



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO NA REDE NORDESTE DE
BIOTECNOLOGIA RENORBIO**

PAULO ROBERTO DA SILVA LIMA

**ESTUDO COMPARATIVO DA HIPERPLASIA MIOINTIMAL PÓS-ANGIOPLASTIA
NA ARTÉRIA ILÍACA EXTERNA DE COELHOS, COM ATEROSCLEROSE
INDUZIDA, TRATADOS COM *ALLIUM SATIVUM* E CILOSTAZOL**

Maceió

2015

PAULO ROBERTO DA SILVA LIMA

ESTUDO COMPARATIVO DA HIPERPLASIA MIOINTIMAL PÓS-ANGIOPLASTIA
NA ARTÉRIA ILÍACA EXTERNA DE COELHOS, COM ATEROSCLEROSE
INDUZIDA, TRATADOS COM *ALLIUM SATIVUM* E CILOSTAZOL

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação da
RENORBIO da Universidade Federal de
Alagoas, como requisito para obtenção do
grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Benjamin
Brandão Pitta

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Andressa Feitosa
Bezerra de Oliveira

Maceió
2015

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Maria Helena Mendes Lessa

- L732e Lima, Paulo Roberto da Silva.
Estudo comparativo da hiperplasia miointimal pós-angioplastia na artéria ilíaca externa de coelhos, com aterosclerose induzida, tratados com *Allium sativum* e cilostazol / Paulo Roberto da Silva Lima. – Maceió, 2015.
144 f. : il. Tabs.
- Orientador: Guilherme Benjamin Brandão Pitta.
Coorientadora: Andressa Feitosa Bezerra de Oliveira.
Tese (Doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2015.
- Bibliografia. f. 91-98.
Anexos: f. 99-144.
1. Hiperplasia. 2. Coelhos. 3. *Allium sativum*. 4. Microscopia. 5. Túnica íntima. 6. Coelho. Título.

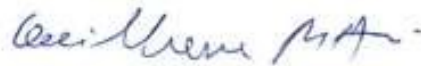
PAULO ROBERTO DA SILVA LIMA

Estudo comparativo da hiperplasia miointimal pós-angioplastia na artéria iliaca externa de coelhos com aterosclerose induzida tratados com *Allium sativum* e Ciliostazol

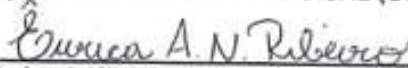
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 29/05/2015.

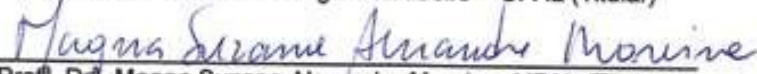
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Guilherme Benjamin Brandão Pitta – UNCISAL (Orientador/Presidente)



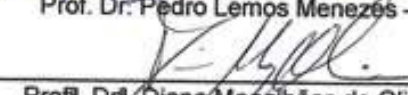
Prof.^a. Dr.^a. Érica Adélia Nogueira Ribeiro – UFAL (Titular)



Prof.^a. Dr.^a. Magna Suzana Alexandre Moreira – UFAL (Titular)



Prof. Dr. Pedro Lemos Menezes – UNCISAL (Titular)



Prof.^a. Dr.^a. Diana Magalhães de Oliveira – UECE (Titular)



Prof.^a. Dr.^a. Luciana Aparecida Cora – UNCISAL (Suplente)

Dedico esse doutorado ao Nosso Deus Pai e a Sagrada Família por terem me dado forças, saúde mental e física, além de perseverança para superar os muitos obstáculos, que surgiram, e por terem me protegido e aos meus colegas durante nossas viagens em busca do conhecimento. E, também, por não ter deixado faltar o pão de cada dia à minha família. Peço a Deus que continue me iluminando e aumentando minha fé e que o conhecimento por mim adquirido sirva à ciência e à população.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, especialmente, à minha esposa, LIANA DAISE DE OLIVEIRA SILVA LIMA, pela paciência, compreensão, dedicação e força dela para com ela mesma e para comigo. Essa vitória é nossa.

À minha filha, ANA VITÓRIA DA SILVA LIMA, meu muito obrigado por sua existência, pois fiz esse esforço para poder oferecer-lhe o melhor e servi-lhe de exemplo para que sempre busque o saber. E isso Você vem sempre me orgulhando.

Aos meus pais, FERNANDO PONTES DE LIMA (*in memoriam*) e NATIVA JORGE DA SILVA LIMA, por estarem sempre ao meu lado, dando apoio e força nessa árdua busca do saber. Graças ao bom Deus, os conhecimentos até agora obtidos me ajudaram a salvar a vida da minha mãe e pude abrandar a patologia do meu pai no momento de sua partida recente.

Ao meu irmão, FERNANDO CARLOS DA SILVA LIMA, pela ajuda e apoio nessa minha caminhada científica.

Ao meu sogro, LUIZ GOMES DA SILVA e sogra ROSA MARIA DE OLIVEIRA SILVA, pela paciência, ajuda e compreensão.

Às minhas tias, professora, MARIA EMÍLIA PONTES DE LIMA e ANTONIETA PONTES DE LIMA (*in memoriam*), pelo apoio desde os meus primeiros anos de estudo ao pagarem as mensalidades dos colégios particulares onde estudei.

Ao meu amigo, Professor, Mestre, FRANCISCO CHAVIER VIEIRA BANDEIRA, meu muito obrigado por ser além de colega de doutorado e de turma, nas carteiras do RENORBIO, também companheiro nas viagens para cumprir os créditos e por ter me incentivado desde meus estágios, como estudante no Hospital Santa Isabel, até a conquista deste título de doutor.

Ao Professor, Doutor, GUILHERME BENJAMIN BRANDÃO PITTA, por ter sido meu orientador, pelo seu excelente trabalho de ensinar e de nunca parar com esse ideal tão bonito e sofredor nesse país, que não dar o devido valor à educação. Mas, o senhor nunca se entregou, sempre se manteve firme como uma rocha para os problemas, que surgiram, mantendo viva a chama do saber.

Ao Professor, Mestre, ALDEMAR ARAÚJO CASTRO, pela transmissão dos conhecimentos de informática, estatística e metodologia científica. Além da amizade

cultivada e incentivos.

Ao médico patologista, GUILHERME COSTA GUEDES PEREIRA, pelo auxílio e avaliação histológica da pesquisa e por sua amizade desde os tempos do Segundo Grau no Colégio 2001 e depois na UFPB.

À Professora, Doutora, Pós-doutora, ANDRESSA FEITOSA BEZERRA DE OLIVEIRA, pelo apoio, abertura das portas da UFPB e ajuda como coorientadora nessa tese.

Ao Professor, Mestre, JOSVALDO RODRIGUES ATAÍDE (*in memoriam*), pela sua amizade e pelos ensinamentos na minha primeira pesquisa no CNPq-PIBIC, realizada durante minha graduação em medicina na Universidade Federal da Paraíba.

À Professora, Doutora, SELMA FEITOSA VENTURA, pelos ensinamentos, apoio e amizade na monitoria de histologia e também na pesquisa no CNPq-PIBIC.

Aos amigos: Professor, Mestre, MANOEL RICARDO SENA NOGUEIRA; Professor, Mestre, JÂNIO CIPRIANO ROLIM, e ao médico, MIZAEL ARMANDO ABRANTES PORDEUS, pela amizade e ajuda na realização da pesquisa, no famoso grupo moringa.

Ao instrumentador, SORISMAR CAVALCANTI MENEZES, que nos ajudou nas cirurgias dos animais e até dando dicas. Meu muito obrigado.

A, JOSÉ CRISPIM DUARTE, responsável pelo biotério do LTF – UFPB, pelo seu apoio e orientações nos manejos dos animais.

A, JOSÉ VIEIRA, por ter cuidado tão bem de nossos animais, ao ponto de ficar triste com a eutanásia dos mesmos.

Aos meus amigos da pós-graduação pela amizade e troca de conhecimentos.

RESUMO

A hiperplasia intimal está relacionada à falha de enxertos e suturas vasculares no primeiro ano pós-cirurgia e nas reestenoses pós-angioplastia. O *Allium sativum* (alho comum) reduz o colesterol e tem efeito antioxidante, antiplaquetário e antitumoral; logo havia grande possibilidade de reduzir ou inibir a hiperplasia da íntima das artérias, a qual sua inibição vem sendo tentada com o Cilostazol e outros tratamentos. Sendo assim é relevante responder a pergunta de pesquisa: qual a diferença de média de hiperplasia miointimal pós-angioplastia na artéria ilíaca de coelhos tratados com *Allium sativum* comparada aos tratados com Cilostazol? O objetivo é determinar a diferença de média de hiperplasia miointimal pós-angioplastia na artéria ilíaca externa de coelhos com aterosclerose induzida e tratados com *Allium sativum* comparada aos tratados com Cilostazol. O estudo foi um ensaio pré-clínico aleatório em animais de experimentação por 35 dias. Os animais foram coelhos fêmeas (*Oryctolagus cuniculus*), da linhagem Nova Zelândia, submetidos à dieta aterosclerótica e à angioplastia da artéria ilíaca externa direita. Os animais foram divididos em: Grupo A (n=10) coelhos tratados com a *Allium sativum* (800 µg/kg/dia), em doses diárias, por via oral. Grupo C (n=10): coelhos tratados com Cilostazol em doses diárias de 50 mg/dia, por via oral. Grupo S (n= 10) coelhos tratados com 10 mL de soro fisiológico 0,9%, por via oral, que foi nosso controle negativo. A variável primária foi a diferença de frequência da média de hiperplasia miointimal. Variáveis secundárias: a média de espessura da placa na parede arterial. Dados complementares: a frequência isquemia do membro, a frequência de perda do membro, a frequência de hematoma ou equimose, a frequência de infecção, a frequência de sangramento, a frequência de morte do animal e a média dos níveis lipídicos. O tamanho da amostra foi arbitrado em 30 coelhos. A análise estatística foi realizada com o teste ANOVA, Qui-quadrado e Tukey. Foi calculado o intervalo de confiança de 95% para cada ponto estimado. Os resultados foram: grupo S teve um índice médio de hiperplasia de 35,74% IC de 95% (31,76% a 39,71%); grupo C teve um índice médio de hiperplasia de 16,21% IC de 95% (13,36% a 19,05%); grupo A teve um índice médio de hiperplasia de 21,12% IC de 95% (17,26% a 25,01%); com $P < 0,0001$. Sendo assim, o *Allium sativum* tem a mesma eficácia na inibição da hiperplasia miointimal comparada aos tratados com Cilostazol.

Palavras chave: Hiperplasia. Coelhos. *Allium sativum*. Microscopia. Túnica íntima. Alho.

ABSTRACT

Intimal hyperplasia is associated with graft failure and vascular sutures in the first year after surgery and in postangioplasty restenosis. *Allium sativum* (common garlic) lowers cholesterol and has antioxidant effects; it also has antiplatelet and antitumor properties and, therefore, has great potential to reduce or inhibit intimal hyperplasia of the arteries. Attempts have been made to inhibit intimal hyperplasia of the arteries with cilostazol and other drugs. Therefore, it is important to address the following research question: what is the difference between the mean of postangioplasty myointimal thickening in the iliac artery of rabbits treated with *A. sativum* and that treated with cilostazol? Our objective is to determine the mean difference of postangioplasty myointimal hyperplasia in the external iliac artery of rabbits with induced atherosclerosis, and compare the outcome between treatment with *A. sativum* and treatment with cilostazol. This is a randomized preclinical trial study conducted in experimental animals. We used female New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), submitted to an atherosclerotic diet and angioplasty of the external iliac artery. The animals were divided into the following groups (n = 10 each) according to treatment: group A, *A. sativum*, 800 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$, orally; group C, cilostazol, 50 mg/day, orally; group S, 10 mL of 0.9% physiological saline solution, orally. Our primary variable is the difference of the mean myointimal hyperplasia. The secondary variable is the mean plate thickness of the arterial wall. Complementary data include frequency of limb ischemia, limb loss frequency, frequency of hematoma or bruising, frequency of infection, frequency of bleeding, frequency of animal death, and mean of lipid levels. The sample size was arbitrated in 30 rabbits. Statistical analysis was performed by using ANOVA and Tukey tests, as well as the χ^2 test. We calculated the 95% confidence interval (CI) for each point estimate, and the P value was set as < 0.05 . Group S had a mean hyperplasia rate of 35.74% (95% CI, 31.76–39.71%); group C, 16.21% (95% CI, 13.36–19.05%); and group A, 21.12% (95% CI, 17.26–25.01%); $P < 0.0001$. In conclusion the *Allium sativum* quite as effective in inhibiting myointimal hyperplasia compared with those treated with cilostazol.

