ABREVIATURAS

AHA	AMERICAN HEART ASSOCIATION
COLEST	COLESTEROL
G1	GRUPO 1 - CONTROLE
G2	GRUPO 2 - COLESTEROL 1 g
G3	GRUPO 3 - GEMA 20 ml
G4	GRUPO 4 - BANHA 20 ml
G5	GRUPO 5 - GEMA 40 ml
G6	GRUPO 6 - BANHA 40 ml
HDL-c	LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE
IM	INTRA-MUSCULAR
IV	INTRA-VENOSA
LDL-C	LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE
NS	NÃO SIGNIFICANTE
vs	VERSUS

RESUMO

A gema de ovo de galinha e a banha do porco, em relação aos outros alimentos, têm alto índice de colesterol total. 20 ml de gema apresenta em média 200 mg de colesterol total e 20 ml de banha valor médio de 14 mg de colesterol total. São bons alimentos para experiências referentes à colesterolemia, são de baixo custo comparando-os com colesterol puro. **Métodos:** Foram utilizados coelhos da Nova Zelândia (n=42) adultos entre 7 a 8 meses de idade divididos em grupos de 4: grupo controle com ração 200 g e água ad libitum (G1); o grupo tratado com 1 g de colesterol (G2); grupo tratado com 20 ml gema de ovo (G3); grupo tratado com 20 ml de banha (G4); grupo (G5) tratado com 40 ml de gema e o grupo (G6) tratado com 40 ml de banha. Todos os grupos foram alimentados durante o período de 100 dias tendo como objetivo verificar qual das dietas é melhor para indução da aterosclerose. A coleta de sangue para as dosagens do perfil lipídico dos animais aconteceram nos momentos 0, 30, 60 e 100 dias. Ao término do período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia. Segmentos do arco aórtico, da artéria carótida direita e artéria femoral direita foram coletados para análise histológica. **Resultados:** Como esperado o grupo G1 não observou alteração, o grupo G2 formação leve de aterosclerose, o grupo G3 obteve aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de colesterol total, o grupo G4 não foram identificadas alterações histológicas e o G5 e G6 não se adaptaram a dieta administrada. Ao exame microscópico, foram observadas células espumosas no arco aórtico, femoral e carótida e espessamento de endotélio no grupo G3 de forma significativa comparando-os ao G2. **Conclusão:** A dieta enriquecida com gema de ovo de galinha é a melhor opção para formação de células espumosas e espessamento de endotélio, é prática e de baixo custo para pesquisas com colesterolemia e aterosclerose.

Palavras-chave: Aterosclerose, gema de ovo, banha de porco, células espumosas, colesterol.

ABSTRACT

The egg yolk chicken and pork lard as compared with other foods, have high cholesterol. 20 ml of gem shows on average 200 mg cholesterol and 20 ml of lard average value of 14 mg of cholesterol. Good food for experiences concerning cholesterol, are low cost compared them with cholesterol powder. **Method:** We used rabbits of New Zealand (n = 42) adults from 7 to 8 months of age divided into groups of 4: control group diet with 200 g and water ad libitum (G1), the group treated with 1 g of cholesterol (G2); group treated with 20 ml egg yolk (G3); group treated with 20 ml of lard (G4); group (G5) treated with 40 ml of yolk and the group (G6) treated with 40 ml of lard. All groups were fed during the period of 100 days with the aim of verifying which of the diet is best for induction of atherosclerosis. The blood collection for the dosages of the lipid profile of animals occurred at times 0, 30, 60 and 100 days. At the end of the trial period, the animals were subjected to euthanasia. Segments of the aortic arch, the right carotid artery and right femoral artery were collected for analysis histological. **Results:** As expected the group G1 not noticed amendment, the group G2 training light of atherosclerosis, the group returned G3 significant increase (p <0,05) in total cholesterol levels, the group G4 were not identified histological changes and G5 and G6 is not adapted the diet administered. By microscopic examination, were observed foam cells in the aortic arch, and femoral and carotid thickening of endothelium in the group G3 so significant comparing them with the G2. **Conclusion:** The diet enriched with egg yolk, chicken is the best option for formation of foam cells and thickening of endothelium, is practical and low cost for research on cholesterol and atherosclerosis.

Key words: Atherosclerosis, egg yolk, pork lard, foam cells, cholesterol.

1. INTRODUÇÃO

A aterosclerose é responsável pelo maior índice de morbidade e mortalidade que ocorre no mundo. Esta doença é encontrada nas artérias e ocorre inicialmente através do acúmulo de colesterol e proliferação de células musculares lisas no endotélio, que leva a sua inflamação. Este fenômeno originará uma placa fibrosa que se projeta para dentro do lúmen do vaso, levando a uma série de complicações circulatórias (CORRÊA-CAMACHO et al., 2007). Para realização de experimentos que envolva a formação da aterosclerose, 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).

Não foi encontrada literatura comparando o efeito das diferentes dietas no que diz respeito a colesterolemia, nem sobre as alterações morfológicas produzidas na luz do vaso, em animais submetidos às mesmas condições de laboratórios e nem a determinação da vantagem de uma dieta sobre outra, do ponto de vista operacional. Vários autores descrevem diferentes modelos de aterosclerose experimental, muitos deles, sem descrições claras dos métodos e na maioria das vezes utilizando colesterol puro misturado a ração, o que torna o experimento mais caro e complexo.

Desta forma, objetivamos padronizar um modelo de dieta experimental simples, facilmente reprodutível e de baixo custo. Com este objetivo, testamos três diferentes modelos de dieta experimental para verificar qual destas é mais eficaz, com a hipótese que é possível a administração de dieta mais simples e de menor custo em relação as mais utilizadas pelos pesquisadores para a indução de aterosclerose em coelhos.

A determinação da vantagem de uma dieta sobre outra, contribuirá para a construção de um modelo experimental para indução de aterosclerose, em coelhos, que possa servir como referência para o desenvolvimento de outras pesquisas, que visem à prevenção, o tratamento ou a redução da aterosclerose.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – ATEROSCLEROSE

Segundo HACKAM et al. (2003), a palavra aterosclerose vem do grego atero que significa caldo ou pasta, e esclerose, endurecimento.

Conforme FUSTER (1999), a aterosclerose é uma das doenças que acomete mais pessoas no mundo e é uma das causas de morte mais comuns no hemisfério ocidental. Na mesma abordagem LUZ et al. (2003), afirma que a dieta gordurosa promove o aumento de colesterol no sangue e é um fator preponderante as várias doenças ateroscleróticas na América e na Europa. FONSECA et al. (2002) descreveram que as doenças oriundas de dieta gordurosa são as mais variadas e se relacionam à obesidade, hipertensão arterial, problemas cardiovasculares, câncer, enfermidades articulares, colelitíase, cálculos renais, esteatose hepática, enfermidades endocrinometabólicas, resistência à insulina, diabetes mellitus, intolerância à glicose, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, diminuição de HDL-c, hiperuricemia, transtornos menstruais, problemas respiratórios e refluxo gastresofágico.

Aterosclerose é um processo crônico, progressivo e sistêmico que tem como mecanismo uma resposta inflamatória e fibroproliferativa no endotélio de um vaso sanguíneo. Nesta patologia é comum encontrar vasos arteriais comprometidos como da aorta, carótidas, renais, ilíacas e femorais. Entre os principais fatores de risco para lesão arterial encontra-se a hipercolesterolemia, hipertensão arterial, diabetes, tabagismo, obesidade, envelhecimento e fatores genéticos (LUZ et al., 2003).

De todas as formas de esclerose arterial, a aterosclerose é bastante significativa, em virtude das placas ateromatosas promoverem a obstrução do vaso e várias síndromes isquêmicas graves desde infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, gangrena dos membros, entre outras. Em experimentos com animais, tratados por meio de uma dieta gordurosa, foram evidenciada a aterosclerose, hipertensão arterial e diabetes mellitus. Com esta mesma dieta em macacos, porcos e coelhos, foram percebidas alterações celulares durante a formação do ateroma (DUQUE, 1998).

2.2 - FORMAÇÃO DA PLACA ATEROSCLERÓTICA

Experimentalmente, o processo de aterogênese pode ser percebido em apenas uma semana de exposição a uma dieta hipercolesterolêmica. De forma rápida, a atividade inflamatória se torna nítida, com aumento das moléculas de adesão e migração celular, gerando a diferenciação de monócitos em macrófagos que se tornam captadores para LDL-c oxidado, que determina na formação das células espumosas, uma etapa inicial da aterogênese (LUZ et al., 1999).

Morfologicamente, as lesões ateroscleróticas são de dois tipos: filetes gordurosos e placas fibrosas. Os filetes gordurosos são amarelos e lisos projetando-se levemente para o interior da luz arterial e são compostos de lipídios e células musculares lisas alongadas. Essas lesões têm sido encontradas em artérias de pessoas de todas as faixas etárias, inclusive em lactentes e geralmente não causam sintomas clínicos. A placa fibrosa, por sua vez, é composta por células musculares lisas, fibras de colágeno, componentes plasmáticos e lipídios e de coloração esbranquiçada à amarelada e projeta-se em variados graus para dentro da luz arterial, podendo até obstruí-la. Essas placas são encontradas predominantemente nas artérias aorta abdominal, coronárias, poplíteas e carótida interna (BRUNNER et al., 2000).

A primeira alteração desencadeada pela aterosclerose é a aderência de leucócitos, principalmente monócitos, na superfície do endotélio. Nas hipercolesterolemias observadas clinicamente, esses aglomerados de leucócitos surgem ao fim de 7 a 12 dias. Os monócitos rolam pela superfície do endotélio, passam entre as células endoteliais e rapidamente alcançam a subíntima do vaso sanguíneo, transformam-se em células espumosas. Nessa situação aparecem lesões nas artérias dos membros inferiores, em seguida nas artérias ilíacas, aorta e por fim, nas artérias coronárias. A lesão é uma aparente separação das células endoteliais e retração do endotélio sobre a estria gordurosa, expondo a subíntima ao sangue, especialmente nas bifurcações e regiões de maior turbilhamento sanguíneo (DUQUE, 1998).

Nas fases iniciais do ateroma tem-se verificado um alargamento da artéria como para compensar a progressiva redução da luz arterial. Quando o grau da estenose no vaso ultrapassa 30-40%, para de ocorrer o alargamento compensatório e o estreitamento do lúmen torna-se evidente. Este fenômeno nem sempre acontece, ou só acontece em segmentos da artéria. A aterosclerose pode ao inverso ser acompanhada de enrugamento de toda a artéria lesada, o que determinaria o efeito oclusivo das placas ateromatosas (PASTERKAMP, 1995).

De acordo com BARGER e BEEUWKES (1990), numa artéria normal os pequenos vasos nutridores da parede se distribuem pela camada adventícia e penetram externamente na camada média. Na artéria ateromatosa, os pequenos vasos nutridores se proliferam e se alongam e formam um plexo microvascular na íntima vascular alterada. O desenvolvimento inadequado desses microvasos contribui para uma isquemia intraparietal e distúrbios na produção das secreções endoteliais, podendo ocasionar hemorragia, ruptura e trombose da placa, com eventual oclusão arterial e infarto do miocárdio.

Sabe-se que 80% do colesterol é sintetizado pelo próprio organismo e apenas 20% é obtido na dieta (PEREIRA, 2006). Há uma importância das lipoproteínas e da associação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) com o ateroma. Assim, há relação da dieta gordurosa com a prevalência da aterosclerose. As pessoas com pouca ingestão de gorduras, com ingestão protéica adequada e com predomínio de glicídios na alimentação tinham menores valores de lipídios sanguíneos e assim, menores incidências de aterosclerose (GOFMAN, 1950).

Segundo LIBBY (2002), o acúmulo de lipídios, células inflamatórias e elementos fibrosos que se depositam nas paredes arteriais são os responsáveis pela formação de placas ou estrias gordurosas e que geralmente ocasionam obstrução. Contudo as lipoproteínas, principalmente a de baixa densidade (LDL) tem ocupado papel de destaque na etiologia da doença aterosclerótica ainda que muitos indivíduos desenvolvam doenças cardiovasculares na ausência de anormalidade no perfil das lipoproteínas.

Embora qualquer artéria possa ser afetada, as principais artérias acometidas na doença são aorta e as artérias coronárias e cerebrais tendo como principais conseqüências o infarto do miocárdio, a isquemia cerebral e o aneurisma da aorta (GOTTLIEB, 2005). Estudos sugerem duas fases interdependentes na

evolução da aterosclerose: a 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).

2.3- CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES ATEROSCLERÓTICAS

As lesões ateroscleróticas são classificadas pela sua fisiopatologia em tipo I até VI, segundo a American Heart Association (AHA). As leves são denominadas do tipo I e II; as lesões intermediárias do tipo III e lesões avançadas IV, V e VI (STARY et al., 1995).

A seguir, descrevem-se as lesões do tipo I a VI:

2.3.1- LESÃO DO TIPO I

Corresponde a formação de células espumosas. Estas células são características das lesões iniciais e são formadas por macrófagos ricos em lipídeos. A lesão inicial depende do acúmulo de LDL-c no espaço subendotelial. O transporte

do LDL-c para esta região é um fenômeno passivo e diretamente proporcional a sua concentração sanguínea. O próprio stress hemodinâmico aumenta o aprisionamento da LDL que oxidado por ação de produtos oxidativos de células da parede arterial como endotélio, células musculares lisas e macrófagos (WU, et al., 1992). A LDL oxidada é reconhecida pelo macrófago, englobando as moléculas de lipoproteínas tornando-se ricos em conteúdo lipídico, formando a célula espumosa (ZAGO et al., 2007). Esta lesão do tipo I é microscópica e há um aumento no número de macrófagos e pelo surgimento das células espumosas, que são macrófagos cheios de gordura, disposto na intima do vaso comprometido e que tem sido evidenciada em crianças e adolescentes. Também pode ocorrer em adultos, principalmente em pessoas que tem pouca aterosclerose ou em áreas de artérias que tem resistência às lesões ateroscleróticas. Em coelhos com hipercolesterolemia, observou-se que a primeira alteração que ocorre nas artérias é a aderência aumentada de monócitos ao endotélio e acúmulo de macrófagos e células espumosas na túnica íntima (ROSENFELD, 1987).

2.3.2- LESÃO DO TIPO II

Conhecida como estria gordurosa, é a forma visível da lesão do vaso. São compostas por macrófagos, células musculares lisas e pequenos flocos de gordura extracelular. Há dois tipos diferentes desta lesão: a primeira são as menos usuais, no entanto com maior potencial destrutivo e são oriundas das lesões tipo I com um maior número de macrófagos, possuem maior número de células e maior quantidade de matriz extracelular. Comumente encontradas em áreas hemodinâmicas específicas e tendem a progredir mais rápido e para formas mais complicadas de lesão aterosclerótica. Lesões tipo II são encontradas antes da 3ª década de vida (STARY et al., 1996).

2.3.3- LESÃO DO TIPO III

Histologicamente é observada gotículas lipídicas extracelulares espalhadas entre as camadas de células musculares lisas e localizadas logo abaixo da camada de macrófagos e células espumosas. Estes pequenos depósitos de gotículas lipídicas extracelulares substituem a matriz intercelular de proteoglicanos e fibras e afastam as células musculares lisas. Posteriormente, estes pequenos depósitos lipídicos unem-se para formar um núcleo lipídico extracelular o que caracteriza a lesão do tipo IV ou ateroma (STARY et al., 1995).

2.3.4- LESÃO DO TIPO IV

É conhecida como Ateroma. Possui um núcleo lipídico individualizado, formado pela fusão das gotículas de gordura das lesões tipo III. Esta apresenta macrófagos e gordura livre em abundância e fragmentos de células, devido a necrose. Diante deste fenômeno este núcleo é conhecido com centro necrótico (STARY, 1989).

2.3.5- LESÃO DO TIPO V

Este tipo corresponde a fase V e tem como característica a presença de tecido fibroso envolvendo o núcleo lipídico. Divide-se em fibroateroma que tem como

característica a formação de uma camada de tecido fibroso envolvendo o núcleo lipídico, em placa calcificada correspondendo à presença de cálcio na camada fibrosa ou no núcleo lipídico e a placa fibrótica onde se evidencia o tecido fibrosado com ausência de núcleo lipídico (STARY et al., 1995).