Keywords: Hyperplasia. Rabbits. *Allium sativum*. Microscopy. Intima layer. Garlic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento da pesquisa (A) e (B).....	38
Figura 2 – Cálculo do índice de hiperplasia miointimal.....	43
Figura 3 – Técnica de Mandarin-de-Lacerda.....	44
Figura 4 – Fotos histológicas das artérias ilíacas externas direitas individuais de cada grupo. Coloração HE. Cortes transversais. Objetiva 2,5x.....	50
Figura 5 – Média do índice de hiperplasia miointimal Figura 6 – Teste de Tukey da hiperplasia miointimal.....	53
Figura 7 – Hiperplasia da íntima isolada.....	54
Figura 8 – Calcificações na camada média.....	55
Figura 9 – Calcificações na camada média (externamente).....	56
Figura 10 – Média da área do marcador HHF35 monoclonal.....	57
Figura 11 – Microfotografias individuais das artérias ilíacas externas dos coelhos em corte transversal. Marcador HHF35 monoclonal. Objetiva 40x.....	58
Figura 12 – Média da área do marcador C4d policlonal.....	59
Figura 13 – Microfotografias individuais das artérias ilíacas externas dos coelhos em corte transversal. Marcador C4d policlonal. Objetiva 40x.....	60
Figura 14 – Hiperplasia sem inflamação ativa na íntima.....	61
Figura 15 – Hiperplasia com inflamação ativa na íntima.....	62
Figura 16 – Hiperplasia com invasão muscular na íntima (A).....	63
Figura 17 – Hiperplasia com invasão muscular na íntima (B).....	64

Figura 18 – Substituição do tecido muscular por cálcio (áreas azuladas indicadas pelas setas azuis).....	65
Figura 19 – Hiperplasia sem invasão muscular na íntima.....	66
Figura 20 – Estatística da média de colesterol total entre os grupos.....	67
Figura 21 – Estatística da média do HDL entre os grupos.....	68
Figura 22 – Estatística da média do LDL entre os grupos.....	69
Figura 23 – Estatística da média do VLDL entre os grupos.....	70
Figura 24 – Estatística da média do triglicerídeos entre os grupos.....	71
Figura 25 – Estatística da média do peso dos coelhos entre os grupos.....	73
Figura 26 – Estatística da frequência de esteatose hepática.....	74
Figura 27 – Estatística de frequência de colangite nos animais.....	75
Figura 28 – Estatística da frequência de infiltrado portal nos animais.....	76
Figura 29 – Fígado normal.....	77
Figura 30 – Esteatose hepática.....	78
Figura 31 – Infiltrado portal e colangite (A).....	79
Figura 32 – Infiltrado portal e colangite (B).....	80
Figura 33 – Infiltrado portal.....	81
Figura 34 – Isolamento da camada íntima impossibilitado – Fibras elásticas em preto.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados individuais do cálculo do índice de hiperplasia miointimal.....	51
Tabela 2 – Valores absolutos de colesterol total (mg/dL).....	67
Tabela 3 – Valores absolutos do HDL.....	68
Tabela 4 – Valores absolutos do LDL.....	69
Tabela 5 – Valores absolutos do VLDL.....	70
Tabela 6 – Valores absolutos do triglicérides.....	71
Tabela 7 – Complicações pós-cirúrgicas.....	72
Tabela 8 – Infecção.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido Acetil Salicílico
AIEd	Artéria Iliaca Externa Direita
AL	Alagoas
Atm	Atmosfera (unidade de pressão) é a unidade reconhecida mas não recomendada, por não pertencer ao Sistema Internacional de Unidades (SI). O SI recomenda o uso da unidade de pressão pascal (símbolo Pa)
APC	Apoio a Patologia Cirúrgica é uma laboratório de histologia
AVC	Acidente Vascular Cerebral
Bfgf	Factor de Crescimento Fibroblástico básico (bFGF)
BIREME	Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde
CA	Califórnia
CEA	Endarterectomia carotídea
CETP	Proteína de Transferência do Ester de Colesterol
d ⁻¹	por dia (/dia)
DS	Percentual de estenose do diâmetro
et al.	E colaboradores (do latim, <i>et alli</i>)
EPCs	Células Endoteliais Circulantes Progenitoras
Gy	Gray (unidade de radiação)

H1	Hipótese alternativa
H0	Hipótese de nulidade
http://	Protocolo de Transferência em HiperTexto (do inglês, <i>HyperText Transfer Protocol</i>)
HDL	Lipoproteína de alta Densidade
HE	Coloração Hematoxilina-eosina
haECs	células endoteliais arteriais humanos (haECs)
haSMCs	células musculares lisas arteriais de humanos
IC	Intervalo de confiança
IC50	Concentração de um composto necessária para reduzir o crescimento populacional de organismos, incluindo células eucarióticas, em 50 %, <i>in vitro</i>
Inc	corporação (do inglês, <i>Incorporation</i> ou <i>incorporated</i>)
kD	Quilodaltons (unidade de massa)
kg ⁻¹	Corresponde a: por kg de peso (/kg)
kg/m ²	Quilograma por metro quadrado (massa por área)
LDL	Proteína de Baixa Densidade
LEE	Laboratório de Epidemiologia e Estatística
LPS	Lipopolissacarídeos
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacéutica
mg/d	Miligramas por dia (massa por tempo)

$\mu\text{g/g}$	Micrograma por grama (massa por peso)
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro (massa por volume)
$\mu\text{g/m}^2$	Micrograma por metro quadrado (massa por área)
mm^3/mm	Milímetros cúbicos por milímetros (volume por área)
μm	Micrômetro (unidade de comprimento)
mmol/L	Milimol por litro (concentração por volume)
$\mu\text{mol/L}$	Micromol por litro (concentração por volume)
MCP-1	Proteína 1 de monócitos quimioatrativos
MLEI	Membrana limitante elástica interna
MMP-9	Metaloproteinase da Matriz 9
MP	Mega Pixel (unidade de área)
nmol/L	Nanomol por litro (concentração por volume)
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds Ratio
OS	Sistema Operacional (do inglês, <i>Operational System</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Factor de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF)
PPARs	Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)
PPG	Programa de Pós-Graduação
PRU	Unidades de Reação P2Y12

PTCA	Angioplastia Transluminal Percutânea		
PVPI	Iodopovidona		
RENORBIO	Rede Nordeste de Biotecnologia		
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro RR	Risco Relativo	
SdLDL	Colesterol LDL de baixa densidade		
SBTx	Transplante de intestino delgado SMC	Células Musculares Lisas	
TUNEL	<i>terminal Transferase dUTP-biotin</i>	<i>Nick-End</i>	<i>Labeling</i>
	(Transferaseterminal dUTP-biotina pescoço-terminal marcada)		
UFAL	Universidade Federal de Alagoas		
UNCISAL	Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas		
URL	Localizador Uniforme de Recursos (do inglês, <i>Uniform Resource Locator</i>)		
UV	Radiação Ultravioleta		
Vs	versus		
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade WA	Washington	
WHHL	Watanable Heretable HyperLipidemic		
www	Rede Mundial de Computadores (do inglês, <i>World Wide Web</i>)		

LISTA DE SÍMBOLOS

- ® Marca registrada
- “ Polegadas, unidade de metragem
- ∞ Símbolo matemático de infinito

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Hipótese	21
1.2	Objetivos	21
1.2.1	Objetivos gerais.....	21
1.2.2	Objetivos específicos.....	21
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	Allium sativum	22
2.2	Cilostazol	24
2.3	Hiperplasia	26
2.4	Modelos animais de aterosclerose e angioplastia	28
2.5	Imunomarcadores	30
2.6	Tratamentos diversos	32
3	MÉTODOS	36
3.1	Tipo de estudo	36
3.2	Local	36
3.3	Amostra	36
3.4	Procedimentos	37
3.5	Variáveis	45

3.5.1	Variável primária.....	45
3.5.2	Variáveis secundárias.....	46
3.5.3	Dados complementares.....	47
3.6	Método estatístico.....	47
3.6.1	Cálculo do tamanho da amostra.....	47
3.6.2	Análise estatística.....	48
3.6.2.1	Variável primária analisada.....	48
3.6.2.2	Hipóteses estatísticas.....	48
3.6.2.3	Testes estatísticos.....	49
3.6.2.4	Valor de Alfa.....	49
3.6.2.5	Apresentação dos resultados.....	49
4	RESULTADOS.....	50
4.1	Caracterização da amostra.....	50
4.1.1	Variáveis.....	50
4.1.2	Variável primária.....	50
4.1.3	Variáveis secundárias.....	56
4.1.4	Dados Complementares.....	71
5	DISCUSSÃO.....	83
6	CONCLUSÃO.....	90
	REFERÊNCIAS.....	91

ANEXOS.....	99
ANEXO A – Comprovante comitê de ética LTF-UFPB.....	100
ANEXO B – Comprovante comitê de ética UNCISAL.....	101
ANEXO C – Protocolo Colesterol total.....	102
ANEXO D – Protocolo HDL.....	106
ANEXO E – Protocolo triglicreídeos.....	110
ANEXO F – Tabela de dados individuais da esteroscopia C4d policlonal.....	114
ANEXO G – Tabela de dados individuais da esteroscopia HHF35.....	115
ANEXO H – Patente depositada e liberada.....	116
ANEXO I – Protocolo HHF35 monoclonal.....	125
ANEXO J – Protocolo C4d policlonal.....	127
ANEXO K – Artigo original em Inglês.....	128

1 INTRODUÇÃO

A hiperplasia da íntima é a resposta universal dos vasos a uma lesão descrita como uma alteração estrutural crônica, que ocorre nas artérias desnudas, nas veias arterializadas e nas anastomoses das próteses, utilizadas como enxertos para *bypass* (desvios vasculares utilizando veias ou material protético) (DAVIES, 2007); também pode ser definida como a migração anormal e a proliferação de células musculares lisas vasculares com a deposição associada da matriz de tecido conjuntivo extracelular, que é acompanhada a seguir por remodelagem desse novo tecido (DAVIES, 2007; GIMBRONE JR, 1995; LIBBY, 2006; STERPETTI et al., 1996).

Tem sido reconhecida como complicação das reconstruções arteriais desde 1906 (PEREIRA, A. H.; PEREIRA, A. A.; COSTA, 2008). A histopatologia da hiperplasia da íntima apresenta muitos dos elementos característicos das feridas, ou seja, processos inflamatórios (DAVIES, 2007; ROSS, 1999; STERPETTI et al., 1996).

As intervenções endoluminais, como angioplastias e stents, e os subsequentes relatos de altas taxas de re-estenoses (um milhão de pacientes com reestenoses em um ano pós-angioplastia coronariana) ampliam o reconhecimento do significado da hiperplasia da íntima no atual ambiente intervencionista (LIBBY; TANAKA, 1997).

Sendo assim, há uma grande necessidade de desenvolver ou descobrir meios de evitar ou reverter a hiperplasia da íntima. Mas, a hiperplasia miointimal é reversível apenas na primeira e segunda semanas após o trauma vascular (LI; BROOKS, 1999) e depende do grau e duração da lesão que a provocou (PEREIRA, A. H.; PEREIRA, A. A.; COSTA, 2008).

O tratamento medicamentoso até o momento é desanimador (BLEDSOE et al., 2005; COSTA; FAGUNDES, 2002; DOUGLAS; WEINTRAUB; HOLMES, 2003; LANDYMORE; MACAULAY; MANKU, 1990). O ácido acetilsalicílico (AAS) foi a primeira droga testada no controle da hiperplasia da íntima, sua ação se restringe à inibição da agregação plaquetária, pela acetilação de um resíduo de serina no sítio ativo da cicloxigenase, impedindo assim a formação de tromboxina (LANDYMORE; MACAULAY; MANKU, 1990; MCCANN; HANGEN; FUCHS, 1980). A heparina inibe a proliferação e migração das células musculares lisas, mas os resultados em

seres humanos são conflitantes e poucos práticos (HIRSCH; KARNOVSKY, 1991; KOHLER; KIRKMAN; CLOWES, 1989). A radiação ionizante é eficaz em reduzir a hiperplasia da íntima, mas carece de efeito prático (COSTA; FAGUNDES, 2002; DUCASSE et al., 2006; WAKSMAN et al., 1997). As medidas mais eficazes a serem tomadas no pré e pós operatório relacionam-se ao controle da dislipidemia e abolição do tabagismo, haja vista que nos pacientes fumantes e/ou dislipidêmicos não controlados, a hiperplasia da íntima nos enxertos e após angioplastia e implante de stents, é muito mais acentuada (AMELI et al., 1989; COX; CHIASSON; GOTLIEB, 1991; STERPETTI et al., 1996).

O clopidogrel é uma tienopiridina que inibe, seletivamente, a agregação plaquetária induzida pelo ADP (adenosina difosfato) sem nenhum efeito direto sobre o metabolismo do ácido araquidônico; esta droga demonstrou, em experimento animal, que é capaz de reduzir a hiperplasia intimal (CORTELEKOGLU et al., 2006; MIN et al., 2007), já no trabalho de Bledsoe em 2005 (BLEDSOE et al., 2005) não comprovou.

Paclitaxel (AXEL et al., 1997; HERDEG et al., 2000; PARK et al., 2003) é isolado da casca do *Taxus brevifolia* e tem atividade antitumoral em uma ampla variedade de tumores em roedores. Desde 1970, tornou-se uma ferramenta efetiva dos médicos que tratam pacientes com câncer. O paclitaxel é eficaz para cânceres agressivos, porque ele afeta o processo de divisão celular, acabando com a flexibilidade, pois o paclitaxel se liga à proteína dos microtubules do núcleo, fixando-os e isso impede o transporte intracelular, incluindo a mitose, a proliferação celular e migração das células, enquanto que as células permanecem viáveis e em estado citostático. *In vitro*, os testes mostram inibição citostático de células de músculo liso com concentrações terapêuticas de paclitaxel. Por esta razão, o paclitaxel foi considerado para a entrega intracoronária para inibir o processo responsável pela hiperplasia da neointima após angioplastia e implante de stent.