2.3.6- LESÃO DO TIPO VI

É preponderante a formação de trombo, fissura, rotura, hemorragia ou erosão. São as causas dos eventos coronarianos isquêmicos agudos e geralmente são oriundos de placas do tipo IV ou V. A complicação da placa tem maior chance de ocorrer quando existe remodelamento do vaso, presença de um núcleo lipídico superior a 40% da área total da placa, capa fibrótica fina e presença de grande quantidade de células inflamatórias (STARY, 1992).

2.4- MODELO EXPERIMENTAL DE ATEROGÊNESE EM COELHOS

ANITSCHKOW (1913) induziu, pela primeira vez, aterosclerose em coelhos alimentando-os com gema de ovo e colesterol puro tendo 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.

Para SARAIVA et al. (1978), o esvaziamento gástrico do coelho é muito lento, podendo encontrar resíduo alimentar com 5 dias de jejum, e portanto devem ser utilizados para estudos de investigação da absorção de medicamentos administrados oralmente ou para estudo de dietas. Estes animais não conseguem vomitar, e seu estômago deve estar sempre cheio com alguma coisa, pois podem morrer se tiverem o estomago vazio (MIRASOL, 2008).

Segundo, KARNABATIDIS et al. (2006) tanto a artéria como a veia auricular são excelentes vias medicamentosas, anestésicas e de punção em relação a outros vasos. Estes autores utilizaram 30 coelhos Nova Zelândia e o sucesso foi demonstrado em relação aos outros acessos de vasos.

Do gênero *oryctolagus* (cuniculos), pertencente à família *lagomorpha*, a variedade albina é de fácil criação, especialmente a raça Nova Zelândia que chega até 4 a 5 kg de peso. É um bom modelo experimental para estudo da aterosclerose.

Drogas podem ser administradas por via oral, por meio de sonda orogástrica ou na água de beber, injeções intravenosas podem ser feitas com muita facilidade na veia marginal da orelha, pela qual também se pode colher amostras de sangue para diferentes análises (STAHLKE Jr et al., 2004). A veia auricular lateral é a via de mais fácil acesso no coelho, e por isto animais com longas orelhas são os preferidos para os experimentos laboratoriais. A venopunção na orelha, é facilitada com uso de cateter de calibre 20 (MURDOCK, 1969).

SMITH (2008), afirma que os coelhos Nova Zelândia adultos, tem seu peso oscilando entre 4,5 kg para fêmeas e 5 kg para machos, são animais precoces chegando a pesar 1,8 a 2 kg em 8 a 10 semanas. As fêmeas são mansas e prolíferas. O metabolismo do coelho é lento, dieta gordurosa em excesso não é queimada, é armazenada como gordura do corpo.

Conforme HERRERA et al. (2001), a fibra estimula e facilita a digestão no coelho, sua redução determina diarreia, devido ao crescimento de bactérias indesejáveis.

Quanto as dietas administradas, cada autor utilizou um modelo diferente: o TELOKEN et al. (2000), fizeram uso de 27 coelhos Nova Zelândia, sendo um grupo com 7 coelhos que recebeu ração padrão e mais dois grupos com 10 animais que receberam ração acrescida com 0,5% de colesterol mais 4 % de banha animal em 5 semanas e 10 semanas. A ração era fornecida em 150 g diárias

juntamente com o complemento descrito. Como resultado o grupo controle apresentou ganho de peso (620 g) no final do experimento. A taxa de colesterol total no sangue, foi de 100 mg/dL e triglicérideo 98 mg/dL. O grupo que recebeu dieta rica em colesterol em 5 semanas aumentou o peso em 1070 g, teve taxa de colesterol total de 103,4 mg/dL e triglicérideo de 114 mg/dL. O grupo tratado em 10 semanas obteve aumento de peso em 920 g, colesterol total em 314,1 mg/dL e triglicérideo em 122 mg/dL.

Já KUYMJIAN et al. (2004), realizaram experimentos em 38 coelhos Nova Zelândia, com dieta enriquecida de colesterol a 0,5 % durante 12 semanas. Um grupo com dieta regular, e os outros grupos respectivamente com antagonistas de canais de cálcio (amlodipina, diltiazem e nifedipina) durante o mesmo período para formação de placas na aorta e carótida. Os antagonistas de canais de cálcio não modificaram a aterogênese induzida experimentalmente pela dieta rica em colesterol tanto na aorta como na artéria carótida.

Administrando dieta aterogênica, com valor de 1200 mg de colesterol diário, em 6 coelhos por um período de 4 meses de tratamento AMARAL et al. (1989), observaram lesões ateroscleróticas nas artérias intercostais, ocasionando isquemia sobre os ossos vertebrais, tendo relações semelhantes às percebidas no ser humano.

ALARCÓN (2004), administrou 118 dias, em 4 grupos com 5 coelhos, uma dieta aterogênica com 60 mg/dia de colesterol, obtendo taxas de colesterol total baixas.

MANRESA e RECEDILLA (1986) demonstraram que as lesões ateromatosas são mais observadas na aorta abdominal e em bifurcações. A lesão inicia-se com estria fibrosa, que tem aspecto esbranquiçado, elevando discretamente o endotélio e em seguida a formação da placa fibrosa, o ateroma. Para encontrar estes resultados foram utilizadas 10 ratas Sprague-kawly, que ingeriram 2% de colesterol mais 5% de óleo de coco durante 60 dias.

GONZÁLES-GONZÁLES et al. (2005) fizeram uso de ração aterogênica em coelhos divididos em um grupo jovem (750 g) e um adulto (3500 g), baseando-se o protocolo de MANRESA e RECEDILLA (1986). Esta dieta modificada era composta por 25,5 g colesterol mais 1,5 g de tiouracil, 10 g de ácido cólico e 200 g de manteiga. Estes foram padronizados com 200 g de mistura para um quilo de

ração. Neste experimento a taxa de mortalidade foi em maior número nos coelhos adultos (5 coelhos) alimentados com dieta aterogênica.

JALDIN et al.(2006), em seus experimentos, evidenciaram que a dieta com gema de ovo determina aterosclerose leve em coelhos e alterações semelhantes às provocadas pelo colesterol purificado comercial; que pode ser utilizada como fonte de colesterol alimentar de baixo custo em modelos de aterosclerose experimental, contudo esses autores não formaram grupo com colesterol puro para comparar com seu controle e com o grupo alimentado com gema.

AMARAL et al. (1989) utilizaram 12 coelhos para serem alimentados com dieta rica com 350 mg de colesterol durante 60 dias misturado com banha de porco. Estes autores não referem quanto de banha deram aos animais. Foram observadas lesões ateroscleróticas e obstruções vasculares em diversos ramos da artéria aorta em especial coronária e intercostal.

RENOUD e LECOMPTE (1970) em experimento com 16 coelhos de 2 semanas durante 9 meses pesando 1 a 1,5 kg, formou 3 grupos: grupo 1, foi alimentado com 100 g de ração comercial (6 animais); o grupo 2, com dieta preparada com 89,9% de ração, 5% manteiga, 5% óleo de milho e 0,1% de colesterol (4 animais) ; e grupo 3, com 89,9% de ração, 10% de manteiga e 0,1% de colesterol (6 animais). Foi realizada coleta de sangue para hemoanálise. Nos 9 meses de experimento, alcançou os seguintes resultados: grupo 3, 100% do coelhos desenvolveram aterosclerose.

MARTIN et al. (1985) usaram coelhos pesando $2,34 \pm 1$ kg durante 12 semanas. Um grupo com 5 coelhos recebeu 2 g de colesterol mais 10 ml de óleo de oliva. Foram retirados segmentos da aorta torácica e abdominal. No final do experimento os animais obtiveram aumento de peso. Foram encontrados focos pequenos de calcificação e células espumosas em quatro segmentos arteriais analisados: arco da aorta, primeiro e décimo segundo segmentos torácicos da aorta e artéria mesentérica superior.

AMARAL et al. (1989) avaliaram, em estudo experimental, lesões ateroscleróticas produzidas com dieta aterogênica. Foram utilizados 12 coelhos com 6 meses de idade pesando entre 2500g a 3000g durante 4 meses. Um grupo com 6

coelhos recebeu dieta com volume de 160g diários. Esta dieta, foi composta com ração comercial, colesterol e banha de porco perfazendo ingesta de 1200 mg de colesterol. Outro grupo recebeu apenas ração comercial. Os resultados demonstraram lesões ateroscleróticas e obstruções vasculares em muitas artérias principalmente nas artérias coronárias e intercostais.

2.5- HEMOANÁLISE EM COELHOS ALIMENTADO COM DIETA ATEROGÊNICA.

SANTOS (2001) utilizou valor padrão de referência dos lipídios para indivíduos acima dos 20 anos de idade em seu experimento: colesterol total menor que 200 mg/dL, ótimo; LDL-c menor que 100 mg/dL, ótimo; HDL-c menor que 40 mg/dL baixo e maior que 60, alto; e taxas de triglicérides menor que 150 mg/dL, ótimo.

No experimento de PERCÁRIO (1993), a ração rica em colesterol, foi preparada pela vaporização de uma solução de colesterol em clorofórmio sobre a ração na proporção de 1,5 g de colesterol para 100 g de ração e o valor de LDL-c foi calculado matematicamente pela equação de Friedwald: $LDL = Col\ total - (HDL + Tg/5)$ de acordo com LESSA et al. (1997).

Com 24 coelhos (4 grupos com 6 animais) , FERNANDES et al. (2006), avaliaram o colesterol plasmático com uso de extrato etanólico de própolis. Para hipercolesterolemia dos animais a dieta foi enriquecida com gema de ovo. Estes grupos tratados tiveram um aumento significativo no nível de colesterol total e LDL-c ($p < 0,05$).

MERRIL et al. (1957), realizaram experimentos com 27 coelhos com aproximadamente 10 meses formando 3 grupos: o grupo 1 com 6 animais que recebeu apenas a ração comercial, o grupo 2 que recebeu ração suplementada com

2% de colesterol e grupo 3 com ração, colesterol 2% mais 0,4% de ácido nicotínico durante 8 semanas. No resultado deste experimento o grupo 2 obteve valor do colesterol total de 1300 mg/dL. No grupo com dieta acrescida com colesterol 2% mais 0,4 % de ácido nicotínico obteve taxas de 500 mg/dL.

CONNOR et al. (1967), usaram 36 coelhos formando 5 grupos. A dieta foi ração comercial (6 animais de controle, duração 12 meses), manteiga de cacau (duração 11 meses, 12 animais) , óleo de coco (6 meses, 10 animais) , manteiga (4 animais, 8 meses) e manteiga com 0,25% de colesterol (4 animais, durante 4 meses e meio). O nível de colesterol total foi crescente no grupo com manteiga a 0,25% de colesterol, chegando à taxa de 596 mg/dL no final do experimento.

No experimento de HENRY et al. (1981), foram utilizados 56 coelhos pesando entre 2,3 kg a 2,6 kg. O grupo que recebeu 2 % de colesterol, obteve taxa de colesterol total de 1903 mg/dL. Estes coelhos antes do experimento tinham taxas de colesterol total em 45 mg/dL. Os valores de triglicérides chegaram a 129 mg/dL, diferentemente da taxa anterior ao experimento (90 mg/dL). Este experimento foi realizado em oito semanas.

KAGAN et al. (1981), em seu modelo experimental, utilizaram coelhos pesando entre 2,5 e 3,5 kg, formando 2 grupos para tratamento dietético. O grupo 1 (controle), recebeu ração comercial em 100 g e o grupo 2 recebeu a ração mais 2 g de colesterol mais 8 g de óleo de amendoim por dia durante um período de 105 dias. O nível de colesterol total na última coleta foi bastante significativo, chegando aos valores de 3450 mg/dL.

WAKASUGI (1984), usou 2 grupos com 8 coelhos, pesando de 2,8 a 3,4 kg, para realizar uma dieta com estes. Um grupo com ração normal (100 g) e o segundo grupo com ração comercial modificada (100 g mais 1% de colesterol). Foi analisado o total de colesterol e triglicérido durante uma semana de dieta. O resultado do grupo com ração comercial obteve taxa de colesterol total de 58 mg/dL, sendo LDL-c 17 mg/dL e HDL-c 24 mg/dL e de triglicérido em 63 mg/dL. O grupo tratado com colesterol obteve taxas de colesterol total em 517 mg/dL, LDL-c em 228 mg/dL e HDL-c em 22 mg/dL, e triglicérides em 33 mg/dL.

BOCAN et al. (1993), com tempo de 9 semanas, realizaram um experimento em coelhos pesando entre 1,2 kg e 1,5 kg, formando 7 grupos com 8 animais. Um grupo com ração comercial, segundo grupo com 0,1% de colesterol, o

terceiro grupo com 0,25% de colesterol, grupo 4 com 0,5% de colesterol, grupo 5 com 1% de colesterol, grupo 6 com 1,5% de colesterol e grupo 7 com 2% de colesterol. Na nona semana foram retiradas segmentos da aorta torácica e da femoral para observar desenvolvimento da aterosclerose. Nos grupos alimentados com 1%, 1,5% e 2% de colesterol obtiveram valores próximos de colesterol total no dia 30 e no dia 63, que foram entre a 800 de 1000 mg/dL. Nos valores 0,25% de colesterol foi percebida a presença de lesões fibromusculares e na artéria femoral foi notada a presença de lesão com extensão de células espumosa (50%). Nos grupos de 0,5%, 1% e 2% de colesterol foram encontrados presença de macrófagos, lesões fibrosas. Concluiu que 1% de colesterol na dieta é ideal para aterogênese em coelhos.

Em experimentos com coelhos alimentados com 100 gramas de ração ao dia acrescentada, apenas, de 0,5% de colesterol e 2% de gordura de coco, foi possível promover disfunções do endotélio (RIBEIRO JORGE et al., 1997). Neste experimento testaram dois grupos com 7 coelhos da raça Nova Zelândia com peso de $2,14 \pm 0,16$ kg : um grupo com ração normal e o segundo grupo com 100 g de ração, acrescida com 0,5% colesterol e 2% de gordura de coco durante 30 dias. No final do mês a taxa de colesterol total ultrapassou 1600 mg/dL e LDL-c chegou ao valor de 1000 mg/dl.

Retomando a pesquisa em coelhos RIBEIRO JORGE et al. (1998), separaram três grupos com 10 coelhos machos pesando em média 2,5 kg com idade média de oito semanas para um tratamento dietético com duração de 30 dias: o grupo controle, um segundo grupo com óleo de babaçu a 10% mais 0,5 % de colesterol e o terceiro grupo com suco de berinjela. A administração com 0,5% de colesterol juntamente com a gordura de babaçu a 10% mostrou acentuada elevação do colesterol total (2183%), da LDL-c (4875%) e das triglicérides (174%) quando comparadas com grupo controle. Aterosclerose foi identificada na parede da aorta.

Na pesquisa de ASAI et al. (1998), dois grupos de coelhos da Nova Zelândia, pesando entre 2,3 -2,7 kg, receberam dieta aterogênica. O grupo I, com 19 animais (grupo da esplenectomia); e o grupo II, com 14 animais (grupo controle). O grupo com 19 coelhos foi dividido em dois subgrupos: 12 coelhos com dieta com 1% de colesterol e 7 coelhos com ração comercial. O segundo grupo também foi dividido em dois subgrupos: 9 coelhos com dieta 1% de colesterol e 5 coelhos com ração

normal. Foram retiradas aorta para rotina histológica e foram realizadas análises do sangue. O valor do colesterol total no dia 0 passou de 42 mg/dL para 1689 mg/dL em seis meses. No grupo II passou de 56 mg/dl para 2227 mg/dL. A taxa de HDL-c no grupo I mudou de 20,8 mg/dL para 31,5 mg/dL e no grupo II de 28,3 mg/dL para 29,6 mg/dL. A taxa de triglicérideo no grupo I passou de 84,8 mg/dL para 454,6 mg/dl e no grupo II de 104 mg/dL para 718,3 mg/dL. Em exame microscópico foram notadas células espumosas na aorta. No grupo I, foram observadas 26% de formação de placas aterosclerótica e no grupo II 13,7%.

IHARA et al. (1998), experimentaram dois protocolos de indução de aterosclerose em coelhos adultos, um modelo para fase aguda com 18 animais, adicionando a ração 1,5 % de colesterol durante dois meses e o outro modelo para fase crônica com 40 animais incluindo a dieta 0,5 % de colesterol durante três meses. O nível inicial de colesterol plasmático passou de 41 mg/dL para 986 mg/dL após um mês e aumentou para 1416 mg/dL após os três meses. Exame histológico revelou lesão hepática. No experimento para fase crônica o nível de colesterol total foi superior a 1000 mg/dL e lesões na aorta foi maior. Concluíram que os 2 modelos são úteis no estudo de evolução ateroscleróticas. Quanto ao peso dos animais não houve diferença significativa durante os experimentos e o consumo de ração foi menor, após um mês de dieta com colesterol, em relação àqueles grupos alimentados com ração comercial.

TELOKEN et al. (2000), estudando 27 coelhos machos Nova Zelândia, formaram 3 grupos: o primeiro grupo com 7 coelhos recebeu ração comercial, o segundo grupo com 10 animais foram alimentados com dieta rica 0,5% de colesterol mais 4% de gordura de porco e terceiro grupo com 10 animais com dieta acrescida a 0,5% de colesterol. A ração diária foi de 150 g e água livremente durante 10 semanas de experimento. No grupo controle o colesterol total alcançado foi de 100 mg/dL e de LDL-c valor de 84 mg/dL e a taxa de triglicérideo obtido foi de 98,2 mg/dL no final de experimento. O grupo que recebeu colesterol a 0,5%, obteve colesterol total de 103,4mg/dl, LDL-c de 144,9 mg/dL e o valor do triglicérideo alcançou 114,6 mg/dL. Com a dieta com colesterol mais banha as taxas de colesterol total foram de 314,1 mg/dL, LD-c de 268,9 e triglicérideos de 122 mg/dL. Concluíram que 10 semanas são suficientes para aumentar os níveis séricos de colesterol total.

VALIENTE et al. (2001), utilizaram 18 coelhos machos Nova Zelândia com média de 2,4 kg que receberam 100 g diárias de ração e foram divididos em 3 grupos: grupo I dieta suplementada com 0,5% de colesterol, durante 12 semanas, grupo II alimentado com ração suplementada com 1% de colesterol e grupo III alimentado com ração normal. No grupo I, o peso inicial alterou de 2,33 kg para 2,77 kg, no grupo II de 2,4 kg para 3,23 kg e no grupo III de 2,4 kg passou para 2,7 kg. No grupo II, todos os coelhos apresentaram manifestações de lesões ateroscleróticas na artéria carótidas (estrias gordurosas) e taxas de colesterol total em 723,9 mg/dL; enquanto que no grupo I, com taxas de colesterol de 486,5 mg/dL, apenas 2 coelhos apresentaram estas lesões. Experimento com 1% de colesterol é um bom modelo experimental para formações ateroscleróticas em coelhos.

LIMA et al. (2003), utilizaram coelhos Nova Zelândia, com peso médio de 2200 ± 100 g, com 12 semanas de idade receberam ração comercial com 100 g diárias e água a vontade. Os coelhos foram separados em 6 grupos com 6 animais. O grupo 1, com ração normal; grupo 2, com ração acrescida 0,5% de colesterol e ácido cólico; grupo 3, com ração mais colesterol mais ácido cólico e bixina; grupo 4 com ração mais 0,5% colesterol mais ácido cólico e quercetina, grupo 5 com ração mais 0,5% colesterol e ácido cólico mais bixina e quercetina; e grupo 6 com ração mais 0,5% colesterol mais ácido cólico e norbixina. Em 28 dias de tratamento as amostras do sangue foram coletadas para obtenção dos soros. Todos os grupos tratados com colesterol a 0,5% tiveram aumento no nível de colesterol total em média 10 vezes maior que o grupo 1 (ração normal).

STAHLKE Jr et al. (2004), realizaram experimentos em 2 grupos com 10 coelhos pesando 2000 ± 456 g durante 60 dias. Usando metionina no grupo I e no grupo II como controle. Foram colhidas amostras de sangue para dosagem de colesterol, triglicérides, HDL-c, LDL-c e homocisteína nos dias 0, 30 e 60. Segmentos proximal, intermédio e distal da aorta foram coletados para exame microscópico. Nesta análise, identificaram-se depósitos subendoteliais de macrófagos espumosos, fazendo protrusão na luz do vaso, sem sinal da presença de cálcio nos segmentos citados.

RIBEIRO JORGE et al. (2005), utilizaram grupos com 10 coelhos hipercolesterolêmicos como controle e os outros grupos com atorvastatina, fluvastatina, pravastatina e normal. Com exceção do grupo normal, aos animais foi

administrada ração comercial acrescida de 0,5 % de colesterol e 2% de óleo de coco durante 35 dias. No final do tratamento todos os animais tiveram ganho de peso com média de 200 g. Em média o grupo alimentado com colesterol e óleo de coco obtiveram o valor de colesterol total em 760 mg/ dL. Do LDL-c em 600 mg/dL, diferentemente dos demais grupos que apresentaram média de 200 mg/dL de LDL-c, além deste resultado, o grupo tratado com colesterol , também apresentou evolução da aterosclerose, onde foi observado maior concentração de lipossomos extracelulares na região endotelial.

JALDIN et al. (2006), Experimentaram 14 coelhos machos, pesando em média 1200 kg. Constituindo dois grupos: grupo I de controle 150 g de ração e o grupo II que recebeu dieta contendo uma gema de ovo misturada a 13,5 ml de óleo de milho para cada 150 g de ração comercial. A ração mais a dieta foram processadas para peletização. A duração experimental foi de 3 meses. Considerou a cada gema de ovo tendo como referência 225 mg de colesterol (TABELA DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ALIMENTOS, 2007). Foram retirados segmentos da aorta torácica e abdominal, artérias renais e bifurcações da íliaca, femoral e carótidas. No grupo controle não foram encontrados diferenças significantes, mas no grupo com gema de ovo foram encontradas células espumosas e estavam presentes na aorta abdominal, renal, carótidas e femoral. Em apenas um animal foi observado o espessamento da íntima em grau moderado na transição da aorta torácica para abdominal. Os níveis de colesterol obtidos com dieta a 0,15% de colesterol vindo da gema são bem inferiores aos atingidos com dieta contendo 1% de colesterol purificado, entretanto no final do experimento foram muitos próximos os níveis plasmáticos denotando certa equivalência. A gema foi ineficaz na elevação de triglicerídeos plasmático em relação ao colesterol purificado 1%. A gema pode ser utilizada como fonte de colesterol alimentar de baixo custo em modelos de aterosclerose experimental. O grupo que recebeu dieta suplementada teve peso corporal maior que o grupo controle estatisticamente significativo.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 - AMOSTRA

Foram utilizados 42 coelhos raça Nova Zelândia adultos machos nascidos com uma diferença de no máximo três semanas, os animais foram desmamados após 40 dias, sendo nessa época admitidos ao experimento com peso que variou entre 700 e 800 g, alimentados com ração Socil® e água ad libitum. Quando os animais atingiram entre 7 a 8 meses iniciou-se o experimento, apesar de serem criados nas mesmas condições e local, em gaiolas individuais, pesavam entre 2000 e 3000 g . Estes coelhos ficaram em uma cunicultura a temperatura e luz natural, localizado em Marechal Deodoro no Hospital Escola de Veterinários do Centro de Estudos Superiores de Maceió – CESMAC, onde foram acompanhados por médicos veterinários antes e durante a pesquisa.

O tamanho da amostra foi definido baseado na maioria dos protocolos internacionais que utilizam esse modelo experimental, sendo estes realizados freqüentemente com cinco ou sete animais.

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 $p = 0,5$ e assim trabalhando-se com uma amostra de tamanho grande, há maior segurança nos resultados encontrados. Dessa forma foi utilizado $p = 0,5$ e confiança de 95% para população Infinita seguindo a fórmula: $n = z^2 [p (1 - p) / e^2]$ (SCHMIDT, 2007).

O valor de $p(1 - p) = 0,25$ quando p vale 0,5 e para o valor de z Foi consultada a tabela para área de 47,5% = 0,475, obtendo valor de $Z = 1,96$ desvios padrões. Admitindo o erro padronizado a 0,37 foi achado o número de animais para nível de significância de resultado: $n = 1,96^2 [0,5(0,5) / 0,37^2] \leftrightarrow n \approx 7$.

3.2 - RANDOMIZAÇÃO DA AMOSTRA

Os coelhos foram randomizados em 6 grupos com 7 animais: grupo 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Os animais foram enumerados de 1 a 42 e num saquitol foram colocados papéis enumerados de 1 a 42. Foi solicitado a uma pessoa não participante do experimento a puxar do saquitol cada número. Conforme os números eram sorteados, os animais eram alocados um em cada grupo, até que os grupos estivessem completos. 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 recebeu um número na face interna da orelha direita, com pincel atômico de cor preta (Fig. 1). A descrição dos grupos randomizados é descrita a seguir (item 3.3).



Figura 1. Número localizado na face interna auricular do coelho 38 (grupo G2 – Colesterol).

3.3 - DIETA

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.

Como os coelhos têm o hábito de roer a ração, quando a ração não tinha mais a forma de grãos, era desprezada e substituída por nova.

A ração utilizada foi a Socil® 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%). A dieta complementar foi preparada diariamente, durante 100 dias, segundo o protocolo padronizado neste experimento com:

a) Gema de ovo de galinha Carnáúba® tipo grande que em 100 ml apresenta a seguinte composição: colesterol (997,5 mg); lipídios totais (28,7 g) e ácidos graxos saturados (8,53 g).

b) Banha de porco industrializada Sadia® em 100 g apresenta colesterol (72 mg), lipídios totais (60 g) e ácido graxo saturado (39 g).

c) Colesterol puro.

Estes complementos dietéticos, foram escolhidos por serem de menor custo e para se verificar qual a eficácia destes na formação de aterosclerose em comparação com a administração de colesterol puro Imtrextraco®. Os grupos foram assim distribuídos:

Grupo 1 (G1) - Grupo de controle, que recebeu apenas a ração Socil® em 200 g diária.

Grupo 2 (G2) – Ração acrescida com 1 g de colesterol.

Grupo 3 (G3) – Ração e 20 ml de gema ao dia.

Grupo 4 (G4) – Ração e 20 ml de banha ao dia.

Grupo 5 (G5) – Ração e 40 ml de gema ao dia.

Grupo 6 (G6) – Ração e 40 ml de banha ao dia.

Com exceção do grupo colesterol, onde foi administrada 1g diária em duas tomadas seguidas de 0,5 g, os demais grupos receberam o complemento alimentar dividido em duas tomadas diárias via sondagem oral (Sonda de Nelaton n° 18), com intervalo de 4 a 5 horas por um período de 100 dias.

A ração foi pesada e oferecida pela manhã e deixada à disposição do animal. Ao trocar a dieta no dia seguinte, foi pesada a eventual sobra do dia anterior para cálculo da dieta efetivamente consumida.

3.4 - PREPARO E ADMINISTRAÇÃO DA DIETA ATEROGÊNICA

O preparo da dieta foi diário para se evitar contaminação dos animais ou do próprio alimento. Antes da sondagem oral, a banha foi aquecida no forno de microondas para liquefação. Os valores de referência seguiram a tabela de composição na Indústria Sadia® e na Unifesp correspondendo às taxas de colesterol em 7 mg em porção de 10 ml do produto. A gema foi ofertada crua aos coelhos, a opção por se administrar à gema na forma líquida, foi para facilitar a maior absorção possível de colesterol que é melhor do que a administração na forma sólida. Cada gema tem como referência 225 mg de colesterol (TABELA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTO, 2007). Para a ingestão da gema, os ovos foram limpos, lavados com hipoclorito de sódio e deixados de molho por 5 minutos e abertos no momento da sondagem, evitando assim deterioração e contaminação da dieta. O colesterol foi administrado através de uma seringa de 5 ml especialmente preparada para injeção do pó (cortada sua extremidade para introdução do pó) , sem nenhum meio solvente, assim havia a certeza que o animal ingeriu exatamente 1g de colesterol. Nesta administração a seringa foi introduzida até o istmo das fauces (orofaringe) para ocorrer o reflexo de deglutição. O colesterol administrado, não foi perdido, pois a própria saliva do animal tornou o colesterol homogêneo e o animal foi mantido em

posição inclinada por tempo de 3 minutos para evitarmos qualquer perda da ingesta. Este colesterol (Imtrextraco ®) foi adquirido exclusivamente para o experimento.

A pequena quantidade de colesterol puro (1 g) era injetada, em duas tomadas de 0,5 g lentamente, para evitar falso trajeto e conseqüente engasgo e pneumonia aspirativa do animal. A opção por este modelo, deveu-se ao entendimento, que dissolver 1% de colesterol na ração, como ocorre em vários protocolos experimentais, não garantiria que o grupo faria ingesta homoganeamente, já que cada animal deglute quantidade diferente de ração, independentemente a idade que tenha. Portanto, o colesterol dissolvido em peletas, não garantiria que o animal deglutisse toda a ração oferecida o que não nos conferiria a certeza que cada animal ingeriu exatamente 1g de colesterol.

3.5- DOSAGEM BIOQUÍMICA

Foi realizada análise bioquímica do sangue após jejum de 12 a 14 horas (PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO, 2007) em todos os coelhos, para verificação de suas taxas de colesterol Total, HDL-c e LDL-c bem como de triglicerídeos. O procedimento foi realizado 4 vezes (dias 0, 30, 60 e 100) de tratamento dietético. O sangue foi coletado na artéria auricular central (Fig.2), com seringa de 5 ml e condicionado em tubetes de 6 ml sem anticoagulante para análise. Ao fim da coleta amostras eram encaminhadas à clínica de hemoanálise onde foram centrifugadas e seguiram o procedimento operacional padrão para análise do colesterol total, HDL-c e triglicerídeos. As frações do LDL-c foram obtidas através da fórmula Friedewald: $LDL-c = [(CT-c - HDL-c) - (TG/5)]$.

Todos os dados colhidos foram anotados em protocolos específicos e individuais para cada animal, a quantidade de ração consumida e quaisquer outras alterações observadas foram igualmente registradas.

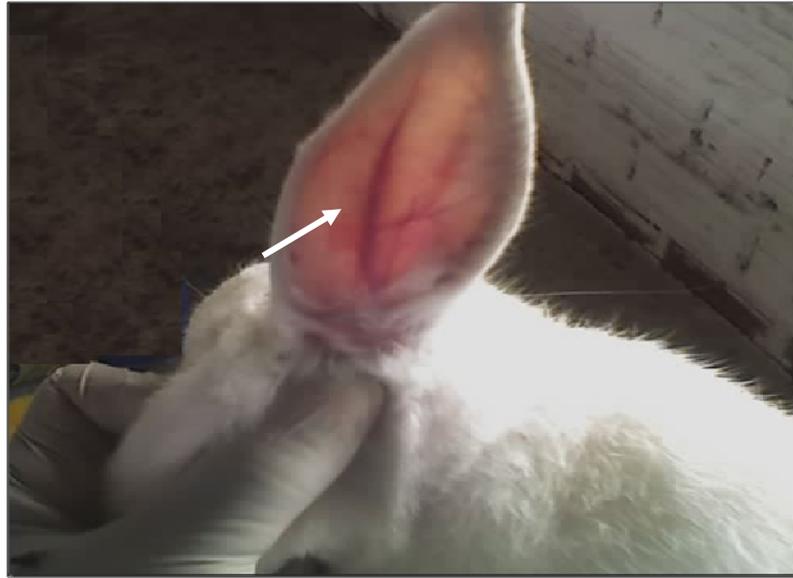


Figura 2. Artéria auricular central (Seta).

3.7- EUTANÁSIA E HISTOPATOLOGIA

No final do experimento, cada animal foi submetido a procedimento cirúrgico para a retirada de fragmento da artéria carótida comum direita próxima de sua bifurcação, do arco aórtico para descendente e a artéria femoral direita em nível de sua emergência; para isto foi realizada a incisão mediana cervicotoracoabdominal e na face medial da coxa. Esses segmentos foram dissecados por planos até expor os vasos para a retirada dos fragmentos nos quais foram tratados e colocados em solução de formaldeído a 10%.