O cilostazol é um agente antiplaquetário pelo aumento do AMP-c e bloqueio seletivo da fosfodiesterase tipo III (KIMURA et al., 1985), também tem ação vasodilatadora (KAMIYA; SAKAGUCHI, 1985; YASUDA; SAKUMA; TANABE, 1985). Pela literatura, ele vem demonstrando efeito animador na redução do espessamento da íntima (DOUGLAS JR. et al., 2005; DOUGLAS; WEINTRAUB; HOLMES, 2003; ISHIZAKA et al., 1999; MIN et al., 2007; TSAI et al., 2008; TSUCHIKANE et al., 1999).

Identificou-se, na literatura, o *Allium sativum*, que é uma planta (BLOCK, 2010), cujo bulbo tem efeitos como: anti-inflamatório, antioxidante (BOREK, 2001), hipocolesterolêmico (BOREK, 2001; KWON et al., 2003; LAU, 2001; SRILATHA et al., 1997), antitumoral (BOREK, 2001; LIBBY; TANAKA, 1997; PINTO; RIVLIN, 2001) e antiaterosclerótico (BOREK, 2001; CAMPBELL et al., 2001; EFENDY et al., 1997; KWON et al., 2003; YAMAJI et al., 2004), que fez indagar seu efeito protetor contra a hiperplasia miointimal. Assim, é relevante responder à pergunta de pesquisa: qual a diferença de média de hiperplasia miointimal pós-angioplastia na artéria ilíaca externa de coelhos com aterosclerose induzida e tratados com *Allium sativum* comparada aos tratados com Cilostazol?

1.1 Hipótese

A hipótese é que o *Allium sativum* é mais eficaz na redução do espessamento miointimal pós-angioplastia na artéria ilíaca de coelhos quando comparados com os tratados com Cilostazol.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Comparar a hiperplasia miointimal, pós-angioplastia na artéria ilíaca externa de coelhos com aterosclerose induzida entre os tratados com *Allium sativum* com os tratados com Cilostazol.

1.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar o perfil lipídico dos animais.
- ✓ Observar se há toxicidade pelo uso do alho.
- ✓ Determinar se a coloração Verhoeff é adequada para o isolamento da camada íntima.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Allium sativum*

Efendy et al. (1997) utilizando 24 (vinte e quatro) coelhos divididos em dois grupos, submeteu-os à aterosclerose induzida por dieta hipercolesterolêmica e à injúria da parede vascular por angioplastia da carótida, em seguida estudou o efeito do alho na inibição da aterosclerose, onde percebeu um efeito inibitório na proliferação das células musculares lisas e nas placas de lipídios depositadas na parede do vaso. Para esse efeito ele utilizou uma dose de 800 µL/kg de extrato bruto de alho.

Borek (2001) observou que extratos de alho fresco contêm fitoquímicos antioxidantes (flavonoides allixin e selênio), que previnem danos oxidativos no DNA (*deoxyribonucleic acid*), proteínas e lipídios. Assim sendo o alho inibe a peroxidação lipídica, reduzindo os danos de isquemia / reperfusão e inibi a modificação oxidativa de LDL. Além disso, o alho protege o DNA contra radicais livres de danos e mutações mediadas; inibe a carcinogênese em várias etapas e protege contra a radiação ionizante e dano induzido por UV (radiação ultravioleta), incluindo a protecção contra algumas formas de imunossupressão induzida por UV. Ele sugere que o alho tenha um papel na protecção contra a perda da função cerebral em envelhecimento e até efeitos antienvhecimento, pois o alho aumenta as funções cognitivas, da memória e da longevidade num modelo de camundongo. O alho também demonstrou proteger contra os efeitos cardiotoxicos da doxorrubicina e acetaminofeno. Este autor também afirma, em seres humanos, os efeitos benéficos para a saúde atribuída à idade, isto é, redução no risco de doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, câncer e envelhecimento, incluindo o dano celular na doença de Alzheimer.

Lau (2001) comprovou que a oxidação de LDL tem um papel importante na iniciação e progressão da aterosclerose, pois a LDL oxidada promove a disfunção vascular, exercendo citotoxicidade direta nas células endoteliais, aumentando as propriedades quimiotáticas para os monócitos, por transformação de macrófagos em células espumosas através dos receptores-limpadores e através do aumento da proliferação de células endoteliais, monócitos e células do músculo liso. Nesse artigo, ele comprovou que vários compostos do alho podem suprimir a oxidação do

LDL *in vitro*. Seus dados sugerem que a supressão da oxidação do LDL pode ser um dos mecanismos poderosos nas propriedades antiateroscleróticas de alho.

Campbell et al. (2001), em seu trabalho, determinou o mecanismo pelo qual o extrato de alho tem um efeito protetor contra a aterosclerose. Observou que o colesterol plasmático de coelhos, alimentados com uma dieta enriquecida com 1% de colesterol durante 6 (seis) semanas, não foi reduzida pela suplementação de 800 µL/kg de alho. Apesar disso, o alho reduziu em 64% ($P < 0,05$) a área de superfície da aorta torácica coberta de estrias de gordura e significativamente reduziu o arco aórtico de colesterol. O alho também inibiu em aproximadamente 50% o desenvolvimento de lesões produzidas por cateter balão de Fogarty 2F na artéria carótida direita de coelhos, alimentados com colesterol. Em estudos *in vitro*, observou que o alho inibe a proliferação de células do músculo liso no estado sintético com uma dose de 50% de eficácia na concentração 0,2%, mas não teve efeito sobre a expressão de moléculas de adesão na superfície do endotélio ou a adesão de leucócitos. Concluiu então, que o alho tem efeitos antiaterogênicos através da inibição da mudança fenotípica do músculo liso e de sua proliferação, e pelo acúmulo de lípidos na parede arterial.

Kwon et al. (2003) sugere que o alho exerce efeito hipocolesterolêmico e/ou antiaterogênico, retardando assim a progressão da aterosclerose pela inibição da atividade de CETP. A pesquisa utilizou 12 (doze coelhos) da raça Nova Zelândia que foram submetidos a dieta hipercolesterolêmica e depois divididos em dois grupos: o controle com 6 (seis) animais e um grupo que utilizou o alho com igual n populacional.

Yamaji et al. (2004) sugere, em seu estudo, que o alho pode ser útil na prevenção da aterosclerose. Ele utilizou ovo com gema enriquecida de alho em pó, que tem sido usado como um alimento tradicional de promoção da saúde no sul do Japão desde os tempos antigos, e examinou suas propriedades antioxidantes na oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e num modelo de lesão celular oxidativa induzida pelo estresse. Ele confirmou que a gema enriquecida com alho liofilizado inibe a oxidação do LDL de maneira dose-dependente. Observou também que o pré-tratamento com gemas enriquecidas de alho suprimiu significativamente a produção de peróxidos em células HL60 e células endoteliais. Estes resultados sugerem que a gema enriquecida com alho pode ser útil na prevenção de aterosclerose.

Mikail (2010) estudou a toxicidade do extrato aquoso do *Allium sativum*. Esse estudo de toxicidade aguda foi realizada após a administração subcutânea de doses graduadas de extracto de planta em coelhos experimentais da raça Nova Zelândia. DL50 foi determinada em 3034 mg/kg e a dose máxima tolerada foi de 2200 mg/kg. A mortalidade ocorreu em coelhos, com doses de 3200 e 4200 mg/kg, com sinais comportamentais, como perda de apetite e paralisia parcial. A triagem fitoquímica revelou a presença dos seguintes compostos químicos: saponinas, esteróides, taninos, carboidratos e glicosídeos cardíacos e que alcalóides, cadenolide, flavonóides, antraquinona e glicosídeos cianogênicos estavam ausentes.

El-Sayyad et al. (2010) demonstrou em sua pesquisa que o *Allium sativum* teve efeito protetor em ratas Wister hipercolesterolêmicas grávidas e não grávidas e em seus filhotes além de diminuir os níveis lipídicos.

Ried, Toben e Fakler (2013), através de seus resultados em seres humanos, sugere que o alho seja eficaz na redução do colesterol sérico total e de lipoproteína de baixa densidade colesterol, em indivíduos com níveis elevados de colesterol total. As preparações de alho foram altamente tolerável em todos os ensaios e foram associadas com efeitos colaterais mínimos. Então, o uso do alho é uma opção alternativa com um perfil de segurança mais elevado do que os medicamentos convencionais para baixar o colesterol em pacientes com colesterol levemente elevado.

2.2 Cilostazol

Tsuchikane et al. (1999) considerando que a reestenose coronariana, após (balão) angioplastia transluminal percutânea (PTCA), continua a ser um grande inconveniente do procedimento e que o cilostazol, um inibidor de agregação de plaquetas, da proliferação da íntima e que reduz a taxa de restenose em seres humanos; ele teve como objetivo determinar o efeito do cilostazol sobre a reestenose após a PTCA. Ele comprovou a redução das taxas de restenoses e de lesão vascular após angioplastia com balão nas artérias de seres humanos com o uso de cilostazol.

Ishizaka et al. (1999) para elucidar se o cilostazol, administrado localmente, um inibidor da fosfodiesterase do AMP cíclico III, suprime a formação da neoíntima em artérias carótidas de ratos danificadas por balão, Ishizaka e et al. aplicaram 20

mg de cilostazol, topicamente, através de gel Pluronic no momento da lesão provocada pelo balão. Seus resultados sugerem que a administração local de cilostazol, utilizando gel Pluronic, mantém uma elevada concentração do fármaco no local de aplicação, tendo um efeito anti-proliferativo em células musculares lisas, e podem ter potencial para utilização terapêutica clínica para a prevenção de restenose após intervenção arterial.

Douglas Jr et al. (2005) realizou um estudo duplo-cego, randomizado, controlado por placebo para determinar se o cilostazol inibia a proliferação da íntima, reduzindo a reestenose em pacientes pós-implante de stent em artérias coronárias nativas. Utilizou 705 pacientes, que tiveram sucesso no implante de stent coronário, para receber, além da aspirina, 100mg de cilostazol ao dia ou placebo por 6 meses; o clopidogrel, 75 mg por dia, foi administrado a todos os pacientes durante 30 dias. O autor conclui que há redução das reestenoses intra-stents nas angioplastias coronarianas quando o paciente usa cilostazol, principalmente, nos diabéticos.

Min et al. (2007) investigou a eficácia do cilostazol na prevenção de hiperplasia neointimal intra-stent tanto por angiografia coronária como por Ultrassom Doppler Intravascular Volumétrico. Recrutou cinquenta e nove pacientes (39 homens, idade média 62 anos) submetidos à implante de stent coronariano eletivo e foram aleatoriamente designados para receber aspirina e clopidogrel ou ticlopidina ou aspirina e clopidogrel ou ticlopidina mais cilostazol. Ele concluiu que a tripla-antiagregação plaquetária, utilizando aspirina, clopidogrel e cilostazol, tem um efeito inibitório da hiperplasia neointimal superior aos outros esquemas antiplaquetários no pós-operatório de angioplastia coronariana com stent.

Tsai et al. (2008) utilizando o coelho para testar o efeito do Cilostazol sobre a hiperplasia intimal determinou que *in vivo* o Cilostazol reduz a hiperplasia neointimal e a infiltração de macrófagos na aorta de coelho submetidos à angioplastia por balão e que o cilostazol pode desempenhar um papel importante na prevenção de endotoxinas e feridas mediada por inflamação vascular. Ele utilizou uma concentração de 50 mg/dia.

Ueno et al. (2011) estudou a comparação do efeito de cilostazol com aspirina em células progenitoras endoteliais circulantes e de colesterol LDL em doentes diabéticos com isquemia cerebral. Foram comparados os efeitos do cilostazol com aspirina sobre células endoteliais circulantes progenitoras (EPCs). Ele concluiu que o cilostazol aumenta as EPCs circulantes e diminui sdLDL em pacientes diabéticos

com isquemia cerebral.

Qian e Bi (2013) estudaram a eficácia e segurança do cilostazol na prevenção e tratamento do acidente vascular cerebral isquêmico, para tal, foram analisadas as revisões sistemáticas de ensaios clínicos randomizados, controlados, relacionados. Conclui que o cilostazol pode ser uma alternativa mais eficaz e segura à aspirina para pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico.

Maruyama et al. (2013), em seu estudo, investigou a relação entre a dose de cilostazol e a função das plaquetas, conseguida com a terapia de combinação. A taxa de inibição < 20% foi significativamente inferior em ambos os grupos de combinação de cilostazol que só no grupo de clopidogrel. Concluiu, então, que o uso de terapia de combinação clopidogrel e cilostazol, em baixa dose (100 mg), pode ser um meio de superar a resistência ao clopidogrel.

Lin et al. (2014), em seu estudo, também determinou que a aspirina por si só ou em combinação com clopidogrel não são eficazes na prevenção de acidente vascular isquêmico e que depois da mudança do agente antiplaquetário para o cilostazol, não houve episódios isquêmicos recidivantes; logo, este estudo sugere que o cilostazol pode ser eficaz na prevenção de ataque isquêmico transitório de origem não cardíaca.