Para a eutanásia, os animais foram previamente anestesiados com cloridrato de cetamina (Ketamina®) 9 mg (IM), associado ao cloridrato de Xilazina (Rompun®) na dose de 30 mg (IM) (SANFORD e COLBY, 1980). A eutanásia ocorreu com a administração destes anestésicos. A dose foi ultrapassada, até ser observada parada cárdio-respiratória do animal.

Após a realização da dieta para a indução de placas ateroscleróticas, os vasos retirados foram submetidos à rotina histológica e coradas com Tricrômico de Masson para microscopia de luz.

3.8 - 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 e desvio padrão. Para comparações entre os grupos tratados com a dieta complementar foi usado o ANOVA one-way e uso do teste de Tukey para saber se existiam ou não diferenças significantes entre as médias dos tratamentos aplicados. Foi adotado o nível significativo de 95% para evitar o risco de falsa rejeição da hipótese nula ($p < 0,05$). Para caracterizar os resultados significantes utilizamos um asterisco (*) e não significativo (NS).

4. RESULTADOS

Nesse experimento, observou-se que 100% dos animais desenvolveram doença aterosclerótica quando alimentado com 1g de colesterol, o que também ocorreu com todos os alimentados com 20ml de gema, demonstrando que os dois modelos são eficazes na indução desta patologia. Contudo, a média do espessamento endotelial após 100 dias, foi sempre maior no grupo com gema, em relação ao grupo com colesterol. O modelo com a gema foi tão melhor que o modelo com colesterol, que a média do espessamento conseguido chegou a ser 399,4% maior quando se analisou a aorta, 398,2% na femoral e 66,2% na carótida comum. Os resultados detalhados são apresentados a seguir:

4.1- ADAPTAÇÃO À DIETA

O comportamento dos grupos em relação à dieta desenvolveu-se da seguinte forma:

G1 (controle) - Seguiu-se o padrão habitual do animal ofertando diariamente 200 g de ração.

G2 (colesterol 1g), G3 (gema 20 ml) e G4 (banha 20 ml) – Adaptaram-se bem à dieta administrada, dividida em duas tomadas (gema e banha), sem óbito nestes grupos. Apesar de 2 coelhos do grupo do colesterol apresentarem sinais de acidente vascular encefálico no final do experimento no 95º dia (Fig. 5). Na análise necroscópica foi observada esteatose hepática em 7 animais (100%) do G2 e 5 (71,4%) do G3 (Fig. 6). Nestes grupos, as fezes apresentaram tonalidade escura (Fig. 11).

G5 (40 ml de gema) e G6 (40 ml de banha) - não se adaptaram à dieta. Estes grupos foram suspensos no 30º dia de experimento em decorrência de evolução para óbito (6 animais do grupo G5 e 4 animais do grupo G6). No grupo G5 e no G6, o resultado da necropsia identificou enterite mucóide com congestão gastrointestinal (Fig. 3 e 4). Esta dieta acarretou imediato efeito colateral nos

animais como afagia, astenia, disenteria e melena. Mesmo com a suspensão imediata da dieta, os cuidados tomados para manter a vida dos animais doentes não tiveram êxito. Ficou evidente que este volume de dieta não é suportada pelos animais, mesmo sendo administrada em duas tomadas.



**Figura 3. Enterite mucóide no intestino grosso (G5 - gema 40 ml).
Observar-se distensão de alças Intestinais (seta).**



**Figura 4. Enterite mucóide no intestino grosso.
(grupo 6 - banha 40 ml). Observar-se distensão de alças**

Intestinais (seta).



Figura 5. Acidente vascular encefálico: hemiplegia esquerda (grupo 2 - colesterol 1 g).

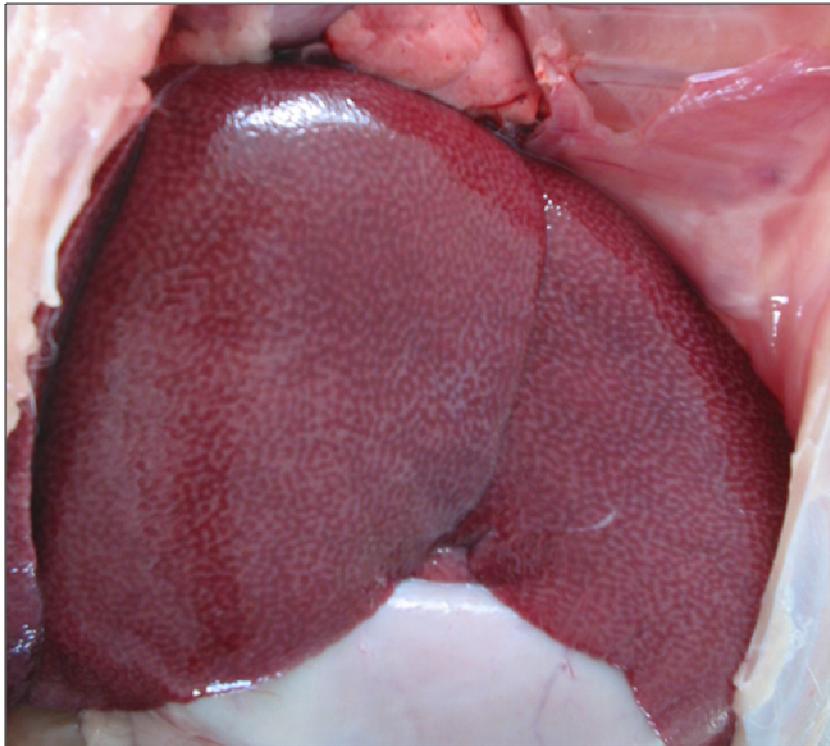


Figura 6. Esteatose hepática no coelho do grupo 2 (colesterol 1 g).

No último trimestre do experimento, o grupo controle reduziu em média 13,6% o volume diário de ração ingerida, este resultado em relação aos demais grupos foi significativo ($P < 0.0001$).

O apetite dos animais por ração evoluiu de forma semelhante nos grupos G2 (gema) ao G4 (banha), aumentando sua ingestão gradativamente; nestes grupos, apenas o G2 foi significativo em relação ao G6. No grupo G5 o apetite diminuiu (12,5%) no 30º dia. No grupo G6, os animais se adaptaram e passaram a se alimentar melhor com aumento de 305,5% (Tab. 1).

Tabela 1. Média, desvio padrão e porcentagem da ingestão diária de ração (g) conforme o dia e o grupo experimental. (G1) controle, (G2) 1 g de colesterol, (G3) 20 ml de gema, (G4) 20 ml de banha, (G5) 40 ml de gema, (G6) 40 ml de banha.

GRUPO	G1	(%)	G2	(%)	G3	(%)	G4	(%)	G5	(%)	G6	(%)
1	167,1±15,8		62,8±14,2		58,1±13,2		33,3±10,1		51,2±11,2		14,4±7,4	
30	162,8±34	2,5	80,9±36,5	28,8	62,1±21,3	6,8+	38,2±17,8	14,7	44,8±24,7	12,5-	58,4±53,7	306
60	153,8±33,4	7,9-	84,9±17,8	35,2	84,8±19,3	45,9+	51,1±17,1	53,4				
100	144,3±41,6	13,6-	77,7±19,8	23,7	65,7±34,7	13,1+	65,7±32,2	97,3				

$P < 0,05$. G1* vs G2, G1* vs G3, G1* vs G4, G1* vs G5, G1* vs G6, G2* vs G6 .

Analisando a tabela 1, observa-se que apenas o grupo controle (G1) e o grupo com 40 ml de gema diminuíram o volume de ração ingerido em relação ao início do experimento.

Conforme esperado pelos pesquisadores, os animais em que foi administrado colesterol, gema, ou banha diminuíram o volume de ração ingerida.

4.2- TAXAS DE COLESTEROL

A seguir, apresentam-se separadamente os dados referentes às taxas de colesterolemia Total, HDL e LDL segundo os grupos:

4.2.1- COLESTEROL TOTAL POR GRUPOS

G2 (1 g de colesterol) – No dia 30 passou de 105,2 mg/dL para 243,3 mg/dL (aumento de 131,3%). O valor de colesterol total médio foi subindo durante o experimento, sendo que, no dia 100, foi de 105,2 mg/dL para 1005,2 mg/dL (tendo aumentado 855,5% em relação ao dia 0).

G3 (20 ml de gema) - Observa-se que houve o maior aumento da taxa média de colesterol e que foram bastante expressivas, estas aumentaram de 52,2 mg/dL para 1466,6 mg/dL no dia 30 (aumento de 2708,4%) e se mantiveram com taxas próximas a esta no dia 100 , passando de 52,2 mg/dL para 1820,6 mg/dL (aumento de 3387,7%).

G4 (20 ml de banha) - No dia 30 passou o valor do colesterol de 69,5 mg/dL para 215,3 mg/dL (aumento de 211,6%), e chegando no dia 100 valor de 69,5 mg/dL para 183,4 mg/dL (aumento de 163,9%).

G5 (40 ml de gema) - Quanto às taxas de colesterol total este grupo no 30° dia passou de 73,2 mg/dL para 653,8 mg/dL (aumento de 793,2%).

G6 (40 ml de banha) - O colesterol total mudou de 65,7 mg/dL para 145,2 mg/dL (aumento de 121%), do dia zero para o dia 30.

Comparando-se o grupo com dieta de gema 20 ml (G3), a variação do colesterol total foi significativa ($P < 0,0180$) em relação ao grupo controle (G1)

chegando a aumentar 3387,7% no dia 100 em relação ao dia 0, que passaram respectivamente de 52,2 mg/dL para 1820,6 mg/dL. A descrição das médias e desvio padrão de cada grupo está melhor detalhada por trimestre na tabela a seguir:

Tabela 2. Média, desvio padrão e porcentagem da colesterolemia total conforme o dia e grupo experimental. (G1) controle, (G2) 1 g de colesterol, (G3) 20 ml de gema, (G4) 20 ml de banha, (G5) 40 ml de gema, (G6) 40 ml de banha.

GRUPO	G1	(%)	G2	(%)	G3	(%)	G4	(%)	G5	(%)	G6	(%)
DIA 0	52,5±11,3		105,2±13,6		52,2±28,6		69,5±37,1		73,2±33,2		65,7±27,6	
DIA 30	62,4±19,1	18,8	243,3±47,6	131,3	1466,6±991,3	2708,4	215,3±120,9	209,8	653,8±249,9	793,2	145,2±28,3	121
DIA 60	62,3±26,7	18,6	681,4±148,3	547,7	1819,8±1108,8	3386,2	144,7±55,7	108,2				
DIA 100	61,2±23,8	16,6	1005,2±447,9	855,5	1820,6±1004,1	3387,7	183,4±47,8	163,9				

* P < 0,05. G2 vs G1 e G3 vs G1.

4.2.2- COLESTEROL HDL

Na tabela 3, as frações de colesterol HDL-c demonstram com 95% de confiança, que existiram diferenças significantes entre os grupos, com valor de $p < 0,018$. O grupo em que foi administrado 20 ml de gema (G3), obteve destaque com aumento do HDL-c de 91,5% em relação ao dia 0. O resultado deste grupo foi significante em relação ao grupo G1 (que teve decréscimo 18,1%) e G4 (onde ocorreu aumento de 50,9%). Os grupos G5 e G6 tiveram decréscimo de 8% e 46,8% respectivamente, resultados estes que não se revelaram significantes.

Tabela 3. Média, porcentagem e desvio padrão do colesterol HDL plasmático (mg/dL) conforme o dia e o grupo experimental. (G1) controle, (G2) 1 g de colesterol, (G3) 20 ml de gema, (G4) 20 ml de banha, (G5) 40 ml de gema, (G6) 40 ml de banha.

GRUPO	G1	(%)	G2	(%)	G3	(%)	G4	(%)	G5	(%)	G6	(%)
DIA 0	33,2±4,4		40,5±20,3		25,8±7,5		22,4±20		27,4±6,3		42,3±21,6	
DIA 30	33,5±5,3	0,9	36,1±14,3	10,8	41,2±11,3	59,7	44,2±10,1	97,3	25,2±1,5	8	22,5±14,5	46,8
DIA 60	29,7±6,1	10,5	34,5±13,5	14,8	54,4±9,3	110,8	39,2±11,7	75				
DIA 100	27,2±8,3	18,1	43,5±13,6	7,4	49,4±6,3	91,5	33,8±13,3	50,9				

$p < 0,05$. G3* vs G1 e G3 vs G4. (NS) comparado outros grupos.

4.2.3- COLESTEROL LDL

Valores do LDL-c (mg/dL) plasmático não revelaram diferenças reais e significantes entre os grupos experimentais ($p > 0,12$). O grupo G2 obteve nível de LDL-c de 1781,1% no dia 100, em referência à primeira análise sanguínea. Mesmo com estes valores elevados, este, não obteve dados tão expressivos como no grupo G3 (20 ml diárias de gema), que apresentou taxa de 14,2 mg/dL (dia 0) para 1742,1 mg/dL no final do experimento (aumento de 12.168,3%), estes resultados, são apresentados na tabela a seguir.

Tabela 4. Média, porcentagem e desvio padrão do colesterol LDL (mg/dL) plasmático conforme o dia e o grupo experimental. (G1) controle, (G2) 1 g de colesterol, (G3) 20 ml de gema, (G4) 20 ml de banha, (G5) 40 ml de gema, (G6) 40 ml de banha.

GRUPO	G1	(%)	G2	(%)	G3	(%)	G4	(%)	G5	(%)	G6	(%)
DIA 0	5,4±2,1		50,4±28,8		14,2±3,6		27,5±2,3		28,4±3,6		2,1±1,1	
DIA 30	14,2±3,6	163	190,4±12,5	277,8	140,2±19,7	887,3	114,2±3,8	315,3	26,2±2,8	7,7	48,2±3,6	2195
DIA 60	18,3±4,2	238,9	631,2±275,2	1152,4	1734,2±326,2	12112,6	26,2±2,6	4,7-				
DIA 100	18,1±4,8	235,2	948,1±156,6	1781,1	1742,1±236,4	12168,3	76,3±2,4	177,4				

Dados expressos NS para os grupos experimentais, $p > 0,05$.

4.3- DOSAGENS DE TRIGLICERÍDEOS

A taxa de triglicerídeo no grupo controle obteve aumento de 7%, o grupo G2 (1 g de colesterol) apresentou redução de 7,4%. O grupo G3 (gema 20 ml) aumentou 136,5%. Já o grupo o G4 (banha 20 ml), que obteve um aumento 278% (quase o dobro do grupo anterior). Grupo G5 (40 ml gema) aumentou 609,5% em relação a sua primeira análise, sendo significativa através do teste de Tukey comparando-o com outros grupos, tendo o valor de $p < 0,04$ (Tab. 5). O grupo G6 (banha 40 ml), em sua segunda análise (dia 30) obteve aumento de 283,5% de triglicerídeo (Tabela 5).

Tabela 5. Média, porcentagem e desvio padrão do triglicerídeo plasmático (mg/dL) conforme o dia e o grupo experimental. (G1) controle, (G2) 1 g de colesterol, (G3) 20 ml de gema, (G4) 20 ml de banha, (G5) 40 ml de gema, (G6) 40 ml de banha.

GRUPO	G1	(%)	G2	(%)	G3	(%)	G4	(%)	G5	(%)	G6	(%)
DIA 0	69,5±15,2		75,8±12,3		63,5±6,4		102,2±25,2		106,2±32,2		33,4±2,9	
DIA 30	73,3±5,3	5,5	80,9±5,8	6,7	96,4±4,5	51,8	298,6±14,2	192,2	753,5±152,5	609,5	128,1±52,2	283,5
DIA 60	76,4±6,1	9,9	78,7±8,6	3,8	155,6±21,1	145	407,2±56,2	298,4				
DIA 100	74,4±3,6	7	70,2±7,6	7,4	150,2±18,2	136,5	386,3±32,2	278				

p <0,05. Relação entre os grupos G3* vs G1, G5* vs G1.