2.3 Hiperplasia

Ameli et al. (1989), estudando o efeito do fumo na parede arterial, demonstrou um índice maior de perda de membros devido à falência dos *by-pass*, em consequência à hiperplasia nos mesmos. Ele estudou o efeito do tabagismo sobre as taxas de perda do membro e as taxas de permeabilidade cumulativas de 136 reconstruções arteriais, realizadas em decorrência à isquemia dos membros inferiores, analisando-os num estudo retrospectivo de cinco anos. Múltiplas interações entre tabagismo e variáveis como idade, sintomas pré-operatórios, e material de enxerto demonstram a complexidade dos efeitos do tabagismo sobre a taxa de perviedade cumulativa e da necessidade de sub-agrupamento e remoção de fatores de confundimento. Tendo em vista os efeitos adversos de tabagismo continuado no prognóstico pós-revascularização, os pacientes devem ser, fortemente, aconselhados a interromper o tabagismo.

Cox, Chiasson e Gotlieb (1991), em seu trabalho de revisão, afirmaram que

qualquer injúria, na parede vascular, leva a uma alteração no metabolismo lipídico local, distúrbio hemodinâmico e proliferação das células musculares lisas da parede vascular, promovendo assim hiperplasia e/ou aterosclerose local.

Lafont et al. (1995) estudou as causas de reestenoses arterial após angioplastia. Para isso utilizou coelhos brancos da raça Nova Zelândia com aterosclerose e que foram submetidos à angioplastia da artéria ilíaca por via carotídea. Seus achados, surpreendentemente, determinaram que a estenose residual tardia está correlacionada com a constrição crônica, mas não com o crescimento neointimal-medial ou crescimento da adventícia. Então, ele conclui que os fatores relacionados ao remodelamento arterial, ao invés de crescimento neointimal-medial, pode dominar a resposta à angioplastia.

Gimbrone Jr (1995), em seu artigo de revisão, trouxe o conceito da disfunção endotelial, onde o endotélio é uma importante estrutura na fisiopatologia da aterosclerose, sendo alvo dos leucócitos mononucleares.

Asada et al. (1996) confirma, em sua pesquisa, que a indução da endotelização por cateter balão é o meio mais popular de lesão arterial em animais experimentais e tem sido usado como sistema modelo para investigar a aterogênese e reestenose após angioplastia transluminal percutânea (PTCA). O objetivo deste estudo foi examinar a relação entre a pressão de insuflação do balão e dano vascular e hiperplasia da íntima subsequente. A lesão retrógrada (*pullback*) pelo balão nas aortas de coelho, foi feita com três diferentes pressões de balão (1,5, 1,75 e 2,0 atm). As lesões mediais, como necrose das células musculares lisas e perturbação da lâmina elástica, foram encontrados ocasionalmente no segmento lesionado da aorta por cateter-balão em 1,75 atm e mais frequentemente em 2,0 atm. Seus resultados indicam que a hiperplasia da íntima não é só proporcionalmente relacionada com a gravidade da lesão vascular, mas também foi dependente da pressão de inflação.

Sterpetti et al. (1996) correlacionaram os mitógenos Factor de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) e o Factor de Crescimento Fibroblástico básico (bFGF) na estimulação do crescimento e invasão da muscular na íntima.

Ross (1999), em seu artigo de revisão, afirma que a hipercolesterolemia é um fator acelerador, mas que o fator primordial das alterações na parede do vaso é de causa inflamatória, onde há invasão de monócitos, linfócitos T e macrófagos na camada miointimal.

Costa e Fagundes (2002) relatam, em seu artigo de revisão, o efeito inibitório da hiperplasia intimal pela radiação em diferentes territórios vasculares; pela inibição da proliferação de muitos tipos celulares, incluindo fibroblastos e células musculares lisas *in vitro* e a síntese de colágeno em culturas de fibroblastos; além do péssimo resultado das atuais drogas utilizadas para essa finalidade.

Libby (2006), em seu trabalho, demonstra que a deposição lipídica não é a vilã principal no processo aterosclerótico e hiperplásico na artéria e sim o processo inflamatório a sua parede.

Davies (2007) descreve a hiperplasia intimal, as camadas do vaso envolvidas e faz um resumo da literatura sobre os atuais mecanismos de hiperplasia conhecidos nas artérias, nos enxertos venosos, nos enxertos protéticos e pós-angioplastia com e sem stent.

Pereira, A. H., Pereira, A. A. e Costa (2008) também fazem uma abordagem da fisiopatologia da hiperplasia intimal enfatizando a invasão muscular na íntima e a remodelação na parede vascular.

Os autores Li e Brooks (1999) chamam a atenção para que as novas drogas devam visar à inibição da hiperplasia intimal, principalmente, pós-procedimentos angioplásticos, atuando na mitose celular dos miócitos, pois estas são as células mais envolvidas na hiperplasia.

2.4 Modelos animais de aterosclerose e angioplastia

Baumgartner (1973) estudando a adesão plaquetária, a deposição de fibrina e a formação do trombo mural em 22 (vinte e dois) coelhos, estabeleceu o método de lesão vascular em coelhos, ou seja, a desnudação endotelial, utilizando um cateter balão por ele idealizado em 1963 (BAUMGARTNER, 1963) e introduzido na aorta do coelho por via femoral, sendo essa ligada após retirado do balão.

Srilatha et al. (1997) provocou aterosclerose em coelhos jovens não obesos após hipercolesterolemia por ingestão diária de gema de ovo fresco durante 8 semanas. Logo, ele relatou que este é um método útil para determinar as mudanças patológicas precoces de aterosclerose no homem. Além disso, o presente estudo fornece evidência direta do efeito deletério da gema de ovo de galinha sobre o nível de colesterol sérico em um modelo animal adequado e de fácil reprodução.

Bledsoe et al. (2005) demonstrou que o uso crônico do clopidogrel não

diminui o desenvolvimento da hiperplasia intimal no território carotídeo. Para comprovar isso, ele selecionou ratos machos Sprague-Dawley e submetem-nos a endarterectomia carotídea (CEA) e o tratamento com placebo ou com doses variadas de clopidogrel, incluindo clopidogrel-crônico, bolus pré-CEA, clopidogrel-crônico mais bolus pré-CEA e bolus mais clopidogrel-crônico pós-CEA; uma dieta homocisteínica foi usado para elevar, ambos, homocisteína no plasma e o grau de hiperplasia da íntima. A agregação plaquetária, atividade plaquetária, e hiperplasia intimal foram avaliadas. Foi concluído que outros fatores devem, por conseguinte, contribuir para o desenvolvimento patológico de hiperplasia intimal.

Liddell et al. (2005) desenvolveu um modelo de isquemia de membro inferior em coelhos, para isso ele utilizou coelhos da raça Nova Zelândia em número total de 17 (dezesete). A artéria que serviu de entrada para o cateter guia das moles eram ligadas no final da embolização.

Santos (2008) estudou métodos alternativos e baratos para determinar uma dieta hipercolesterolêmica, comparando a gema de ovo de galinha e a banha do porco, em relação aos outros alimentos existentes no mercado com alto índice de colesterol total. Ao exame microscópico, a dieta enriquecida com gema de ovo de galinha é excelente para formação de células espumosas e espessamento de endotélio, é prático para realização experimental, é de baixo investimento tornando acessível às pesquisas referentes à colesterolemia.

Ferrer et al. (2010), em sua pesquisa para indução de lesão vascular em coelhos com dieta hipercolesterolêmicas, determinou através de ultrassom que o coelho é um bom modelo e que balões de angioplastia menores, tipo 2 (dois) mm de diâmetro, são suficientes e seguros (com menos complicações).

Rolim (2012), em sua dissertação de mestrado, estudou o efeito da *Moringa oleifera* sobre a hiperplasia médio-intimal. Utilizou 30 coelhos fêmeas da raça Nova Zelândia com hipercolesterolemia, induzida por gema de ovo na dieta. Provocou lesão da parede da artéria ilíaca direita por angioplastia por balão via femoral, a qual foi ligada após a angioplastia. E, para o estudo morfométrico, utilizou a coloração HE. Na estatística, utilizou o teste ANOVA *One* e *Two-way*. Nesse estudo, não houve efeito protetor da *Moringa*, na dose estudada.

Van Craeyveld et al. (2012) comparou o uso de coelho tanto machos como fêmeas e murina (camundongos) machos e fêmeas como modelo no estudo de aterosclerose em animais, constatando que não há diferença entre coelhos machos

e fêmeas. O principal objetivo dele foi realizar uma análise longitudinal de remodelamento arterial e da evolução da área medial durante a progressão da aterosclerose. Os objetivos secundários foram analisar as diferenças sexuais na progressão da aterosclerose e determinar correlações entre eles. Detectou progressão da aterosclerose, em todos os modelos, a qual foi acompanhada por expansiva remodelação do vaso. A progressão da aterosclerose em camundongos e coelhos é, muitas vezes, acompanhada por um aumento da área da média. Camundongos fêmeas são mais suscetíveis ou igualmente suscetíveis ao desenvolvimento de aterosclerose em comparação com camundongos machos, não obstante, os níveis plasmáticos de colesterol mais baixos. No entanto, essa diferença entre os sexos não foi reiterada em ambos os modelos de coelho.

Guzeloglu et al. (2012) utilizou 13 (treze) coelhos da raça Nova Zelândia para estudar o efeito da Rosiglitazona, que é um antagonista dos Receptores de atividade proliferativa da Peroxisomo (PPARs), para inibir a hiperplasia intimal. Realizou angioplastia nas carótidas dos coelhos. Como método estatístico, utilizou ANOVA e Mann Whitney U. Seus resultados sugerem que a rosiglitazona pode impedir a hiperplasia neointimal, que é o fator mais importante envolvido na falência do enxerto tardiamente.

Nogueira (2012) estudou o efeito da *Curcuma longa* sobre a hiperplasia médio-intimal. Utilizou 30 coelhos fêmeas da raça Nova Zelândia com hipercolesterolemia, induzida por gema de ovo na dieta. Provocou lesão da parede da artéria ilíaca direita por angioplastia por balão via femoral, a qual foi ligada após a angioplastia. E, para o estudo morfométrico, utilizou a coloração HE. Na estatística, utilizou os testes ANOVA *One* e *Two-way*. Nesse estudo, não houve efeito protetor da curcuma na dose estudada.

2.5 Imunomarcadores

Tsukada et al. (1987) determinou que o HHF35 é não reativo em imunomarcações de extratos a partir de todos os extractos celulares testados não-musculares. O HHF35 reage com praticamente todas as células musculares e é útil como um marcador para o músculo e nas células derivadas do músculo.

Hirsch e Karnovsky (1991) investigaram o efeito da heparina sobre o desenvolvimento de lesões proliferativas miointimais num modelo de enxerto de veia

de rato. O espessamento da íntima, neste modelo, foi mais pronunciada nas regiões de anastomose, e era composto, principalmente, de células musculares lisas vasculares, como identificado por imunocitoquímica com anticorpo anti-actina de músculo, HHF35. O autor sugere que a heparina, através da sua atividade anti-proliferativa em células musculares lisas vasculares, possa ter um papel farmacológico na prevenção da falha do enxerto da veia, o que resulta, geralmente, mais do desenvolvimento de lesões proliferativas miointimais.

Stadius et al. (1994) provocou uma lesão mecânica aguda de uma artéria, resultado em hiperplasia neointimal que é devido, pelo menos em parte, à proliferação de células na parede do vaso. O objetivo deste estudo foi quantificar a atividade de proliferação celular na artéria ilíaca de coelhos da raça Nova Zelândia após lesão por balão e alimentação com colesterol. A lesão nas artérias ilíacas foi realizada via femoral e as femorais usadas foram ligadas após a cirurgia; em seguida, os animais foram então alimentados com uma dieta de 2% de colesterol. As médias das áreas das íntimas foram medidas morfometricamente. As regiões das células musculares lisas e dos macrófagos na íntima e média foram identificados, utilizando os marcadores imunocitoquímicos HHF35 e RAM-11, respectivamente. A atividade proliferativa na íntima esteve presente em todas as amostras de dia 8 até ao dia 35 e em ambas as regiões HHF35 e RAM-11-predominantes da íntima.

Takagi et al. (1997) comparou a hiperplasia, que ocorre em coelhos WHHL com o tipo de hiperplasia, que ocorre nas coronárias humanas. Para isso, ele utilizou 45 (quarenta e cinco) coelhos e os submeteu à angioplastia com balão de 2 (dois) cm de comprimento e 3 (três) mm de diâmetro para realizar, também realizou a ligadura da artéria femoral após a realização da lesão pelo balão. Para a imunoistoquímica, foi utilizado o HHF35 e o RAM-11 para estudar as células musculares lisas e os macrófagos, respectivamente. Nesse estudo, ele constatou que o coelho WHHL é adequado para esse tipo de pesquisa.

De Serre et al. (2008) determinou a elevação plasmática de C4d nas rejeições dos transplantes, em decorrência à inflamação imunológica nas estruturas vasculares. Os anticorpos específicos de doador nunca foram encontrados em qualquer série estudada. No entanto, a classificação das lesões vasculares pode constituir um marcador útil para identificar rejeições agudas, que são potencialmente resistentes ao tratamento padrão, e para os quais uma terapia alternativa deve ser considerada.

Cohen et al. (2012) percebeu que o surgimento de novas terapias, que bloqueiem a ativação do complemento, faz do C4d um potencial marcador para identificar pacientes que possam, eventualmente, beneficiar-se dessas terapias. Esta revisão apresenta uma visão geral sobre esse biomarcador C4d, com foco na sua utilização em transplantes de órgãos sólidos e discutir seus possíveis papéis nas doenças autoimunes.