4.4 - PESO DO ANIMAL

Os dados da tabela 6, demonstram o peso (g) dos coelhos por grupo durante 100 dias (exceto o grupo G5 e G6, com duração de 30 dias), revelando que os grupos em tratamento até o dia 100 obtiveram ganhos de peso aproximados, mais com diferença significativa para o grupo alimentando com 20 g de gema (aumento de 16,8%) para os 100 dias em relação ao grupo controle (aumento de 15,9%) e ao grupo 1 g de colesterol (aumento de 5,3%) com valor de $p < 0,0002$. O grupo 40 g de gema foi significativa (aumento de 1,6%) no dia 30 em relação apenas ao grupo controle. Apesar do grupo controle (ração comercial) ter consumido maior volume de ração, em comparação com os grupos que receberam outras dietas, não se observou resultados significantes em relação ao ganho de peso, conforme pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6. Média, porcentagem e desvio padrão do peso (g) do animal conforme o dia e o grupo experimental. (G1) controle, (G2) 1 g de colesterol, (G3) 20 ml de gema, (G4) 20 ml de banha, (G5) 40 ml de gema, (G6) 40 ml de banha.

GRUPO	G1	%	G2	%	G3	%	G4	%	G5	%	G6	%
DIA 0	2023,2±56,8		2002,4±89,6		2415,5±95,3		2200,2±65,2		2641,8±75,6		2502,3±98,7	
DIA 30	2148,3±60,6	6,2	1852,5±109,1	7,5	2442,4±52	1,1	2200,3±58,8	0	2685,2±97,1	1,6	2291,8±142,6	8,4
DIA 60	2237,4±36,6	10,6	2000,4±64,8	0,1	2624,1±62,8	8,6	2286,4±78,9	3,9				
DIA 100	2345,1±98,2	15,9	2109,1±107,6	5,3	2820,7±47,9	16,8	2435,6±107,1	10,7				

p <0,05. Relação entre os grupos G3* vs G1, G3* vs G2, e G5* vs G1.

4.5 - ALTERAÇÕES CUTÂNEAS E FECAIS

O grupo G4 (20 ml de banha), apresentou várias complicações clínicas: 2 tiveram alopecia (Fig. 7), 2 xantomas labiais (Fig. 8) e 1 xantoma auricular (Fig. 9), contudo nenhum destes animais evoluiu para óbito. 3 animais desenvolveram disenteria aguda nos primeiros dias (Fig. 10).

O grupo G3 (20 ml de gema), apresentou fezes escurecidas (Fig. 11).



Figura 7. Alopecia no coelho do grupo G4 (20 ml banha).



Figura 8. Xantoma na região mental do coelho do grupo G4 (20 ml de banha) (seta).



Figura 9. Xantoma na face auricular interna do coelho do grupo G4 (20 ml de banha) (seta).



Figura 10. Aspecto das fezes (diarréia) no grupo G6 (banha 40 ml) (seta).



Figura 11. Aspecto das fezes escurecidas no grupo G3 (gema 20 ml) (seta).

4.6- ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Para esta análise, foram retiradas as artérias carótida comum direita em nível de sua bifurcação, o arco da aorta e o segmento proximal da artéria femoral direita. Os resultados dos grupos seguem descritos nas tabelas 7, 8, 9 e 10.

G1 (controle) - Não foram observadas alterações histológicas nos vasos analisados.

G2 (colesterol 1g) - Foi evidenciada formações de células espumosas em todos os animais (100%) e espessamento endotelial em 6 animais (71,4%), (Fig. 13 e 14).

G3 (gema 20 ml) - Foram observadas bem delineadas, células espumosas e espessamento em 6 coelhos (85,7%) , (Fig. 15 e 16). De acordo com a mensuração do espessamento a aorta e femoral foram significantes comparados com os demais (Tabela 9).

G4 (banha 20 ml) não foram observadas alterações do endotélio.

G5 (gema 40 ml) - Mesmo com apenas 30 dias de dieta, observou-se a formação de células espumosas em 2 animais (28,5%) e em 1 animal (14,3%) espessamento do endotélio (Fig. 17).

G6 (banha 40 ml) - Não foram observadas alterações histológicas com o mesmo tempo de tratamento do G1.

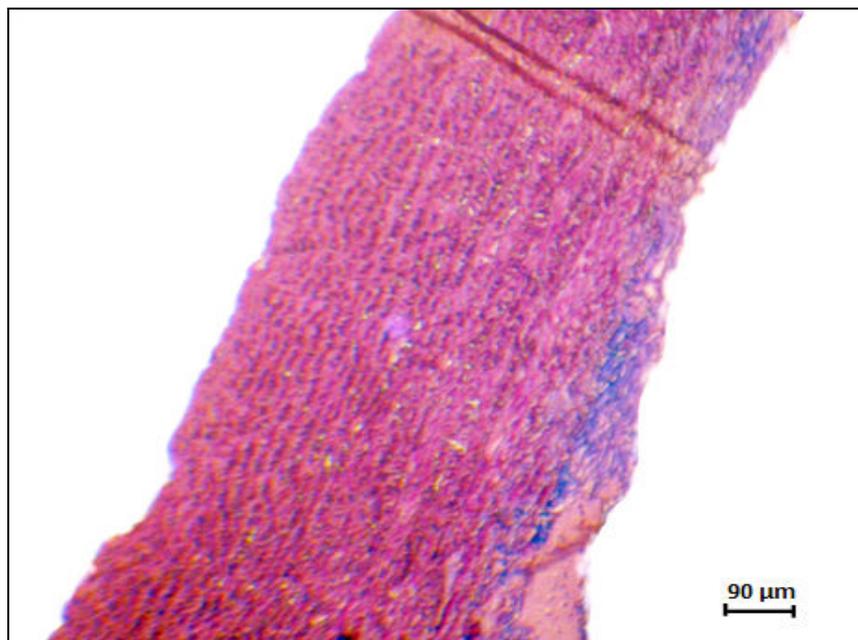


Figura 12. Ausência de espessamento endotelial da aorta G1 (controle). Aumento 4X.

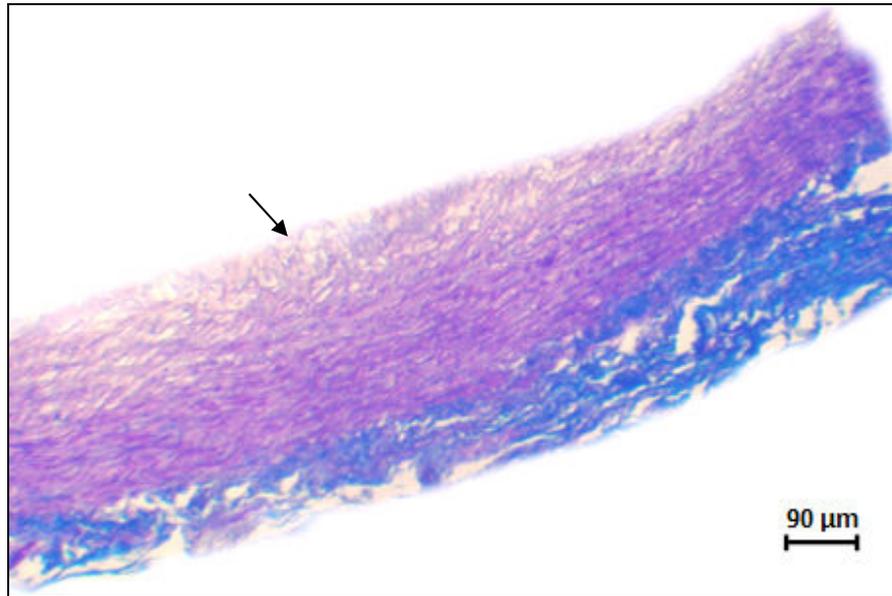


Figura 13. Presença de células espumosas (seta). Carótida comum no grupo G2 (1 g de colesterol). Aumento 4X.

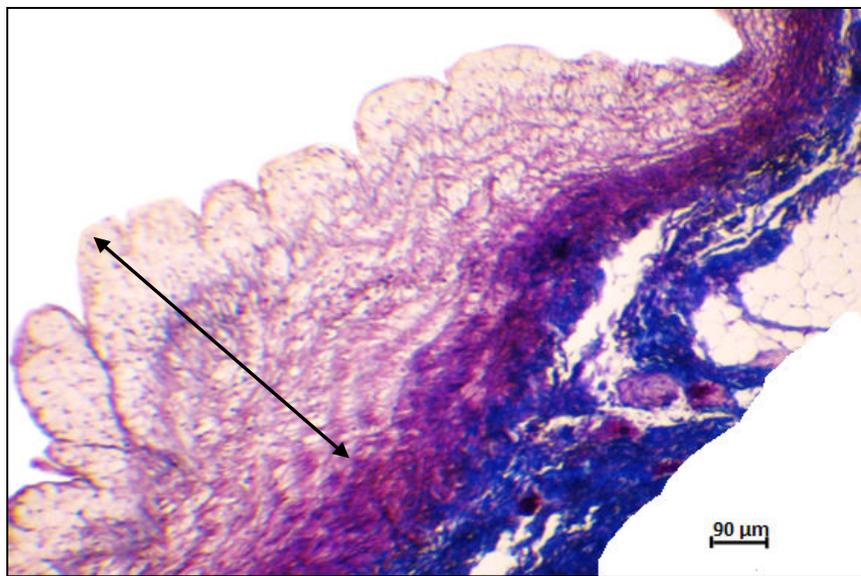


Figura 14. Espessamento do endotélio, 630 μm. Artéria femoral G2 (1 g de colesterol). Aumento 4X.

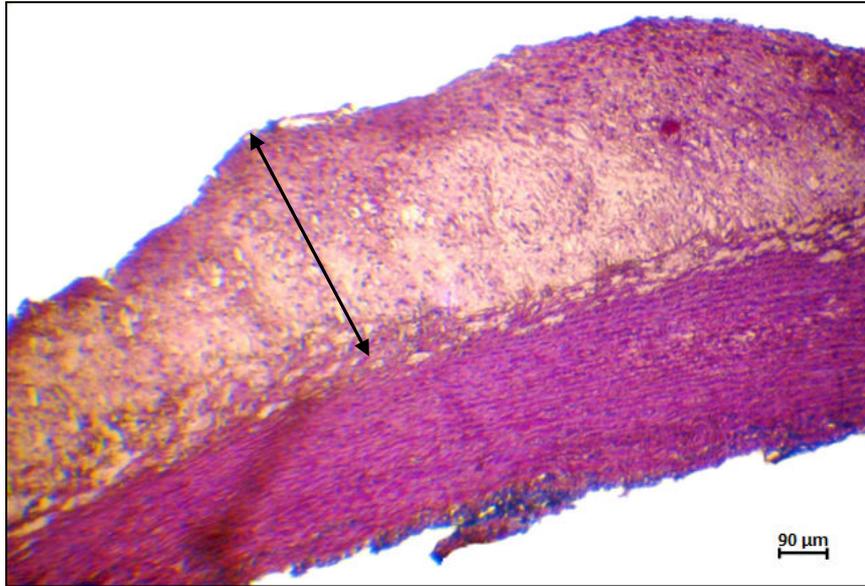


Figura 15. Espessamento do endotélio, 540 μm. Artéria carótida G3 (20 ml de gema). Aumento 4X.

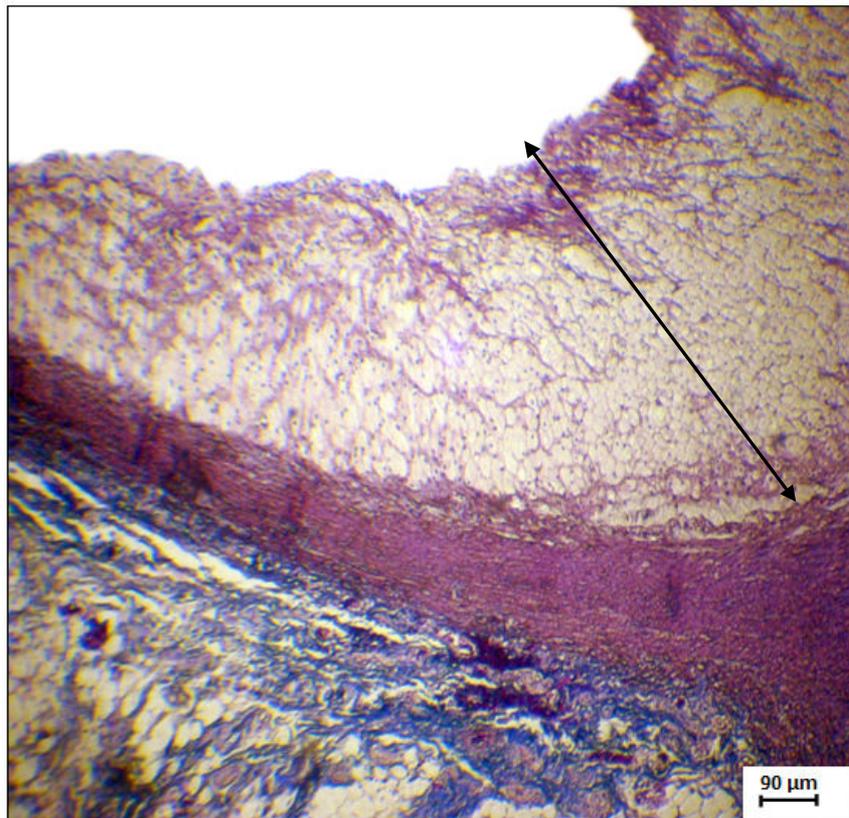


Figura 16. Espessamento do endotélio, 810 μm. Aorta G3 (20 ml de gema). Aumento 4X.

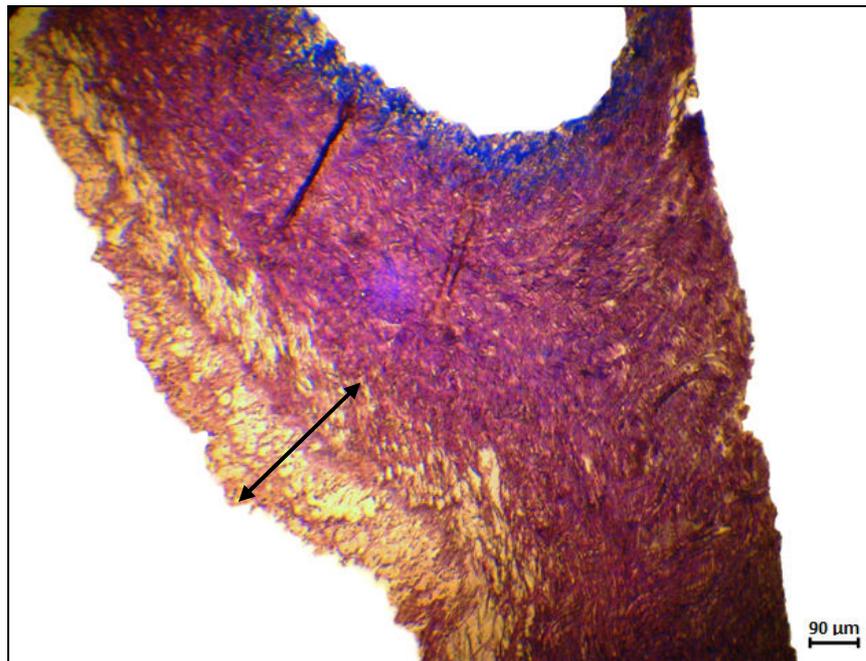


Figura 17. Espessamento do endotélio, 350 μm . Aorta G5 (40 ml de gema). Aumento 4X.

Para facilitar a análise dos dados histológicos optou-se por apresentá-los em tabelas.

Tabela 7. Número de vasos sanguíneos analisados por grupos que apresentaram células espumosas sem espessamento de endotélio. (G1) Controle, (G2) 1 g de colesterol, (G3) 20 ml de gema, (G4) 20 ml de banha, (G5) 40 ml de gema, (G6) 40 ml de banha.

GRUPOS	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Carótida	0	3	4	0	0	1
Aorta	0	4	1	0	0	1
Femoral	0	3	1	0	0	1

* $p < 0,05$. G2* vs G1, G2* vs G4, G2* vs G5, G3* vs G4, G3* vs G5 e G3* vs G6.

Analisando a tabela 7, observa-se que os grupos com utilização de banha, apenas apresentaram alterações com altas doses.

Tabela 8. Número de vasos sanguíneos identificados com espessamento de endotélio. (G1) Controle, (G2) 1 g de colesterol, (G3) 20 ml de gema, (G4) 20 ml de banha, (G5) 40 ml de gema, (G6) 40 ml de banha.

GRUPOS	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Carótida	0	2	1	0	0	0
Aorta	0	7	5	0	2	0
Femoral	0	1	4	0	0	0

* p <0,05. G2* vs G1, G2* vs G4*, G2* vs G5, G2* vs G6, G3* vs G1, G3* vs G4, G3* vs G5 e G3 vs G6.

Nessa tabela, verifica-se que todos os animais com ingestão de 1 g de colesterol (G2) e todos com 20 ml de gema (G3), apresentaram espessamento endotelial em algum dos vasos analisados.

Tabela 9. Média e desvio padrão do espessamento do endotélio em micrômetros (μm) nos grupos (G2) 1 g de colesterol e (G3) 20 ml de gema.

VASOS (μm)	AORTA	FEMORAL	CARÓTIDA
GRUPO DE COLESTEROL (1 g)	144,2 \pm 15,2*	72,3 \pm 12,2	108,5 \pm 37,8
GRUPO DE GEMA (20 ml)	720,1 \pm 153,4*	360,2 \pm 75,3*	180,3 \pm 65,4

* p <0,05. G2: aorta* vs femoral e carótida, G3: aorta* vs carótida.

O espessamento endotelial de 144,2 μm no (G2) e 720,1 μm (G3), foi 399,4% a mais na aorta dos animais alimentados com gema. Na femoral, o grupo colesterol (G2) apresentou espessamento de 72,3 μm e no grupo Gema (G3) espessou 360,2 μm (aumento de 398,2%). Na carótida, a relação da média de espessamento nestes grupos foi de 108,5 μm para 180,3 μm respectivamente (66,2% a mais de espessamento), conforme foi apresentado na tabela 9. Comparando-se com o grupo do colesterol, esse resultado comprovou um efeito bem mais agressivo da gema sobre o endotélio.

Na tabela a seguir, apresentam-se o número e a porcentagem de animais que desenvolveram aterosclerose.

Tabela 10. Número de animais que desenvolveram aterosclerose. (G1) Controle, (G2) 1 g de colesterol, (G3) 20 ml de gema, (G4) 20 ml de banha, (G5) 40 ml de gema, (G6) 40 ml de banha.

GRUPOS	G1	%	G2	%	G3	%	G4	%	G5	%	G6	%
Nº DE COELHOS	0	0	7	100	7	100	0	0	3	42,8	0	0

* $p < 0,05$. G2 vs G5 , G3 vs G5. NS . G2 vs G3.

Um dado importante nestes resultados é o fato de todos os coelhos do grupo de colesterol (1g), bem como todos os do grupo com 20 ml de gema apresentaram aterosclerose, o que comprovou a eficácia dos dois modelos na indução da doença.

Concluindo os resultados, apresenta-se a seguir uma tabela, onde se tem um estudo comparativo do colesterol total no atual experimento (BERNARDINO e SOUSA-RODRIGUES, 2008) com os diferentes modelos propostos.

Tabela 11. Comparação entre os experimentos realizados sobre os tipos de dieta hipercolesterolêmica e o valor do colesterol plasmático total em relação aos resultados de Bernardino & Sousa-Rodrigues

AUTORES	DIAS	DIETA	COLESTEROL (mg/dL)
ASAI et al. (1998)	180	COLEST 1,0%	1689
BERNARDINO e SOUSA-RODRIGUES (2008)	100	20 ml BANHA PORCO	183
		1 GEMA (20 ml)	1820,6
		COLEST 1 g	1005,2
BOCAN et al. (1993)	63	COLEST 0,25%	287,5
		COLEST 0,5%	505,8
		COLEST 1,0%	843
		COLEST 1,5%	816
		COLEST 2,0%	855
CONNOR et al. (1967)	135	COLEST 0,25% + MANTEIGA	596
HENRY et al. (1981)	60	COLEST 2,0% + PLACEBO	1903
IHARA et al. (1998)	90	COLEST 0,5%	1000
		COLEST 1,5%	1416
VALIENTE et al. (2001)	84	COLEST 0,5%	486,5
WAKASUGI et al. (1984)	7	COLEST 1,0%	517
RIBEIRO JORGE et al. (1997)	30	COLEST 0,5%+GORDURA BABAÇU 10%	1693
RIBEIRO JORGE et al. (1998)	30	COLEST 0,5%+GORDURA BABAÇU 10%	1360,5
RIBEIRO JORGE et al. (2005)	35	COLEST 0,5%+ÓLEO DE COCO 2,0%	760
KAGAN et al. (1981)	105	COLEST 2,0% +ÓLEO DE AMENDOIM 8g	3450
MERRIL et al. (1957)	60	COLEST 2,0% + PLACEBO	1300
		COLEST 2,0% + ÁCIDO NICOTIM 0,4%	500
LIMA et al. (2003)	28	COLEST 0,5%	138,3

5. DISCUSSÃO

5.1- ADAPTAÇÃO À DIETA

Analisando o trabalho Gonzáles-Gonzáles et al. (2005), que alimentaram 36 coelhos com dieta aterogênica, 05 animais morreram no espaço de 30 dias. O Protocolo da prática consistia em colesterol 25,5 g mais 1,5 g de tiouracil, 10 g de ácido cólico e 200 g de manteiga que foi padronizado com 200 g de mistura para 1 kg de ração. Diferentemente destes autores, que dissolveram a dieta gordurosa na ração peletizada dos animais, (e sabendo que cada animal se alimenta com volume diferente), para ter certeza que cada animal alimentava-se exatamente com a dosagem desejada, nós preferimos administrar diretamente a dieta via oral, através de seringa ou sonda nasogástrica. Isto se deve ao fato de desejarmos nesta dissertação, estabelecer com precisão qual das dietas é mais deletéria à parede arterial, bem como pretendeu-se aqui, determinar qual dieta tem menor custo e se as dietas de fácil aquisição e administração produzem com eficácia os modelos experimentais de arteriosclerose. Baseados nisto, verificamos em nosso trabalho que é viável provocar arteriosclerose sem a necessidade de manipular dietas elaboradas em laboratórios, bem como não é necessário adquirir colesterol puro, produto este, que pode ser de alto custo, poderá limitar alguns experimentos, ao passo em que tanto a gema como a banha são mais facilmente encontradas. Nossos resultados comprovaram que a dieta simplesmente com gema de ovo é mais eficaz que o colesterol puro que vinha até então sendo constantemente utilizado nas pesquisas nacionais e internacionais.

ANITSCHKOW (1913) em seu experimento com coelho mostrou que 90% desenvolveram aterosclerose com gema de ovo e colesterol puro. Também Jaldin et al., 2006, evidenciaram que a dieta com gema de ovo desenvolvem aterosclerose leve em coelhos e alterações semelhantes às provocadas pelo colesterol puro. Apesar destes autores descreverem a formação de placas, não deixam claro como deve reproduzido esse modelo, ou seja, por quanto tempo foi administrado a gema, bem como com qual a quantidade de gema (em volume) deve ser administrada. Também nenhum autor descreveu qual o volume máximo de gema suportado pelos

animais sem causar óbito. Talvez, seja este o motivo das dietas descritas por ANITSCHKOW (1913) e JALDIN et al. (2006) não estarem sendo utilizadas com freqüência. Dessa forma, a comunidade científica não conseguindo reproduzir fidedignamente estes modelos, optaram por modelos mais caros e elaborados e agora, baseados em nossos resultados, comprovadamente menos eficazes. Em nosso experimento a simplicidade de manuseio e a administração da gema crua de galinha, nos deram resultados significativamente maiores de colesterol total, de sua fração LDL, bem como no espessamento do endotélio arterial, espessamento este, que não foi descrito por estes autores.

Levando-se em consideração a ingestão de ração peletizada nos animais com dieta suplementada com gema, com banha ou com colesterol observou-se ingesta bem menor em relação ao grupo controle. Para este, era ofertada apenas ração peletizada. Este comportamento alimentar dos animais já era obviamente esperado, uma vez que estávamos forçando os animais a alimentarem-se com gema, ou banha, ou ainda, com colesterol. Tal observação, não é novidade e já foi descrita por IHARA et al. (1998). Estes autores observaram que consumo de ração, também, foi menor após um mês de dieta com colesterol em relação aqueles grupos alimentados apenas com ração comercial.

5.2 – COLESTEROLEMIA

CONNOR et al. (1967), usando 0,25% de colesterol acrescido de manteiga durante 135 dias, obteve valor de colesterol plasmático total obtendo taxa média de 596 mg/dL. Com a mesma dosagem de colesterol e acrescentando 2% de óleo de coco, durante 35 dias, RIBEIRO JORGE et al. (2005) obteve taxa de colesterol de 760 mg/dL, nós em 100 dias obtivemos taxa de colesterol total de

1821mg/dL com 20 ml de gema, portanto bem mais eficiente do que o modelo retratado por estes autores.

Por outro lado, analisando os trabalhos experimentais sobre aterosclerose em coelhos observou-se que a administração com 2 % de colesterol mais 10 % de óleo de amendoim do trabalho de KAGAN et al. (1981), determinou em um índice bem mais elevado (3450 mg/dL) no valor de colesterol total plasmático. Apesar dos bons resultados descritos, estes autores descrevem que o colesterol foi dissolvido nas peletas, contudo estes não deixam claro como foi a administração do óleo de amendoim, como na maioria dos trabalhos, os autores dificultam a reprodução do modelo.

Oportunamente MERRIL et al. (1957) e HENRY et al. (1981) com administração de 2,0 % de colesterol mais placebo obtiveram valores de colesterol em 60 dias de 1300 e 1900 mg/dL respectivamente, resultados semelhantes aos 1819 e 1821mg/dL encontrados por nós em 60 e 120 dias com a administração de 20 ml de gema.

Com administração de colesterol em 1% na dieta do trabalho de WAKASUGI et al. (1984); BOCAN et al. (1993); ASAI (1998); VALIENTE et al. (2001) e BERNARDINO E SOUSA-RODRIGUES (2008) obtiveram dosagens de colesterol plasmático crescentes, demonstrando que o valor do colesterol plasmático foi diretamente proporcional ao tempo de experimento, apesar de termos encontrado um valor de colesterol plasmático em média, bem maior no dia 30 do que no dia 0 e maior ainda no dia 60, mais praticamente estes valores foram estáveis entre o dia 60 e o dia 100. Este resultado também se confirma para os experimentos realizados com dosagens de 0,5% de colesterol segundo BOCAN et al. (1993), IHARA et al (1998), VALIENTE et al. (2001). Trabalhos de RIBEIRO JORGE et al.(1997 e 1998), acrescentando ao colesterol de 0,5% mais 10% de gordura de babaçu tiveram com resultado valores de colesterol plasmático no tempo de 30 dias ultrapassando 100 mg/dL de colesterol plasmático . TELOKEN et al. (2000) usando 0,5% de colesterol mais 4% de gordura de porco obteve em 70 dias valor de colesterol de 314 mg/dL e oportunamente, nosso trabalho, BERNARDINO E SOUSA-RODRIGUES (2008) com uso de 20 g de banha de porco, sem uso de colesterol puro obteve taxas inferiores com média de 183 mg/dL em 100 dias.

JALDIN et al. (2006), usaram uma gema para 150 gramas de ração obtiveram valores de colesterol total plasmático abaixo aos resultados de BERNARDINO E SOUSA-RODRIGUES (2008). Nesta observação destacamos que o aumento das taxas de colesterol total no grupo G3 (20 ml de gema) foi bem maior que no grupo G2 (1000 mg de colesterol). Apesar de uma gema apresentar o volume de 20 ml, possui em média de 225 mg de colesterol, os autores acreditam que a hipercolesterolemia foi mais acentuada devido ao fato do colesterol está melhor dissolvido e distribuído na gema em sua forma líquida, isto possivelmente explicaria a absorção facilitada do colesterol exógeno.

5.3- DOSAGENS DE TRIGLICERÍDEOS

HENRY et al. (1981) com colesterol 2% em 60 dias, obteve taxas de triglicerídeos de 129 ± 30 mg/dL em relação ao dia zero que foi de 90 ± 23 mg/dL. Oportunamente WAKASUGI et al. (1984) com 1% de colesterol durante uma semana, obteve taxa de triglicerídeo baixa de 33 ± 20 mg/dL. O trabalho de TELOKEN et al (2000), usando ração acrescida com 0,5% de colesterol mais 4 % de banha animal durante 70 dias, obtiveram taxas de triglicerídeos 122 mg/dL em seu experimento. Para RIBEIRO JORGE et al. (1998) os valores de triglicerídeo chegaram a ter um aumento em 174% em relação ao grupo controle. Sua dieta estava baseada em 0,5% de colesterol juntamente com a gordura de babaçu a 10%, administrada durante 35 dias. Através do trabalho de ASAI et al. (1998) foi evidenciado aumento do triglicerídeo com dieta 1% de colesterol passando de $104 \pm 18,1$ mg/dL para $718,3 \pm 356,3$ mg/dL durante 180 dias. No outro grupo de seu experimento, colesterol 0,5%, o valor médio de triglicerídeo foi de 122 mg/dL em 70 dias.

Os resultados das taxas de triglicerídeos destes autores foi bastante discrepante, estranhamente, observe-se ainda, o aumento dos triglicerídeos para

autores que acrescentaram apenas colesterol à dieta (HENRY et al.,1981), os quais obtiveram valores próximos ao experimento que administrou colesterol e banha animal (TELOKEN et al., 2000).

Estranhamos os resultados descritos por HENRY et al. (1981), por que em nosso resultado foi evidenciado que quando se acrescenta uma dieta rica em gordura (banha), a taxa de triglicérideo, presente fortemente na banha, aumenta de forma significativa em relação àqueles tratados com colesterol ou gema de ovo, conforme descrito abaixo.

Evidenciamos que após 100 dias, no grupo G3 (20 ml de gema), as taxas de triglicédeos foram de 150,2 mg/dL enquanto que o grupo G4 (20 ml de banha) foi de 386,3 mg/dL, já o grupo G2 (1g de colesterol) teve taxas de triglicédeos de 70,2 mg/dL e no dia 0, a taxa foi de 75,8 mg/dL. Já o grupo G1 (grupo apenas com ração) obteve nível médio de triglicédeo em 74,4 mg/dL.

Os resultados são reforçados pelos demais autores citados, identificando que a dieta com banha de porco aumenta de forma significativa o nível de triglicédeo ou outro tipo de gordura acrescida na dieta. O trabalho de ASAI et al. (1998), foi outra exceção, com resultados ainda mais gritantes, quando através da administração de colesterol a 1% obteve no final de seu experimento taxas elevadas de triglicédeos de $718,3 \pm 356,3$ mg/dL. O que explicaria estes resultados? Imaginamos que, além do tempo de administração da dieta superior a qualquer outro trabalho citado (180 dias), a ração comercial oferecida aos animais, talvez já contivesse algum tipo de gordura suficiente para influenciar no aumento dessas taxas.

5.4- PESO DO ANIMAL

Levando em consideração o peso do coelho após experimento, Martin et al, 1985, perceberam aumento em média de 900 g. Em concordância, o trabalho de TELOKEN et al. (2000), obtiveram em seus animais experimentais ganho de peso

em 620g e com ração acrescida com 0,5% de colesterol mais 4 % de banha animal um ganho de 920 g em 70 dias experimentais.

Diferente dos resultados IHARA et al. (1998) em seu experimento não obtiveram diferença significativa do peso animal e o consumo de ração foi menor após um mês de dieta com colesterol em relação àqueles grupos alimentados com ração comercial. Oportunamente o trabalho de VALIENTE et al. (2001) demonstrou aumentou em 400 g para os animais tratados com dieta rica em colesterol 0,5%, aumento de 200 g para os tratados com colesterol 1% e para grupo controle teve aumento de 300 g, sem mostrar diferença significativa nestes pesos, da mesma forma RIBEIRO JORGE et al. (2005), em seu trabalho destacaram aumento de peso, em média 200 g, sem ocorrer diferença significativa. Em nosso trabalho observou-se (Tabela 6) que o G3 (20 ml de gema) no final de 100 dias apresentou diferença significativa do seu pesos médio. Os outros animais neste mesmo período não tiveram valores significantes, reforçando-nos os trabalhos citados anteriormente, que há um aumento de peso dos animais nos dias determinados de experimentos, entretanto nenhum grupo se destacou de forma significativa. Exceção o trabalho de JALDIN et al. (2006) que obteve no grupo com dieta suplementada com gema de ovo peso corporal final maior e significativa em relação ao grupo controle, correspondendo aos mesmos resultados do nosso experimento com gema de ovo .