2.6 Tratamentos diversos

McCann, Hangen e Fuchs (1980) demonstraram no experimento em enxertos venosos que a associação de ácido acetil salicílico (AAS) e dipiridamol diminuem a hiperplasia intimal nesses enxertos vasculares.

Kohler, Kirkman e Clowes (1989) no trabalho com heparina na inibição da hiperplasia intimal, percebeu efeitos diferentes entre a hiperplasia que ocorre na veia e na artéria sugerindo mecanismos diferentes para a migração das células musculares nesses vasos. Nesse trabalho também foi demonstrado haver pouco efeito da heparina na inibição da hiperplasia intimal.

Plate et al. (1989) utilizou 32 (trinta e dois) coelhos de ambos os sexos para determinar o efeito inibidor dos antiplaquetários na inibição da deposição de plaquetas e de fibrina na parede arterial angioplastada. Para isso, realizou angioplastia na aorta de coelhos (macho e fêmea), submetidos à dieta rica em colesterol, por via femoral, após anestesiados e no final do procedimento, as artérias femorais foram ligadas. Como drogas antiplaquetárias, foram utilizados dipiridamol, ácido acetilsalicílico, prostaciclina e dextran. E, concluiu que não houve inibição da deposição de plaquetas nem de fibrina pós-angioplastia.

Landymore, Macaulay e Manku (1990) utilizando enxerto de veia femoral bilaterais, que foram implantados em 47 cães adultos, determinou os efeitos da aspirina sobre a hiperplasia da íntima. Seus dados indicaram que a aspirina não reduz a proliferação da íntima em enxertos de veias caninas, o que sugere que a terapia de droga alternativa ou combinada pode ser necessário para reduzir a incidência de falha do enxerto tardiamente.

Gellman et al. (1991) estudou a reestenoses das angioplastias com balão ocasionadas por hiperplasia da íntima após o procedimento. Para isso, utilizou a lovastatina, a 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA), para inibir a

hiperplasia da íntima através de uma redução do colesterol no soro e bloquear a síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA). Para determinar se a lovastatina reduzia a hiperplasia da íntima, realizou um estudo prospectivo, randomizado e cego em 60 (sessenta) coelhos da raça Nova Zelândia com aterosclerose. A aterosclerose foi produzida por uma dieta contendo 2% de colesterol e 6% de óleo de amendoim por 28 (vinte e oito) dias e que foi terminada antes da angioplastia, por balão, ser realizada. Concluiu que a lovastatina diminuiu a hiperplasia da íntima nos coelhos hipercolesterolêmicos.

Waksman et al. (1997) examinou o mecanismo pelo qual a radiação ionizante tem sido mostrada para reduzir a formação de neointima em lesão vascular por estiramento das artérias coronárias de suínos. Seu estudo sugere que a radiação intracoronária inibe, principalmente, a primeira onda de proliferação celular na parede do vaso e demonstra um efeito favorável sobre a remodelação tardia, impedindo a fibrose adventícia no local da lesão.

Axel et al. (1997) concebeu um estudo para caracterizar os efeitos do paclitaxel sobre a proliferação e migração de células musculares lisas arteriais de humanos (haSMCs) *in vitro* e na formação da neo-íntima num modelo *in vivo* de coelho experimental. Histologicamente, a área da íntima da parede, espessura da parede, e o grau de estenose foi significativamente reduzida em animais tratados com paclitaxel em comparação com os controles. Assim sendo, ele concluiu que o paclitaxel inibe a proliferação e migração haSMC de uma forma dependente da dose em monoculturas e co-culturas, mesmo na presença de mitógenos. Além disso, o paclitaxel impede a formação de neointima em coelhos após angioplastia com balão.

Herdeg et al. (2000) estudando o efeito antitumoral paclitaxel na parede vascular pós-angioplastia, comprovou a sua eficácia na redução da estenose neointimal. O objetivo de seu estudo foi avaliar o potencial do paclitaxel em evitar a reestenose *in vivo*. Partindo do sabido que o paclitaxel é um composto de estabilização dos microtúbulos com atividade antitumoral potente e que ele influencia o equilíbrio citoesquelético, aumentando o conjunto de microtúbulos alterados, e assim, induzindo modificações celulares, que resultam em redução da proliferação, migração e transdução de sinais. Concluiu que a entrega local de paclitaxel resulta em redução da estenose neointimal e aumento no tamanho do vaso (remodelamento positivo). Ambos os efeitos contribuem para uma manutenção e podem ser causados por uma alteração estrutural do citoesqueleto.

Yasuda et al. (2002), em seu estudo sobre a Docetaxel (uso local) na inibição da hiperplasia intimal, utilizou 24 coelhos da raça Nova Zelandia e provocou a hiperplasia por meio de lesão endotelial por balão de angioplastia a 2 (dois) atm, na artéria ilíaca do coelho. Ele concluiu que a entrega local de Docetaxel, mesmo após uma única administração de dose reduzida, inibe, eficazmente, a hiperplasia neointimal; e que sua administração é associada com um risco mínimo de efeitos adversos sistêmicos (leucocitopenia).

Park et al. (2003) estudou 177 (cento e setenta e sete) pacientes que usaram stents coronarianos embebidos com paclitaxel e percebeu a redução das estenoses pós-angioplastia e colocação de stent, demonstrando assim que tal substância inibe a hiperplasia neointimal.

Ducasse et al. (2006) investigou a hiperplasia da íntima na parede arterial com stent, seguida de radiação externa para a prevenção de hiperplasia da íntima em porcos. A reformulação parietal, observada nas artérias dos animais irradiados com doses elevadas, não está clara e é causa de preocupação, especialmente, após a dissecação clínica espontânea, que foi relatada. Assim, o autor concluiu que o uso de radiação ionizante para a prevenção da reestenose arterial aguarda confirmação com um longo prazo de seguimento, incluindo análise histológica experimental específica.

Cortelekglu et al. (2006) partindo de que a hiperplasia neo-intimal é uma das causas mais comuns de falhas de permeabilidade arterial seguintes as intervenções cardiovasculares; e que tem sido proposto que o clopidogrel e o dobesilato de cálcio podem desempenhar um papel importante na melhoria da hiperplasia da íntima; seu objetivo foi avaliar o efeito desses agentes na hiperplasia da íntima, que ocorre após lesão experimental por cateter balão. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos clopidogrel e dobesilato de calico. Logo, o clopidogrel e o dobesilato de cálcio melhoraram a hiperplasia da íntima após lesão vascular, induzida, experimentalmente, em artérias ilíacas de coelhos.

Knopfholz et al. (2006) utilizou dezenove coelhos da raça *New Zealand*, que foram divididos em dois grupos: controle e arginina, respectivamente com dezenove e dezessete artérias estudadas. Os animais foram submetidos à angioplastia por balão, em suas artérias ilíacas por via femoral. Após o sacrifício, no 15o dia após a lesão por balão, procedeu-se a morfometria das artérias. No modelo experimental utilizado, a L-arginina foi capaz de reduzir o espessamento intimal em coelhos

hipercolesterolêmicos e não teve ação sobre o remodelamento arterial.

Brasselet et al. (2008) estudou o efeito do calor na inibição da hiperplasia intimal intra-stent. Para isso, ele utilizou 56 (cinquenta e seis) coelhos da raça Nova Zelândia submetidos à dieta hipercolesterolêmica. Seu objetivo foi avaliar a capacidade do aquecimento local de inibir a reestenose intra-stent e a hiperplasia neointimal, além de seus efeitos colaterais potenciais sobre a trombose arterial. O aquecimento local foi associado com a proliferação celular diminuída, densidade de colágeno menor, e aumento da apoptose de células do músculo liso e a expressão da proteína de choque térmico. Logo, o aquecimento representa uma abordagem promissora para prevenir a restenose intra-stent através da limitação da resposta proliferativa sem indução de trombose.

Waksman et al. (2008) objetivou descobrir, por inflamação modulada, se o clopidogrel podia afetar a formação da neointima em artérias ilíacas de coelhos hipercolesterolêmicos desnudadas por balão. Seu estudo demonstrou que o clopidogrel reduz a inflamação e formação de neointima em artérias ilíacas desnudadas por balão em coelhos hipercolesterolêmicos.

Alessi et al. (2010) estudou o efeito da rosigitazona nas artérias ilíacas em coelhos hipercolesterolêmicos, submetidos à lesão por cateter balão. Para isso, ele utilizou 32 (trinta e dois) coelhos brancos machos, alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica por sonda oral por 6 (seis) semanas e divididos em dois grupos: grupo rosigitazona e no grupo controle. Na artéria ilíaca contralateral, não houve diferença significativa na proporção de área da camada íntima / média entre os grupos controle e rosigitazona. Já na homolateral, a lesão, houve diferença estatística, logo, a rosigitazona, durante 6 (seis) semanas, impede a aterogênese no local da lesão, mas não em um vaso distante do local da mesma.

3 MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacológica (CEPA / LTF) da Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, PB, sob o número 0412/09 (Anexo A) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL), Maceió, AL, sob o número 63-A (Anexo B).

3.1 Tipo de estudo

Ensaio pré-clínico aleatório em animais de experimentação por 35 dias.

3.2 Local

Biotério do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) do Campus I da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

3.3 Amostra

Foram incluídos coelhos fêmeas da espécie *Oryctolagus cuniculus* da raça Nova Zelândia (*New Zealand*), com aterosclerose experimental, submetidos à indução de hiperplasia da camada miointimal da artéria ilíaca externa direita por angioplastia por balão de angioplastia semi-complacente (ASADA et al., 1996; BAUMGARTNER, 1973; GELLMAN et al., 1991; KNOPFHOLZ et al., 2006; NOGUEIRA, 2012; ROLIM, 2012; SANTOS, 2008; STADIUS et al., 1994; TAKAGI et al., 1997), pesando acima de 2Kg, com idade entre 2 a 6 meses e sem alterações anatômicas nas estruturas alvos. Esses coelhos formaram uma amostra não probabilística por conveniência.

➤ Respeitaram-se as leis:

- Lei 6638, de 08 de maio de 1979 - Normas para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais;
- Declaração Universal dos Direitos do Animal, UNESCO, 15 de Outubro de 1978;
- Lei de crimes ambientais (Lei nº 9.605/1998);

- As normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA, em 1991, sobre os Princípios Éticos na Experimentação Animal.

3.4 Procedimentos

O sorteio dos animais para cada grupo foi feito por aleatorização simples com auxílio do programa gratuito Research Randomizer, no site <http://www.randomizer.org/form.htm>, sendo três blocos com 10 números cada (VIEIRA, 1984). Cada bloco correspondeu à droga utilizada e os números gerados aos animais.

Os animais receberam uma letra e um número, correspondendo ao grupo de administração e identificação do animal (exemplo: C1 – animal 1 do grupo Cilostazol; A2 – animal 2 do grupo *Allium sativum*, etc.). Essa marcação foi feita por meio de escrita à tinta azul indelével na face interna da base da orelha direita, com caneta tipo piloto permanente (*permanent mark*®).

➤ Manejo dos animais

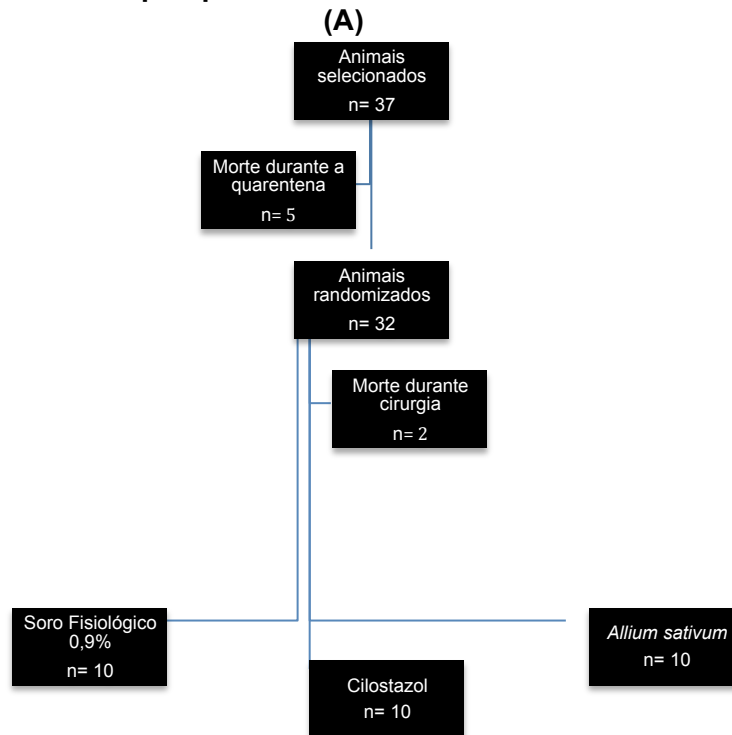
Optou-se pelo manejo fechado dos animais e a experimentação foi realizada no próprio biotério, onde se dispunha de ambiente propício para os mesmos, com sistema de ventilação exaustão forçado, períodos de luminescência natural, temperatura média de 20°C, ruído mínimo e umidade em torno de 50%. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas com área de 0,64 m², eles não tiveram contato com suas secreções naturais, uma vez que as gaiolas eram adaptadas para que se mantivesse a devida higiene. A dieta foi constituída de água e ração comercial granulada (Purina ® para coelhos - proteína bruta 15%, extrato etéreo 2,5%, matéria fibrosa 16%, matéria mineral 10%, cálcio 2,5%, fósforo 0,42%, umidade 13%, carboidratos 31,58%) *ad libitum*, antes e durante o experimento.