Vale ressaltar que nos diversos trabalhos experimentais, não há uma padronização do peso dos animais, tornando difícil à comparação entre as descrições. Autores como RENOUD e LECOMPTE (1970) chegaram a utilizar animais com peso entre 1000 a 1500 g; MARTIN et al. (1985) usaram coelhos com peso de 2340 ± 1000 g; AMARAL et al. (1989) entre 2500 g a 3000 g e KAGAN et al. (1981), em seu modelo experimental, utilizaram coelhos pesando entre 2500 e 3500 g; quando já é provado que os coelhos mais pesados desenvolvem aterosclerose com mais facilidade.

5.5- ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

DUQUE (1998), já havia observado a formação de células espumosas que surgiram principalmente nas artérias dos membros inferiores, em seqüência nas artérias ilíacas, aorta e por último nas artérias coronárias. Conforme o experimento de MARTIN et al. (1985), foram encontrados principalmente no arco da aorta, intercostal e artéria mesentérica superior pequenas áreas de calcificação e células espumosas. Análise de MANRESA e RECEDILLA (1986) mostra que as lesões ateromatosas são mais observadas na aorta abdominal e em bifurcações.

ASAI et al. (1998) chama atenção ao exame microscópico quando foram observadas células espumosas na aorta, da mesma forma Ihara et al, 1998 confirmam que lesões na aorta foram maiores em relação a outros vasos estudados. Confrontando estes trabalhos, e evidenciando a rota da aterosclerose na aorta os dois trabalhos de Amaral et al. (1989) demonstram lesões ateroscleróticas e obstruções vasculares em diversos ramos da aorta em especial coronária e intercostais. Ilustrando a importância da aorta como foco da patogenia da aterosclerose BRUNNER et al. (2000), afirmaram que as placas fibrosas que se desenvolvem, são compostas por células musculares lisas, fibras de colágeno, componentes plasmáticos e lipídios nas quais são encontradas mais na aorta abdominal, coronárias, poplíteas e carótida interna.

No experimento VALIENTE et al. (2001), todos os coelhos apresentaram manifestações de lesões ateroscleróticas na artéria carótida, bem como também nos experimentos de KUYMJIAN et al. (2004) foram notadas aterogênese induzida pela dieta rica em colesterol na aorta e na artéria carótida. Em confirmação STAHLKE Jr et al. (2004) realizaram cortes histológicos em três partes da aorta, onde foram percebidos depósitos subendoteliais de macrófagos espumosos, fazendo protrusão na luz do vaso, sem sinal da presença de cálcio .

GOTTLIEB (2005), em seus estudos afirmaram que qualquer artéria pode ser afetada, mas as principais artérias acometidas na doença são aorta, artérias coronárias e cerebrais. RIBEIRO JORGE et al. (2005), também apresentaram em

seu trabalho evolução da aterosclerose na aorta, onde foi observado maior concentração de lipossomos extracelulares na região endotelial.

Levando em consideração a importância da gema, JALDIN et al. (2006) encontraram acúmulos de lipídicos discretos no interior de células espumosas e que estavam presentes na aorta abdominal, renal, carótidas e femoral. Em nosso trabalho o foco do estudo histopatológico concentrou-se no arco da aorta, artéria carótida comum direita e artéria femoral direita, e são estes os vasos que mais se destacam nos fenômenos da aterosclerose segundo os autores citados revelando-os, em investigação, que estes três vasos desenvolvem formação de células espumosas. O resultado nosso, no grupo G3 (gema 20 ml) revelou o espessamento de endotélio que se destaca mais na aorta e femoral conforme o gráfico 9.

Nesta análise e em concordância a American Heart Association (AHA) sobre as lesões ateroscleróticas que são classificadas pela sua fisiopatologia em tipo I até VI, em nossos estudos, evidenciaram-se lesões intermediárias, que de acordo com AHA representa a fase III ou pré-ateroma.

Cada autor dos descritos acima, utiliza um tipo diferente de modelo e um tipo diferente de dieta. Não há uma padronização, os trabalhos analisados, não descrevem com precisão o modelo utilizado. Cada grupo desenvolve suas adaptações e adequações.

Por este motivo, decidimos comparar três modelos de dieta, utilizando os produtos mais descritos pelos autores que encontramos. A grande maioria dos autores compulsados administra colesterol puro dissolvido na dieta peletizada. O primeiro modelo descrito foi com gema de ovo, ANITSCHKOW (1913), mas este não se propagou. Alguns outros administraram banha, que no imaginário popular é bem pior para a saúde quando utilizada para dieta, o que em nossos resultados, não se comprovou.

Apesar da maioria dos autores optarem por um modelo mais caro, e bem prático (colesterol dissolvido em peletas), este não é o mais eficaz na produção de placas, sendo a gema mais prejudicial ao endotélio arterial do que a própria banha. Não apenas ao endotélio, senão vejamos os nossos resultados:

No caso da esteatose hepática, no grupo da gema (20 ml) foi constatada em 5 animais (71,4%). No grupo colesterol, ocorreu em 7 animais (100%).

Em todos os animais do grupo gema (G3) e do grupo colesterol (G2) observaram-se alterações no endotélio arterial (espessamento) em algum dos vasos analisados. No grupo que recebeu o dobro de gema (G5) com apenas 30 dias de experimento, já se puderam evidenciar espessamento de endotélio na aorta de dois animais, apesar deste grupo ter sido suspenso após os 30 dias, demonstrou a eficácia da dieta com gema no modelo de aterosclerose experimental. Foi interessante constatar que o grupo alimentado com 20 ml diários de banha animal (G4), não apresentou qualquer espessamento de endotélio (repetimos 3 vezes as lâminas deste grupo obtendo o mesmo resultado). Apesar de terem sido observados espessamento no mesmo número de vasos no grupo gema (G3) e no grupo colesterol (G2); na tabela 9, demonstra uma diferença discrepante na espessura endotelial do grupo gema (G3), que foi 399,4% a mais na aorta; na femoral, aumento de 398,2% e na carótida, espessamento a mais de 66,2%.

6. CONCLUSÕES

- 1- A produção de aterosclerose experimental é possível e viável utilizando-se colesterol puro 1%, 20 ml gema de galinha crua ou 20 ml de banha de porco.
- 2- A administração de 20 ml de gema crua de ovo de galinha é funcional, mais barata e mais eficaz para modelos experimentais que envolvam estudos do perfil lipídico e produção de aterosclerose experimental.
- 3- A pior dieta para estudos de indução de aterosclerose experimental é a que utiliza banha de porco.
- 4- Coelhos Albinos Nova Zelândia não suportam dietas que administrem mais de 20 ml de gema ou de banha.

REFERÊNCIAS

ALARCÓN, M.; AÑEZ, N.; CALDERÓN, L.; MATOUSEK, A. **Evaluación de la ingesta de colesterol em conejos infectados com trypanosoma Cruzi.** Kasmerra, 32:117-126, 2004.

AMARAL, D.M.; NAPPI, J.B.; COCH, M.N.; ALBERNAZ, L.F.L.; VIEIRA, M.E. **Aterosclerose experimental. Novo método do estudo para avaliação das lesões ateroscleróticas experimentais produzidas em coelhos. O uso da angiografia de contraste.** Vittalle, 4:15-25, 1989.

AMARAL, D.M.; DINIZ, S.M.; BIZZOTO, J.H.; ZENOBINI, T.C. QUADRO, R.S. **Alterações ósseas vertebrais experimentais em coelhos: efeitos da ação Isquêmica crônica sobre o osso vertebral produzida por lesões ateroscleróticas das artérias intercostais.** Vittalle, 4:53-55, 1989.

ANITSCHKOW, N.; CHALATOW, S. **Ueber expermentalle cholesterinsteatose und ihre bedeutung für die entstehung einiger pathologischer prozesse.** Centralbl. F. Allgemeine Pathologie Anatomie, 24: 1-9, 1913.

ASAI, K.; KUZUYA, M.; NAITO, M.; FUNAKI, C.; KUZUYA, F. **Efects of splenectomy on serum lipids and experimental atherosclerosis.** Angiology Journal of vascular diseases, 39:497-504, 1998.

BARGER, A.C.; BEEUWKES, R. **Rupture of coronary vaso vasorum as a trigger of acute myocardial infarction.** Am. J. Cardiol., 66:41-43, 1990.

BOCAN, T.M.A.; MUELLER, S.B.; MAZUR, M.J.; UHLENDORF, P.D.; BROWN, E.Q.; KIEFT, K.A. **The relationship between the degree of dietary induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation.** Atherosclerosis, 102:9-22, 1993.

BRUNNER, L.S.; SUDDARTH, D.S. **Tratado de enfermagem médico-cirúrgica.** 8ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CONNOR, W.W.; ROHWEDDER, J.J.; ARMSTRONG, M.L. **Relative failure of saturated fat in the diet to produce atherosclerosis in the rabbit.** American heart association, 20:658-663, 1967.

CORRÊA-CAMACHO, C.R.; DIAS-MELICIO, L. A.; SOARES, Angela M.V.C. **Aterosclerose, uma resposta inflamatória.** Arq. Ciênc. Saúde, 14:41-48, 2007.

DUQUE, F.L.V. **Aterosclerose: aterogênese e fatores de risco.** Revista de Angiologia e Cirurgia Vascular, 7:50-58, 1998.

FERNANDES, A.A.H.; NOVELLI, E.L.B.; JUNIOR, A.F. **Efeitos benéfico do própolis sobre a hipercolesterolemia experimental em coelhos.** Nutriere Rev Socied. Bras. Aliment. Nutr. 31:65-78, 2006.

FONSECA, J.G.M.; SOUSA, E.; SILVA, M.K.; FÉLIX, D.S. **Enciclopédia da saúde: Obesidade e outros distúrbios alimentares.** Rio de Janeiro: Medsi, 2002, 340 p.

FUSTER, V. **Mechanisms Leading to Myocardial Infarction: insights from studies of vascular biology.** Circulation, 90:2126-2146, 1994.

FUSTER, V. **Epidemic of cardiovascular disease and strok: the tree main challenges.** Circulation, 99:1132-1137, 1999.

GOFMAN, J.W.; JONES, H.B.; LINDGREN, F.T.; LYON, T.P.; ELLIOTT, H.A.; STRISOWER, B. **Blood lipids and human atherosclerosis .** Circulation, 2:161-178, 1950.

GREEN, C.J.; KNIGHT, J.; PRESIUS, S. **Ketamine a one and combined with diazepam and xilazine in laboratory animals: a 10-year experience.** Lab. Anim. 15:163-170, 1981.

GOTTLIEB, M.G.V.; BONARDI, G.; MORIGUCHI, E.H. **Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose.** Scientia medica, 15:203-207, 2005.

GONZÁLES-GONZÁLES, M.E.; DIAGO-SANTAMARIA, M.V.; VAQUEIRO-PUERTA, C. **Estudio comparativo de La reparación intimal de La aorta de animales jóvenes y viejos ateromatosos.** Angiologia, 57:47-60, 2005.

HACKAM, G.D.; ANAND, S.S. **Emerging risk factors for atherosclotic vascular disease: a critical review of the evidence.** JAMA, 290:932-940, 2003.

HENRY, P.D.; BENTLEY, K.I. **Suppression of atherogenesis in cholesterol-fed rabbit treated with nifedipine.** J. Clin. Invest. The American Society for Clinical Investigation, 68:1366-1369, 1981.

HERRERA, A.P.N.; SANTIAGO, G.S.; MEDEIROS, S.L.S. **Importância da fibra na nutrição de coelhos**. Ciência rural, 31:557-561, 2001.

IHARA, S.S.M.; COTRIM, F.L.S.; THOMAZ, L.; PINTO, L.E.S.A.; AURIEMO, C.C.R.; GIONOTTI, O.; SMITH, R.; MARTINEZ, T.L.R. **Coelhos alimentados com dieta rica em colesterol: modelo experimental para o estudo da aterosclerose**. Newslab, nº 27, 1998.

JALDIN, R.G.; FILHO, H.A.F.; SEQUEIRA, J.L.; YOSHIDA, W.B. **O processo aterosclerótico em artérias de coelhos submetidos a dieta suplementada com gema de ovo: modelo experimental de baixo custo**. Jornal Vascular Brasileiro, 5:247-256, 2006.

KAGAN, H.M.; RAGHAVAN, J.; HOLLANDER, W. **Changes in aortic lysyl oxidase activity in diet induced atherosclerosis in the rabbit**. American Heart Association, 1:287-291, 1981.

KARNABATIDIS, D.; KATSANOS, K.; DIAMANTOPOULOS, A.; KAGADIS, G.C.; SIABLIS, D. **Transauricular arterial or venous access for cardiovascular experimental protocols in animals**. Vasc. Interv. Radiol. 17:1803-1811, 2006.

KUYMJIAN, V.; POMARO, D.R.; IHARA, S.; PINTO, L.E.S.A.; SANTOS, A.O.; IZAR, M.C.O.; PAOLA, A.A.V.; CARVALHO, A.C.C.; FOSENCA, A.H.F. **Efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio na aterosclerose experimental**. Arq. Brasil. Cardiol. 83:9-9, 2004.

LESSA, I.; CONCEIÇÃO, J.L.; SOUZA, M.L.; OLIVEIRA, V.; CARNEIRO, J.; MELO, J.; PINHEIRO, J.; MEIRELES, F.; NETTO, J.; REIS, F.; GOUVEIA, R.; COUTO, M.; SOUZA, S.; OLIVEIRA, M.R. **Prevalência de dislipidemias em adultos da demanda laboratorial de Salvador, Brasil**. Arq. Bras. Cardiol. 69:395-400, 1997.

LIBBY, P. **Inflammation in atherosclerosis**. Nature, 420:868-872, 2002.

LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J. **Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos em coelhos**. Rev. Nutr. Campinas: 16:305-314, 2003.

LUZ, P.L.; FAVARATO, D. **Doença coronária crônica**. Arq. Bras. Cardiol. 71:5-21, 1999.

LUZ, P.L.; LAURINDO, F.R.M.; CHAGAS, A.C.P. **Endotélio & doenças cardiovasculares**. São Paulo: Atheneu, 2003, 390 p.

MANRESA, E.V.; RECEDILLA, P.H. **Estudios del Efecto del Clorhidrato de Ticlopidina sobre El Desarrollo de Lesiones Aterosclerosas**. *Angiologia*, 38:134-149, 1986.

MARTIN, J.F.; SLATER, D.N.; KSHK, Y.T.; TROWBRIDGE, E.A. **Platelet and Megakaryocyte changes in Cholesterol-induced Experimental Atherosclerosis**. *Arteriosclerosis*, 5:604-612, 1985.

MERRILL, J.M.; LEMLEY-STONE, J. **Effects of nicotinic acid on serum and tissue in rabbits**. *American heart association*, 5:617-619, 1957.

MIRASSOL, A. **Coelhos: Copyright Despertar Lusitano Bremerhaven, Alemanha**. Disponível em <http://www.vagueira.com/coelhos.html>. Acesso em: janeiro de 2008.

MURDOCK, H.R.Jr. **Anesthesia in the Rabbit**. *Fed. Proc.* 28:1510-16, 1969.

PASTERKAMP, G.; WENSING, P.J.W.; POST, M.J.; HILLEN, B.; MALI, W.P.T.M.; BORST, C. **Paradoxical arterial wall shrinkage may contribute to luminal narrowing of human atherosclerotic femoral arteries**. *Circulation*; 91:1444-1449, 1995.

PEREIRA, A.F. **Manteiga ou margarina**. Disponível em <http://www.lowcucar.com.br/ler-artigos.php?ed=4&art=405>. Acesso em: junho de 2006.