Os coelhos foram pesados, semanalmente, para avaliação de seu estado nutricional, em balança digital de precisão. A calibragem era feita antes da pesagem de cada um dos animais.

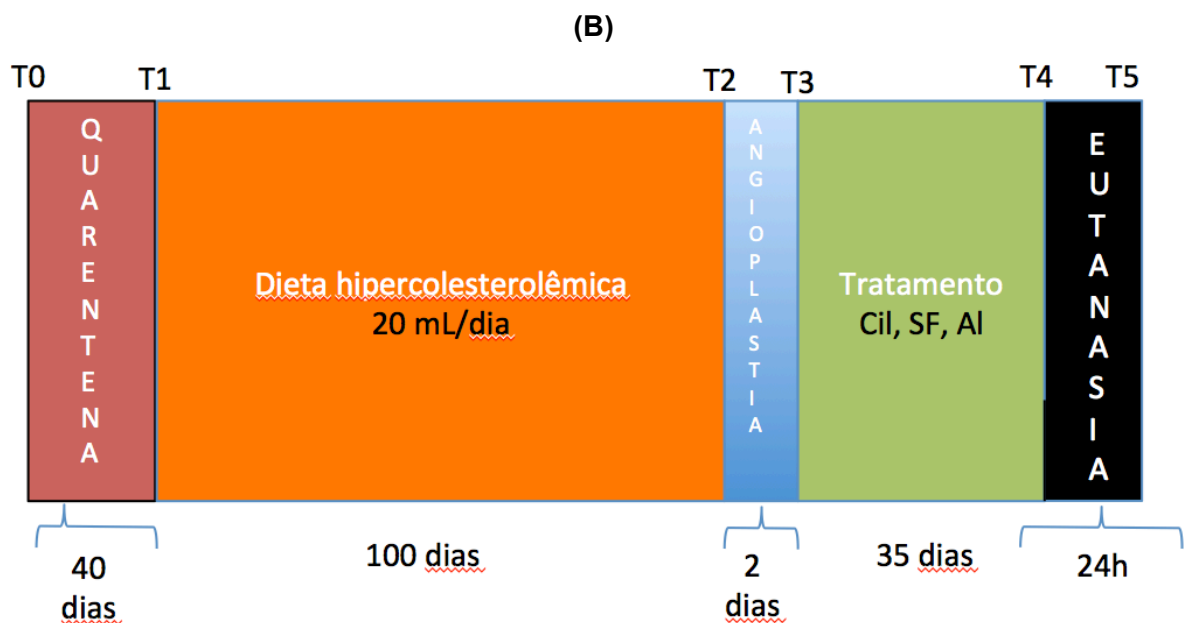
Iniciou-se a pesquisa com 37 (trinta e sete) animais, porém 5 (cinco) morreram no período de quarentena: e dos 32 (trinta e dois) coelhos, que foram submetidos ao procedimento cirúrgico, dois morreram durante a angioplastia da

ilíaca externa. Sendo os 30 (trinta) animais restantes divididos nos grupos S (soro fisiológico 0,9% – nosso controle negativo), C (Cilostazol – nosso controle positivo) e A (*Allium sativum* – produto estudado) (Figura 1).

Figura 1 – Delineamento da pesquisa



Estabeleceu-se a seguinte linha de tempo para a pesquisa:



Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

Onde: T0 é o tempo inicial, T1 é o início da dieta hipercolesterolêmica, T2 o início da angioplastia, T3 é o início da administração das drogas, T4 é o início da eutanásia e T5 seu término.

➤ **Preparo e administração da dieta aterogênica**

Para todos os grupos, foram oferecidas, diariamente, 20 mL de gema peneirada de ovo de galinha granjeirenses, sem a película da gema, administrada no período da manhã por via oral com auxílio de uma seringa de 20 mL, pelo período de 100 (cem) dias (NOGUEIRA, 2012; ROLIM, 2012; SANTOS, 2008). O preparo da dieta foi diário, minutos antes da administração e mantida a devida higiene para evitar contaminações. Foi ofertada crua. A opção de administrar a gema, na forma líquida, foi para facilitar e ter certeza da maior ingestão possível de colesterol.

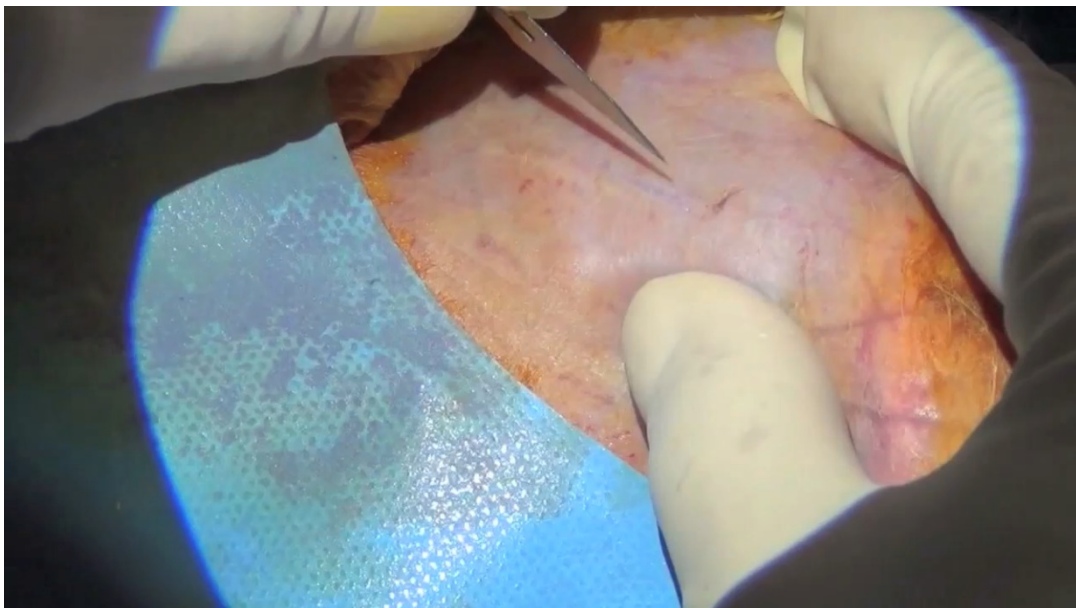
➤ **Indução da hiperplasia miointimal**

Após os cem dias de administração da dieta aterogênica, induziu-se a hiperplasia miointimal pela seguinte técnica: os coelhos foram pesados e anestesiados com Xilazina na concentração de 10 mg/kg e Ketamina na concentração de 40 mg/kg, por via intramuscular, na porção proximal lateral à direita da pata traseira, segundo técnica descrita na literatura (ASADA et al., 1996; BAUMGARTNER, 1973; CORTELEKOGLU et al., 2006; GELLMAN et al., 1991; GUZELOGLU et al., 2012; HARKNESS; WAGNER, 1993; LAFONT et al., 1995; NOGUEIRA, 2012; ROLIM, 2012; STADIUS et al., 1994; TAKAGI et al., 1997; YASUDA, S. et al., 2002). O plano anestésico foi verificado pela ausência do reflexo doloroso na preensão interdigital direta na orelha direita.

Após indução anestésica, foi realizada tricotomia nas regiões: inferior do abdome e inguinal à direita, seguidas de limpeza adequada do local, assepsia e antisepsia com solução de PVPI degermante a 10% de iodo ativo. Realizou-se coleta de sangue na veia auricular central com seringa de 5 (cinco) mL e condicionado em tubetes de 6 (seis) mL sem conservante. Como demonstrado no vídeo abaixo, procedeu-se, então, a incisão na pele com 2 (dois) a 3 (três) cm de extensão no sentido longitudinal na prega inguinal com bisturi lâmina 11, para exposição da artéria femoral direita, a qual foi reparada com fio de algodão 3-0. Realizou-se pequena arteriotomia (abertura da artéria) transversal com bisturi lâmina

11 (onze), através da qual foi introduzida o conjunto fio guia metálica número 0,014” (polegadas) (Hi-Torque command® - referência 2078172 – Abbott vascular) e o cateter-balão semi-complacente (Armada 14 PTA®, referência A1025-020) de 2,5 (dois e meio) mm de diâmetro por 20 (vinte) mm de comprimento (raio balão/artéria de 2,5:1), que foi inserido no lúmen da artéria femoral direita em sentido cranial e sua posição na artéria ilíaca externa direita (AIEd) foi definida pela visualização do ombro proximal do balão justo ao ligamento inguinal dissecado. O cateter-balão foi insuflado pelo tempo de um minuto até a pressão de ruptura do balão (14 atm) com auxílio de insuflador com manômetro da Cook-Medical® (refência CID-20-30), levando a distensão da parede arterial. Após esvaziamento do balão e retirada do conjunto fio guia-balão, procedeu-se a ligadura arterial com o fio de algodão 3-0 acima e abaixo da arteriotomia. Por fim, a pele foi suturada com fio de nylon 4-0. Foram administrados analgésicos (ibuprofeno 10 mg/kg por via oral – diluído em sua água de consumo, por 2 dias) e antibióticos (Ceftriaxona 20mg/kg intramuscular – dose única) para todos os grupos no pós-operatório para evitar sofrimento do animal. Vinte e quatro horas após a realização da cirurgia, iniciou-se a administração das substâncias desta pesquisa nos referidos grupos. (BAUMGARTNER, 1973; GELLMAN et al., 1991; KNOPFHOLZ et al., 2006; NOGUEIRA, 2012; ROLIM, 2012; STADIUS et al., 1994; TAKAGI et al., 1997)

Vídeo 1 (na versão digital) – Indução da hiperplasia miointimal



Fonte: Acervo pessoal do autor.

➤ **Substâncias e grupos:**

O grupo A (*Allium sativum*) recebeu 800 mg/kg de *Allium sativum* (CAMPBELL et al., 2001; EFENDY et al., 1997), *in natura* e masserada, por via oral por 5 semanas. O *Allium sativum*, que é o alho comum, foi adquirido em supermercado, numa única leva. A quantidade individual era pesada diariamente e ofertada para o animal por via oral, *in natura*, após masserado em pilão.

O grupo S (controle negativo) recebeu 10 mL de soro fisiológico a 0,9% por 5 semanas por via oral com auxílio de seringa de 20mL.

E o grupo C (controle positivo) recebeu a medicação Cilostazol (lote do fabricante 20100201, data de fabricação 02/2010 e data de validade 02/2013, origem China, fabricante ZHENJIANG HAISEN, lote interna 1086) na dose de 50 mg/dia (TSAI et al., 2008) por 5 semanas por via oral. Este medicamento era diluído em 10 mL de água portátil e administrado via oral por seringa de 20 mL.

➤ **Eutanásia**

As substâncias foram administradas por um período de 5 semanas, término no qual os animais foram anestesiados pela técnica acima descrita e coletado nova amostra de sangue para nova dosagem do perfil lipídico pós-substâncias. Os animais sofreram eutanásia sob dose letal do anestésico (pentobarbital 150mg/kg) (GUZELOGLU et al., 2012; NOGUEIRA, 2012; ROLIM, 2012; TSAI et al., 2008) e foram coletados por via transabdominal, na seguinte ordem: as artérias ilíacas externas direitas submetidos à injúria pelo balão por meio de procedimento cirúrgico, num segmento logo acima do ligamento inguinal até a bifurcação da aorta e o lobo esquerdo do fígado.

➤ **Análise histológica e morfométrica**

As peças arteriais e hepáticas foram fixadas em formalina a 10% por no mínimo 24h e, em seguida, levados para o preparo rotineiro de lâminas histológicas para microscopia óptica: desidratação gradativa e crescente de álcool a 70% até o álcool absoluto – diafanização em xilol crescentes e embebição em parafina líquida a 60°C, e preparação dos blocos de parafina.

Os blocos de parafina foram cortados no micrótomo com espessura de 3

(três) μm e os cortes montados em lâminas de vidro extra-finas (76 x 25 mm), em seguida, foram coradas com HE (hematoxilina-eosina) para estudo da morfologia geral (ASADA et al., 1996; LARSON et al., 2011; NOGUEIRA, 2012; PLATE et al., 1989; ROLIM, 2012; WAKSMAN et al., 2008; WISSOWZKY, 1876), a qual foi usada para os vasos e fígado dos animais, Verhoeff para estudo das fibras elásticas nos vasos (VERHOEFF, 1908) e Tricrômio de Masson para estudo morfológico geral (só dos vasos) e definição das fibras elásticas, colágenas e musculares (MASSON, 1929); em seguida, montadas com lamínulas e resina natural; as lâminas foram preparadas e examinadas por patologista nas objetivas de 2,5X, 10X e 40X.

Também foram realizadas imunoistoquímica para os vasos com HHF35 monoclonal da marca Dako® código M0635 (Anexo H) (ALESSI et al., 2010; ASADA et al., 1996; HIRSCH; KARNOVSKY, 1991; STADIUS et al., 1994; TSUKADA et al., 1987) para determinar as reações invasivas de células musculares lisas nas camadas da artéria e C4d policlonal da marca Spring Bioscience® código E17344 (Anexo I) (COHEN et al., 2012; DE SERRE et al., 2008) para estudar a reação imunológica do complemento no endotélio vascular. A imunoistoquímica foi realizada pelo serviço de patologia **APC** (Apoio em Patologia Cirúrgica - www.apclab.com.br).

Para a morfometria, foi utilizado o microscópio óptico da marca Bioval®, o programa ToupTekView® versão x86 3.7.2270 (copyright 2003-2013 - <http://www.touptek.com>) e a câmera digital Opticam® de 14 MP. A percentagem da área miointimal foi calculada pelo programa ImageJ 64 onde a imagem do vaso foi trabalhada da seguinte forma (Figura 2):

Figura 2 – Cálculo do índice de hiperplasia miointimal



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Eliminada a área da adventícia do vaso

A imagem restante foi transformada em 8 bits

- O restante da imagem formada pela luz do vaso e camada miointimal foi transformada em máscara de 8 bits e medida essa área em pixels, essa área foi chamada de área total
- Em seguida, foi medida só a área da luz do vaso
- A área da camada miointimal foi calculada em pixels, subtraindo a área da luz da área total (área da camada médio-intimal com a luz)
- A percentagem (índice) então foi realizada, dividindo-se a área da camada miointimal pela área total.

Para a esteroscopia das imunistoquímicas HHF35 e C4d, foi realizada 3 (três) fotos de campos aleatórios, na objetiva de 40x, de cada lâmina de cada animal de cada grupo. Em seguida, foi utilizado o teste dos 36 pontos (Figura 3)

(MANDARIM-DE-LACERDA, 2003), onde a área dos imunomarcadores foi calculada pela fórmula:

$$A = Vv / 2Qa \mu\text{m}^2$$

Onde:

Vv (densidade de volume do imunomarcador) foi estimada por contagem de pontos (teste dos 36 pontos)

$$Vv = Pp / Pt$$

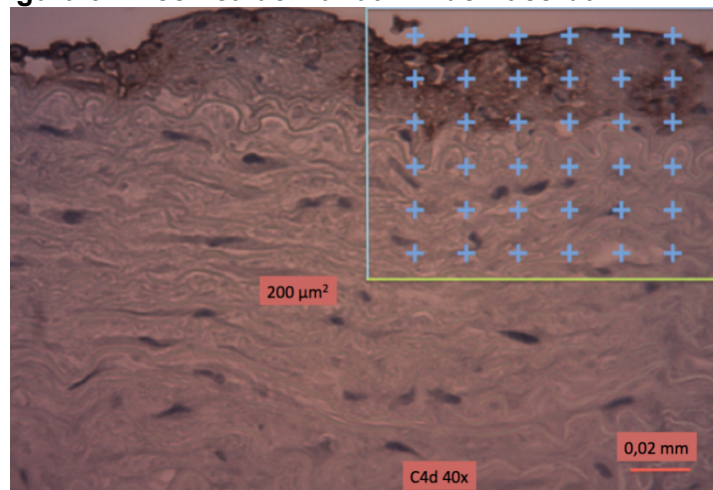
sendo: **Pp** é o número de pontos que tocam os imunomarcadores e **Pt** é o número total de pontos da área teste de 200 (duzentas) μm^2 , que em nosso caso, foi 36 (trinta e seis) pontos.

Qa (densidade numérica por área de núcleos) foi estimada pela fórmula:

$$Qa = N / At$$

sendo: **N** o número de núcleos contados dentro da área teste e **At** é a área teste que utilizei, a qual se utilizou $200 \mu\text{m}^2$.

Figura 3 – Técnica de Mandarim-de-Lacerda



Fonte: Acervo pessoal do Autor.

➤ Lipidograma

Ao fim da coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas, a 5000 (cinco mil) rotações por minuto para separação do soro sanguíneo, e encaminhadas para o

laboratório de análise do Hospital Universitário Luceano Wanderley da UFPB onde foram realizados o lipidograma. Para análise dos lipídeos plasmáticos foram determinadas as concentrações do colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicerídeos (TG), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) a partir do soro isolado por centrifugação de cada animal. As determinações do lipidograma foram realizadas pelo método enzimático colorimétrico (FOSSATI; PRENCIPE, 1982), utilizando *kit* enzimático da Labtest[®] (Anexos C a E) e analisador colorimétrico automático. A concentração de LDL e VLDL no plasma foi calculada baseando-se na fórmula de Friedewald, Levy e Fredrickson (1972), onde:

- $LDL = (CT - HDL) - (TG / 5) \text{ mg/dL}$
- $VLDL = TG/5 \text{ mg/dL}$

O lipidograma foi dito inicial para o sangue colhido no dia da cirurgia (angioplastia por balão) e foi dito final para o sangue colhido no dia da eutanásia, ao término da administração das substâncias testadas.

➤ **Mascaramento**

O mascaramento, para a microscopia, foi realizado pela troca da letra e número da marcação inicial, por outra letra e número conhecidos apenas pelo pesquisador principal, sendo a nova identificação guardada em envelope opaco e selado, que só foi aberto no momento da análise dos dados. O patologista não sabia qual método foi utilizado nas estruturas alvos.

3.5 Variáveis

3.5.1 Variável primária

A diferença da média de frequência do índice de espessura da camada miointimal foi utilizada para determinar a eficácia do tratamento à hiperplasia miointimal, que foi avaliada por morfometria; os valores foram em área (num corte transversal da artéria, a área da parede do vaso, formada pela íntima e média, foi dividida pela área formada por essas camadas mais a luz do mesmo) e, em seguida, realizada a média de cada grupo. A diferença dessas médias é que

foi utilizada para afirmar qual tratamento foi mais eficaz.

3.5.2 Variáveis secundárias

A média de frequência do índice de espessura da camada miointimal de cada grupo: está diretamente relacionada à área de hiperplasia da camada miointimal. Quanto maior o índice de espessura maior foi a hiperplasia miointimal.

Imunoistoquímica: localização histoquímica de substâncias imunorreativas, utilizando anticorpos marcados com reagentes (BIREME, 2014). O reagente revelador utilizado foi a peroxidase. Foram raizados HHF 35 monoclonal e o C4d policlonal:

- **Área de positividade do marcador HHF35:** é a quantificação em μm^2 da área marcada positivamente pelo marcador imunoistoquímico HHF35, que é um marcador para células musculares lisas. Se há positividade deste marcador na íntima do vaso, é decorrente a invasão ou modificação celular local em músculo liso. Foi utilizado o protocolo do Anexo I.
- **Área de positividade do marcador C4d:** é a quantificação em μm^2 da área marcada positivamente pelo marcador imunoistoquímico C4d, que é um componente imunológico do complexo complemento. Se há inflamação local, mediada pelo
- complemento C4d, ela será positiva. Foi utilizado o protocolo do Anexo J.

Colesterol total: Foi medido por teste enzimático colorimétrico (Anexo C) e medido em mg/dL.

HDL: Foi medido por teste enzimático colorimétrico (Anexo D) e medido em mg/dL.

LDL: essa lipoproteína de baixa densidade foi calculada pela fórmula de Friedewald (acima descrita) e os valores representados em mg/dL.

VLDL: calculado pela relação 5:1 entre a lipoproteína de muito baixa densidade e o triglicérido determinada por Friedewald, Levy e Fredrickson (1972). Os valores foram dados em mg/dL.

Triglicerídeo: foi medido por teste enzimático colorimétrico (Anexo E) e medido em mg/dL.

3.5.3 Dados complementares

Peso corporal do animal: tentou-se manter uma faixa de peso em comum para se ter um calibre mais uniforme dos vasos alvos do estudo. Os animais foram pesados em balança digital de precisão. Serviu para avaliar o estado nutricional dos animais.

Idade: Mantevesse uma faixa etária em comum para se ter um calibre mais uniforme dos vasos alvos do estudo.

Frequência de esteatose hepática: infiltração lipídica das células parenquimatosas hepáticas, resultando em um fígado de coloração amarelada. O acúmulo anormal de lipídeos, normalmente, é sob forma de triglicerídeos, como uma única gota grande ou múltiplas gotículas. O fígado gorduroso é causado por um desequilíbrio no metabolismo de ácidos graxos (BIREME, 2014). Para caracterizar se a dieta hipercolesterolêmica ocasiona dano ao fígado. Foi mensurado como variável qualitativa por microscopia de luz, nas objetivas de 10 e 40x.

Frequência de colangite: inflamação do sistema ductal biliar (VIAS BILIARES), intra-hepático, extra-hepático ou ambos (BIREME, 2014). Para determinar a toxicidade das substâncias. Também foi mensurado como variável qualitativa por microscopia de luz, nas objetivas de 10 e 40x.

Microscopia: foi realizada por microscopia óptica de luz.

3.6 Método estatístico

3.6.1 Cálculo do tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi arbitrado em 30 (trinta) coelhos, sendo 10 (dez) para cada grupo estudado; uma vez que na literatura, há trabalhos, que comprovem resultados estatísticos aceitáveis com número menor de animais no experimento com modelo animal semelhante, tais como Cortelekoglu, 2006; Santos, 2008; Brasselet, 2008 e outros (ALESSI et al., 2010; BRASSELET et al., 2008; CORTELEKOGLU et al., 2006; EFENDY et al., 1997; GUZELOGLU et al., 2012; KWON et al., 2003; LIDDELL et al., 2005; NOGUEIRA, 2012; PLATE et al., 1989;

ROLIM, 2012; SANTOS, 2008; STADIUS et al., 1994; WAKSMAN et al., 2008; YASUDA, S. et al., 2002).

Realizou-se, também, o cálculo do tamanho da amostra, utilizando a calculadora *online* LEE (Laboratório de Epidemiologia e Estatística), no site gratuito: http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/di_1_pro_tes.html, o qual resultou num $n= 7$ (sete) para cada grupo. Para o cálculo do teste de estimação de uma média, foram utilizados os seguintes parâmetros:

- Desvio padrão: 4
- Erro máximo da estimativa: 3
- Nivel de significância: 5%
- Poder do teste: 95%
- Teste de hipótese: bicaudal

3.6.2 Análise estatística

Os dados foram coletados em um formulário padronizado e armazenados em uma planilha eletrônica (Microsoft Excel® 2011, para Mac. EUA). As entradas de dados foram realizadas de forma independente.

A análise descritiva foi realizada, calculando o intervalo de confiança de 95% (DORIA FILHO, 1999; DOUGLAS JR et al., 2005; FLETCHER, R.; FLETCHER, S., 2011; HULLEEY et al., 2008) para cada variável estimada. Os cálculos foram realizados com o auxílio do aplicativo estatístico Prism 6 para Mac OS X versão 6.0b (3 de outubro de 2012).

3.6.2.1 Variável primária analisada

A diferença de frequência da média de hiperplasia miointimal.

3.6.2.2 Hipóteses Estatísticas

- H_0 : $M_A = M_C = M_S$ (As médias de hiperplasia miointimal são iguais entre os grupos)
- H_1 : $M_A \neq M_C \neq M_S$ (Há diferença entre as médias de hiperplasia miointimal nos grupos)

3.6.2.3 Testes Estatísticos

Foram utilizados os testes ANOVA (*One-way e Two-way*) (GUZELOGLU et al., 2012; NOGUEIRA, 2012; ROLIM, 2012) com os testes de confirmação: Brown-Forsythe, Bartlett e Tukey (multi-comparativo) para os dados quantitativos (variáveis contínuas), sendo o ANOVA *One-way* para os dados transversais e o ANOVA *Two-Way* para os dados temporais (observacionais); e o teste Qui-quadrado (X^2) para os dados qualitativos (variáveis categóricas), ambos com hipótese bicaudal (DORIA FILHO, 1999; DOUGLAS JR et al., 2005; FLETCHER, R.; FLETCHER, S., 2011; HULLEY et al., 2008).

Para a realização dos testes acima citados, foi utilizado o programa GraphPad Prisma® (Versão 6, para Mac OS X, GraphPad Software Inc., San Diego, CA de 3 de outubro de 2012), o qual realiza, automaticamente, a normalização de todos os dados.

3.6.2.4 Valor de Alfa

Foi utilizado o valor de alfa (α) menor que 0,05 no teste estatístico para rejeitar a hipótese de nulidade.

3.6.2.5 Apresentação dos resultados

Foram utilizados tabelas e gráficos para a apresentação dos dados e os valores de alfa foram apresentados com até quatro casas decimais.