PERCÁRIO, S.; IHARA, S.; MARTINEZ, T.L.R.; FELIPPE, Jr J. **Regression of Experimental atherosclerosis in rabbits by using an antioxidant**. Vienna: International conference on critical aspects of free radical in chemistry, Biochemistry and medicine, Book of abstracts, 1:14-17, 1993, 79 p.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO. Disponível em <http://bioclin.com.br/pop/colesterol.doc>. Acesso em: janeiro de 2007.

RIBEIRO JORGE, P.A.; NEYRA, L.C.; OZAKI, R. M.; ALMEIDA, E. **Efeitos dos ácidos graxos ômega - 3 sobre o relaxamento-dependente do endotélio em coelhos hipercolesterolêmicos.** Arq. Bras. Cardiol. 69:13-18, 1997.

RIBEIRO JORGE, P.A.; NEYRA, L.C.; OZAKI, R.M.; ALMEIDA, E.; BRAGAGNOLO, N. **Efeito da berinjela sobre os lípides plasmático e a reversão da disfunção endotelial na hipercolesterolemia experimental.** Arq. Bras. Cardiol. 70:87-91, 1998.

RIBEIRO JORGE, P.A.; ALMEIDA, E.A.; OZAKI, M.R.; JORGE, M.; CARNEIRO A. **Efeitos da atorvastatina, fluvastatina, pravastatina e simvastatina sobre a função endotelial, a peroxidação lipídica e a aterosclerose aórtica em coelhos hipercolesterolêmicos.** Arq. Bras. Cardiol. 84:314-319, 2005.

RENOUD, S.; LECOMPTE, F. **Hyperlipemia in rat, rabbit and man.** Circulation research, 27:1003-1011, 1970.

ROSENFELD, M.E.; TSUKADA, T.; GOWN, A.M.; ROSS, R. **Fatty streak initiation in the Watanabe heritable hyperlipemic and comparably hipercholesterolemic fat-fed rabbits.** Arteriosclerosis, 7:9-23, 1987.

SANFORD, T.D. e COLBY, E.D. **Effect of xylazine and ketamine on blood pressure, heart rate and respiratory rate in rabbits.** Lab. Anim. Sci. 30:519-523, 1980.

SANTOS, R.D. **III Diretrizes sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia.** Arq. Bras. Cardiol. 77:1-47, 2001.

SARAIVA, R.A. **Modelo exponencial na farmacocinética dos anestésicos inalatórios.** Rev. Bras. Anesthesiol. 28:3-18, 1978.

SCHIMIDT, E.R. **Teórica da amostragem - bioestatística.** Disponível em <http://www.ceunes.ufes.br/downloads/2/edilsonshmildt-AMOSTRAGEM.pdf>. Acesso em: fevereiro de 2007.

SMITH, S.M.; PEREIRA, R.A.N.V. **House rabbit society.** Disponível em <http://www.rabbit.org/faq/sections/treat.html>; acesso em: janeiro de 2008.

STAHLKE Jr, H.J.; FRANÇA, L.H.G.; STAHLKE, P.H.; STAHLKE P.S. **Hiper-homocisteinemia causando aterogênese na aorta de coelhos: modelo experimental.** J. vasc. 3:20-30, 2004.

STARY, H.C. **Composition and classification of human atherosclerotic lesions.** Virchows Arch. A Pathol. Anat.Histopathol. 421:277-90, 1992.

Stary, H. C. **Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary of children and young adults.** Arteriosclerosis, 1:1-32, 1989.

STARY, H.C.; CHANDLER, A.B.; DINSMORE, R.; FUSTER, V.; GLAGOV, S.; INSULL, W.J.; ROSENFELD, M.E.; SCHWALTZ, C.J.; WAGNER, W.D.; WISSLER, R.W. **Definition of advanced types of atherosclerotic lesions and histological classification of atherosclerosis.** Circulation, 92:1355-1374, 1995.

STARY, H.C.; CHANDLER, A.B.; GLAGOV, S.; GUYTON, J.R.; INSULL Jr, W.; ROSENFELD, M.E.; SCHAFFER, A.S.; SCHWARTZ, C.J.; WAGNER, W.D.; WISSLER, R.W. **A definition of initial, fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Comittee on Vascular Lesions of the Council of Arteriosclerosis.** Circulation, 89:2462-2478, 1996.

STEBBENS, W.E. **An appraisal of cholesterol feeding in experimental atherogenesis.** Prog. Cardivasc. Dis. 29:107-128, 1986.

TABELA DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ALIMENTOS.
Disponível em <http://www.unifesp.com.br/dis/servicos/nutri>. Acesso em: janeiro de 2007.

TELOKEN, C.; DAMBROS, M.; BONHENBERGER, D.; FILHA, M.R.; CONTI, R.; SOUTO, C.A.V. **Hypercholesterolemia in rabbit induces increase in thickness of the penile tunica albuginea.** Braz. J. Urol. 26:535-540, 2000.

VALIENTE, M.A.A.; CARRALERO, G. A.; PENA, A.Q.; CARBALLO, R.S. **Evaluación de um posible modelo experimental de aterosclerosis carotídea em conejos hipercolesterolémicos.** Rev. Cubana Invest. Biomed. 20:192-196, 2001.

WAKASUGI, T.; MABUCHI, H.; SAKAI, T.; YOSHIMURA, A.; WATANABE, A.; KOIZUMI, J.; MIYAMOTO, S.; TAKEDA, R.; WATANABE, Y. **Apo VLDL of the watanabe heritable hiperlipidemic rabbit and the cholesterol-fed rabbit.** Journal of lipid. research, 25:246-253, 1984.

WU, H.; MOULTON, K.S.; GLASS, C.K. **Macrophage scavenger receptors and atherosclerosis.** Trends. Cardiovasc. Med. 2:220-225. 1992.

ZAGO, M. A.; PINTO, A.C.S. **Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos.** Rev. Bras. Hematol. 29: 207-214, 2007.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: Informação e documentação – Trabalhos acadêmicos – apresentação. Rio de Janeiro, 2005.

_____. **NBR 6029**: Informação e documentação: livros e folhetos: apresentação. Rio de Janeiro, 2006.

BARONE, R.; PAVAU, C. ; BLIN, P.C.; CUQ, P. **Atlas D` Anatomie du lapin, Atlas of rabbit anatomy**. Paris: Masson & Cie, editeurs, 1973.

BASMAJIAN, J.V., **Anatomia de Grant**. São Paulo: Manole, 1993.

FERREIRA, A.B.H. **Mini Aurélio: Dicionário da Língua Portuguesa**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Positivo, 2006.

GUYTON, A.C. **Fisiologia humana**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 564 p.

HOEL, P.G. **Estatística elementar**. Rio de Janeiro: Editora Atlas, 1989.

SOBOTTA, J.B. **Atlas de Anatomia humana**. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1996.

APÊNDICES

ESTUDO DA ATEROSCLEROSE INDUZIDA POR DIFERENTES TIPOS DE DIETA HIPERLIPÍDICA EM COELHOS ALBINOS (NOVA ZELÂNDIA)

FICHA DE CONTROLE DO GRUPO

Grupo ____ **Dieta de** ____ **g de** _____

Data: __ / __ / _____ **Hora:** ____ : ____

Relato sobre o Grupo / Aspecto Geral:

Descrição do Procedimento de Coleta de Sangue para Análise Laboratorial:

RESULTADO DOS EXAMES				
Animais	Colesterol Total	Colesterol LDL	Colesterol HDL	Triglicerídeos
V. de Referência				
Coelho 1				
Coelho 2				
Coelho 3				
Coelho 4				
Coelho 5				
Coelho 6				
Coelho 7				

Observações / Dificuldades:

Responsável pelo preenchimento.: _____

**ESTUDO DA ATEROSCLEROSE INDUZIDA POR DIFERENTES TIPOS DE
DIETA HIPERLIPÍDICA EM COELHOS ALBINOS (NOVA ZELÂNDIA)**

FICHA DE CONTROLE INDIVIDUAL

Grupo _____ Animais Dieta de _____ g de _____

Avaliação dos Animais para Submissão na Pesquisa:

Coelho _____, Gaiola _____, Data de admissão ____/____/____, _____ Hora ____:____,
Peso do Coelho(g) : _____ Programação da ração – *ad libidum*

Aspecto Geral:

1ª. Tomada:

Peso do Coelho (g) : _____

Hora: Início ____:____ Término ____:____ Duração ____:____

Troca de água sim () não () Limpeza da gaiola sim () não ()

Nível de aceitação da dieta:

ótimo (), bom (), regular (), aceita c/ dificuldade (), aceita c/ muita dificuldade ()

não aceitou () _____

observações gerais :

2ª. Tomada:

Hora: Início ____:____ Término ____:____ Duração ____:____

Nível de aceitação da dieta:

ótimo (), bom (), regular (), aceita c/ dificuldade (), aceita c/ muita dificuldade ()

não aceitou () _____

observações gerais :

Responsável pelo preenchimento.: _____

**ESTUDO DA ATEROSCLEROSE INDUZIDA POR DIFERENTES TIPOS DE
DIETA HIPERLIPÍDICA EM COELHOS ALBINOS (NOVA ZELÂNDIA)**

FICHA DE CONTROLE INDIVIDUAL

Grupo _____ Animais Dieta de _____ g de _____

1ª. Tomada:

Peso do Coelho (g) : _____ Peso de Ração Ingerida (g): _____

Coelho _____, Gaiola _____, Dia: _____ Data ____/____/____, _____

Hora: Início ____:____ Término ____:____ Duração ____:____

Troca de água sim () não () Limpeza da gaiola sim () não ()

Nível de aceitação da dieta:

ótimo(), bom(), regular(), aceita c/ dificuldade(), aceita c/ muita dificuldade()

não aceitou () _____

Aspecto Geral / Observações:

2ª. Tomada:

Hora: Início ____:____ Término ____:____ Duração ____:____

Nível de aceitação da dieta:

ótimo(), bom(), regular(), aceita c/ dificuldade(), aceita c/ muita dificuldade()

não aceitou () _____

Aspecto Geral / Observações:

Responsável pelo preenchimento: _____

**ESTUDO DA ATEROSCLEROSE INDUZIDA POR DIFERENTES TIPOS DE
DIETA HIPERLIPÍDICA EM COELHOS ALBINOS (NOVA ZELÂNDIA)**

FICHA DE CONTROLE INDIVIDUAL

Grupo ____ **Coelho** ____ **Gaiola:** ____ **Data:** ____ / ____ / ____ **Hora:** ____ : ____

Necropsia

Descrição do Procedimento:

Achados:

Conclusão:

Observações:

Responsável pelo preenchimento.: _____

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Maceió – AL, 02/01/2007

Senhor (a) Pesquisador (a), Célio Fernando de Sousa Rodrigues
José André Bernardino dos Santos

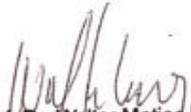
O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), reunido em 19/12/2006 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº **013685/2006-07** sob o título **Estudo da aterosclerose induzida por diferentes tipos de dieta hiperlipídica em coelhos albinos (*Oryctolagus Cuniculus*)**, de sua autoria, vem por meio deste instrumento comunicar sua aprovação com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

Outrossim, recomendamos a observância do que consta na folha de rosto com respeito ao cumprimento dos prazos para entrega de relatórios, bem como o atendimento da referida Resolução da CONEP/CNS, quando for o caso (*). Esses relatórios devem ser entregues trimestralmente ou ao término da pesquisa.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra referidas.

(*) Áreas temáticas especiais




Prof. Dr. Walter Matias Lima
Coordenador do CEP/UFAL



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

LAUDO DE ANÁLISE Nº: CQ 4777/2008

MATERIAL: **Ovos Frescos - Marca Carmaúba - Data da Embalagem 18ABR2008 - Embalagem com 12 ovos**

INTERESSADO: **JOSÉ ANDRÉ BERNARDINO DOS SANTOS**

ENDEREÇO: **R. Alvorada, 822 - Maceió - AL**

DATA DA ENTRADA DA AMOSTRA: **22/04/2008**

DATA DA EMISSÃO DO LAUDO: **20/05/2008**

NATUREZA(S) DA(S) ANÁLISE(S): **FÍSICO-QUÍMICA**

RESPONSÁVEL(ais): **A. M. R. O. Miguel, E. Vicente, R. A. Ferrari, S. R. Baggio**

1. METODOLOGIAS

Lípidios totais

HORWITZ, W. (Ed.) Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2000. v. 2, cap. 34, met. 925.32, p. 2. (MA-CQ.022)

Composição em ácidos graxos

FIRESTONE, D. (Ed.). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 5th Ed. Champaign: AOCS. 2005/2006. met. Ce 1e-91, Ce 1f-96, Ce 1-62. (MA-CQ.091)

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Lab. Practice, v. 22, n. 8, p. 475-476, 1973. (MA-CQ.091)

Food Standards Agency. Mc Cance and Widdowson's The Composition of Foods, Sixth Summary Edition. Cambridge:2002, Royal Society of Chemistry. 537 p. (MA-CQ.091)

HORWITZ, W. (Ed.). Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 18th Ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC. 2005. cap. 41, met. 996.06, p. 20. (MA-CQ.091)

Colesterol

MAZALLI, M.R.; SALDANHA, T.; BRAGAGNOLO, N. Determinação de colesterol em ovos: comparação entre um método enzimático e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. Revista do IAL, v. 62 n.1, p. 49-54, 2003 (MA-CQ.018)

SCHMARR, H.; GROSS, H. B.; SHIBAMOTO, T. Analysis of polar cholesterol oxidation products: evaluation of a new method involving transesterification, solid phase extraction, and gas chromatography. J. Agric. Food Chem. 44, p. 512-517, 1996. (MA-CQ.018)

2. RESULTADOS

DETERMINAÇÕES	RESULTADOS
Lípidios totais (g/100g)	28,7 (0,3) *
Colesterol (mg/100g)	997,5 (30,1) *
Ácidos Graxos (g/100g)	
Saturados	8,53
Monoinsaturados	10,84
Polinsaturados	4,19
Ômega 3	0,17
Ômega 6	4,02



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Trans-isômeros totais
N.I.

0,02
0,23

Composição em ácidos graxos		% da Área	(g/100g)**
C14:0	mirístico	0,3	0,07
C16:0	palmitico	25,2	6,00
N.I.		0,2	0,05
C16:1 ômega 7	palmitoléico	2,6	0,62
C17:0	margarico	0,2	0,05
N.I.		0,1	0,02
C17:1	cis-10-heptadecenóico	0,2	0,05
C18:0	esteárico	10,1	2,41
C18:1 ômega 9 trans	elaídico	0,1	0,02
C18:1 ômega 9	oléico	42,4	10,10
C18:2 ômega 6	linoléico	14,5	3,45
C20:1 ômega 11	cis-11-eicosenóico	0,3	0,07
C18:3 ômega 3	alfa linolênico	0,3	0,07
N.I.		0,1	0,02
C20:2 ômega 6	11,14 eicosadienóico	0,2	0,05
C20:3 ômega 6	8,11,14-eicosatrienóico	0,3	0,07
C20:4 ômega 6	araquidônico	1,8	0,43
N.I.		0,6	0,14
C22:6 ômega 3	cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico (DHA)	0,4	0,10
C18:3 ômega 6	gama linolênico	0,1	0,02

N.I. - Não identificado

**Média e estimativa de erro padrão.

**Área x % (tipical/100) x F de conversão (F=0,833). Limite de detecção do método = 0,01 g/100g.

3. COMENTÁRIOS

7 ovos foram cozidos por 10 minutos e pesados. As gemas foram separadas e homogeneizadas. Aliquotas convenientes foram tomadas para análise de colesterol. As demais análises foram realizadas no restante das gemas cruas homogeneizadas.

4. OBSERVAÇÕES

4.1 - Os resultados desta(s) análise(s) têm validade somente para a(s) amostra(s) analisada(s), sendo vedada a publicação, sob pena de indenização, na qual o nome do ITAL seja utilizado para qualificar produção sobre a qual o mesmo não exerceu qualquer meio de controle.

4.2 - Este relatório somente poderá ser reproduzido na íntegra. A reprodução parcial requer aprovação formal deste laboratório.

Visto

EDUARDO VICENTE
Diretor Técnico de Serviços
Unidade Laboratorial de Referência
em Química de Alimentos

Sueli Regina Baggio
Pesquisador Científico
Centro de Química de Alimentos 2/2