4 RESULTADOS

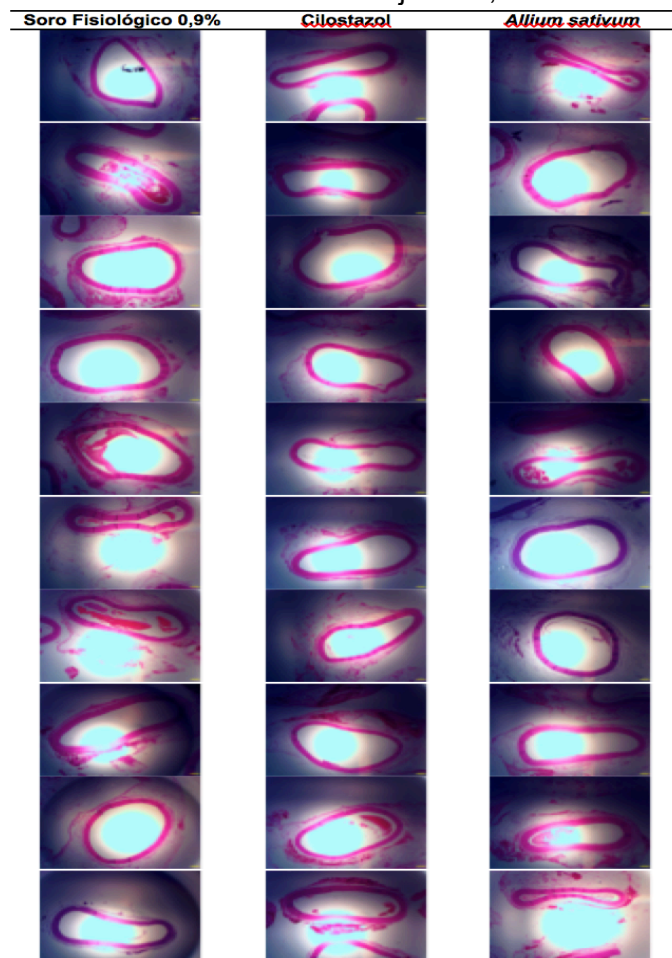
4.1 Caracterização da amostra

4.1.1 Variáveis

4.1.2 Variável primária

Pela observação estrutural, na objetiva de aumento de 2,5x, num corte transversal do vaso, para poder ver o vaso em sua totalidade, utilizando a coloração HE, não se pôde caracterizar qual foi o grupo que teve menor ou maior hiperplasia miointimal (Figura 4).

Figura 4 – Fotos histológicas das artérias ilíacas externas direitas individuais de cada grupo. Coloração HE. Cortes transversais. Objetiva 2,5x



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Em decorrência dessa não caracterização visual de superioridade entre os grupos, foi realizado a morfometria digital, pela técnica descrita nos métodos,

obtendo-se os resultados individuais da Tabela 1.

Tabela 1 – Dados individuais do cálculo do índice de hiperplasia miointimal

Grupo	Área da parede (pixels)	Área total (pixels)	Índice de hiperplasia
S	881581	2967936	29,70%
S	1756363	3863423	45,46%
S	1190502	3280840	36,29%
S	2144308	5624951	38,12%
S	1275495	4309356	29,60%
S	1340630	3666298	36,57%
S	1148018	3081897	37,25%
S	1657046	3887973	42,62%
S	918578	3143076	29,23%
S	1042151	3204196	32,52%
A	1041045	8624835	12,07%
A	1513716	5651451	26,78%
A	1270260	7007616	18,13%
A	1544997	6127809	25,21%
A	1373622	7333881	18,73%
A	1522047	7172680	21,22%
A	1894053	6032066	31,40%
A	1103385	6006933	18,37%
A	1350686	6478470	20,85%
A	1357074	7349916	18,46%
C	1276786	7617418	16,76%
C	1315643	6679041	19,70%
C	1299995	6337708	20,51%
C	896725	7600101	11,80%
C	923192	7465591	12,37%
C	1466373	6186285	23,70%
C	949863	7445130	12,76%
C	892619	6580439	13,56%
C	971013	6604380	14,70%
C	1069265	6598063	16,21%

S – Soro Fisiológico 0,9% A- *Allium sativum* C-

Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

A partir desses dados da Tabela 1, foi realizado o teste estatístico de ANOVA *One-Way* (Figura 5), obtendo-se os seguintes resultados:

- grupo controle negativo, Soro Fisiológico 0,9%, apresentou um índice médio de hiperplasia de 35,74% com IC de 95%, variando 31,76% a 39,71%;
- grupo controle positivo, Cilostazol, apresentou um índice médio de

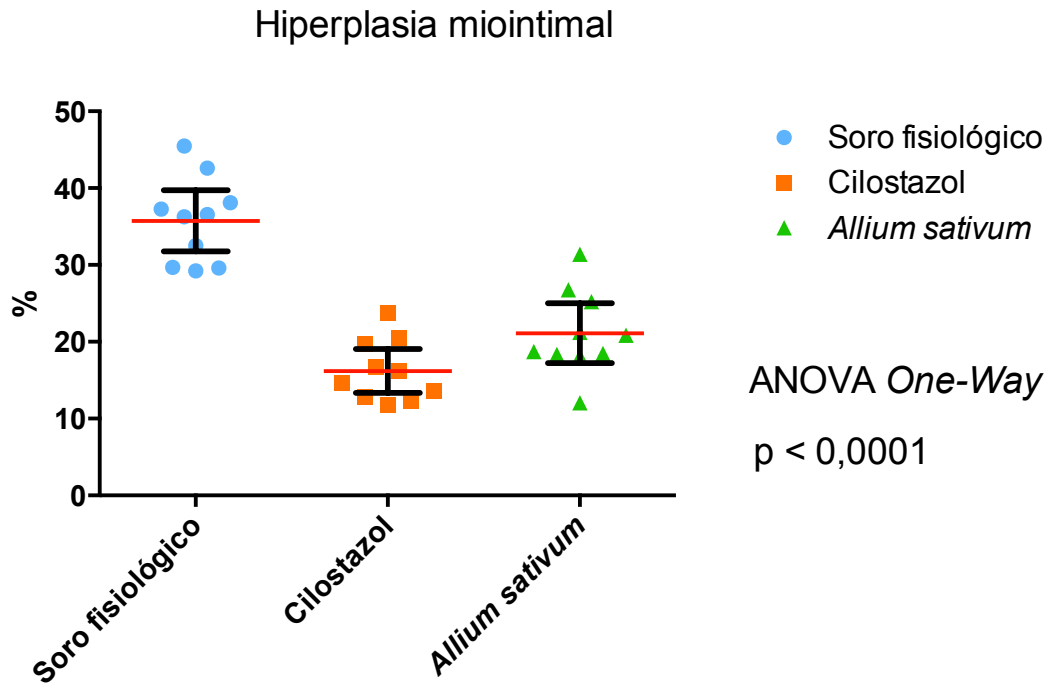
- hiperplasia de 16,21% com IC de 95%, variando 13,36% a 19,05%;
- grupo tratado, *Allium sativum*, apresentou um índice médio de hiperplasia de 21,12% com IC de 95%, variando 17,26% a 25,01%;

O valor de P para os dados acima foi $< 0,0001$.

Para confirmação desses dados foi realizado o teste de Tukey (Figura 6), que confirmou o efeito a favor do cilostazol quando comparado ao soro fisiológico com media de 19,53 com IC 95% variando de 13,94 a 25,12 e $P < 0,0001$, e quando comparado ao *Allium sativum* o P foi igual a 0,0928 com media de -4,92 com IC 95% variando de -10,50 a 0,07. Confirmou também superioridade do *Allium sativum* ao soro fisiológico com $P < 0,0001$ e media de 14,61 com IC 95% variando de 9,03 a 20,20.

Sendo assim o *Allium sativum* e o Cilostazol foram capazes de inibir a hiperplasia miointimal em 40,9% e 54,64% (resultado obtido pelo cálculo matemático da regra de três simples menos 100%), respectivamente, em relação ao controle negativo (Soro Fisiológico 0,9%), demonstrando, assim, a eficácia de ambas. Apesar do cilostazol ter sido em número absoluto, 13,74%, superior ao *Allium sativum*, não há diferença estatística.

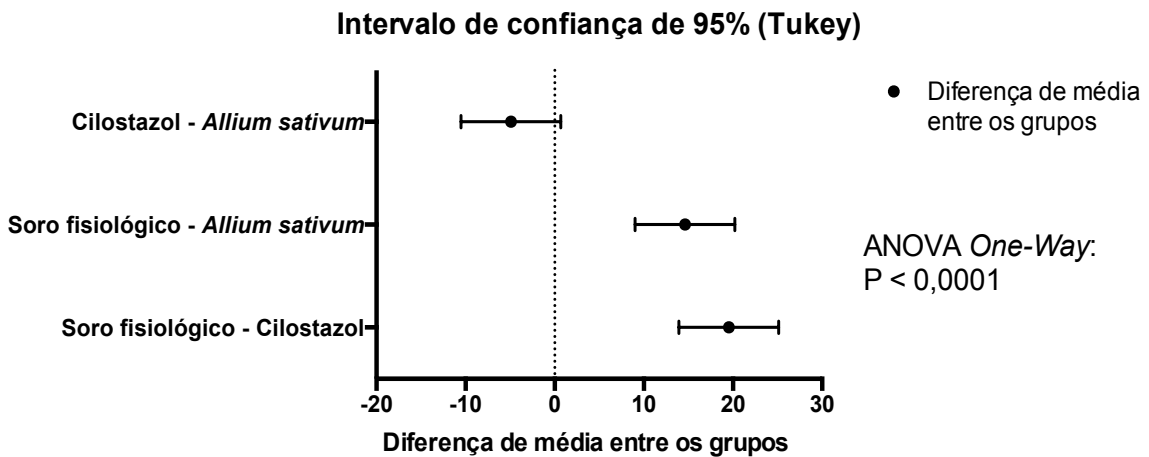
Figura 5 – Média do índice de hiperplasia miointimal



SF 0,9%: média 35.74% CI 95% 31.76% a 39.71%
Cilostazol: média 16.21% CI 95% 13.36% a 19.05%
A. sativum: média 21.12% CI 95% 17.23% a 25.01%

Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

Figura 6 – Teste de Tukey da hiperplasia miointimal



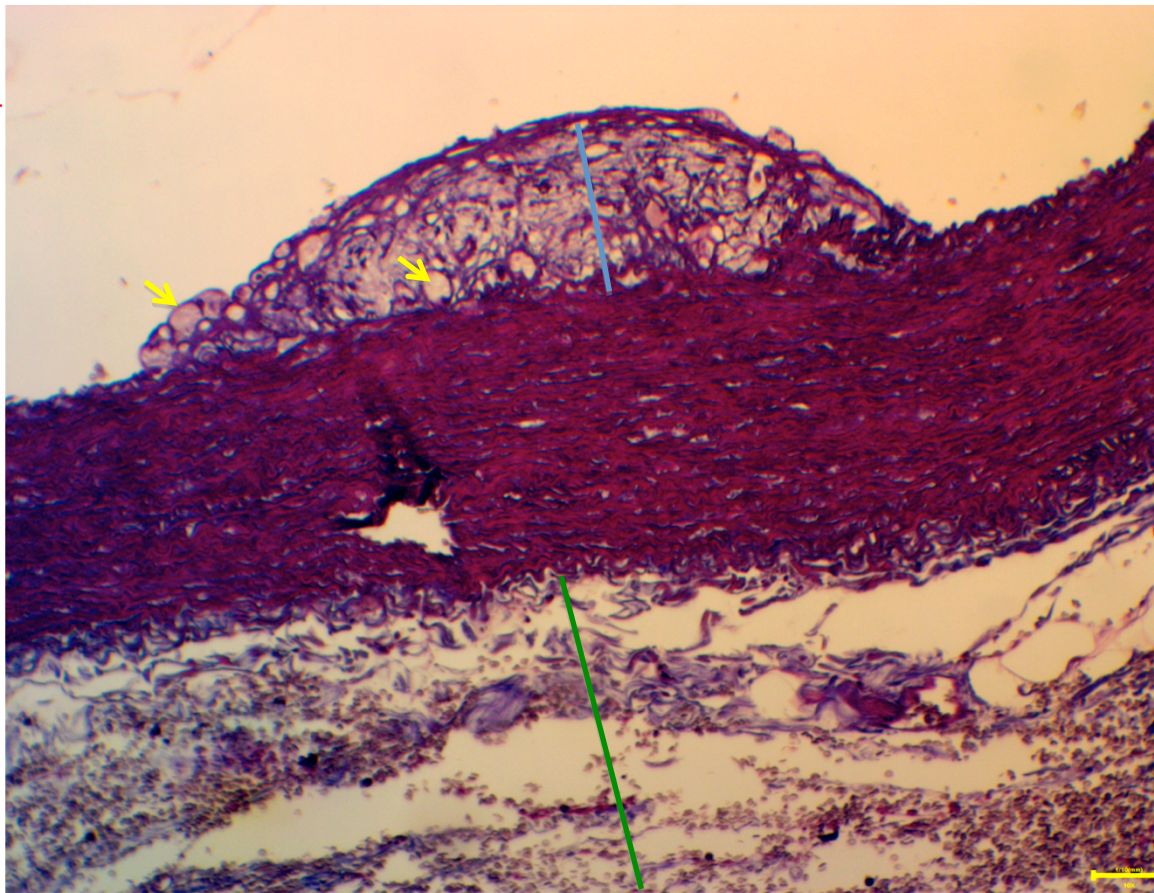
Cilostazol - *Allium sativum*: média -4,92 IC 95% (-10,50 a 0,07) P = 0,0928
 Soro fisiológico 0,9% - *A. sativum*: média 14,61 IC 95% (9,03 a 20,20) P < 0,0001
 Soro fisiológico 0,9% - Cilostazol : média 19,53 IC 95% (13,94 a 25,12) P < 0,0001

Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

Nos resultados morfológicos, pode-se observar que não houve uma padronização da hiperplasia miointimal, pois em alguns animais ocorreu hiperplasia

só da camada íntima caracterizada por sua elevação com invasão para a luz do vaso e a presença de células espumosas sem invasão muscular (Figuras 7, 12 e 17) e em outros com invasão muscular (Figuras 14 e 15). Alguns animais apresentaram modificações só na camada muscular (médica), tendo sido poupada a camada íntima arterial; essas modificações caracterizaram-se por deposição de cálcio em diferentes níveis (Figuras 8, 9 e 16).

Figura 7 – Hiperplasia da íntima isolada

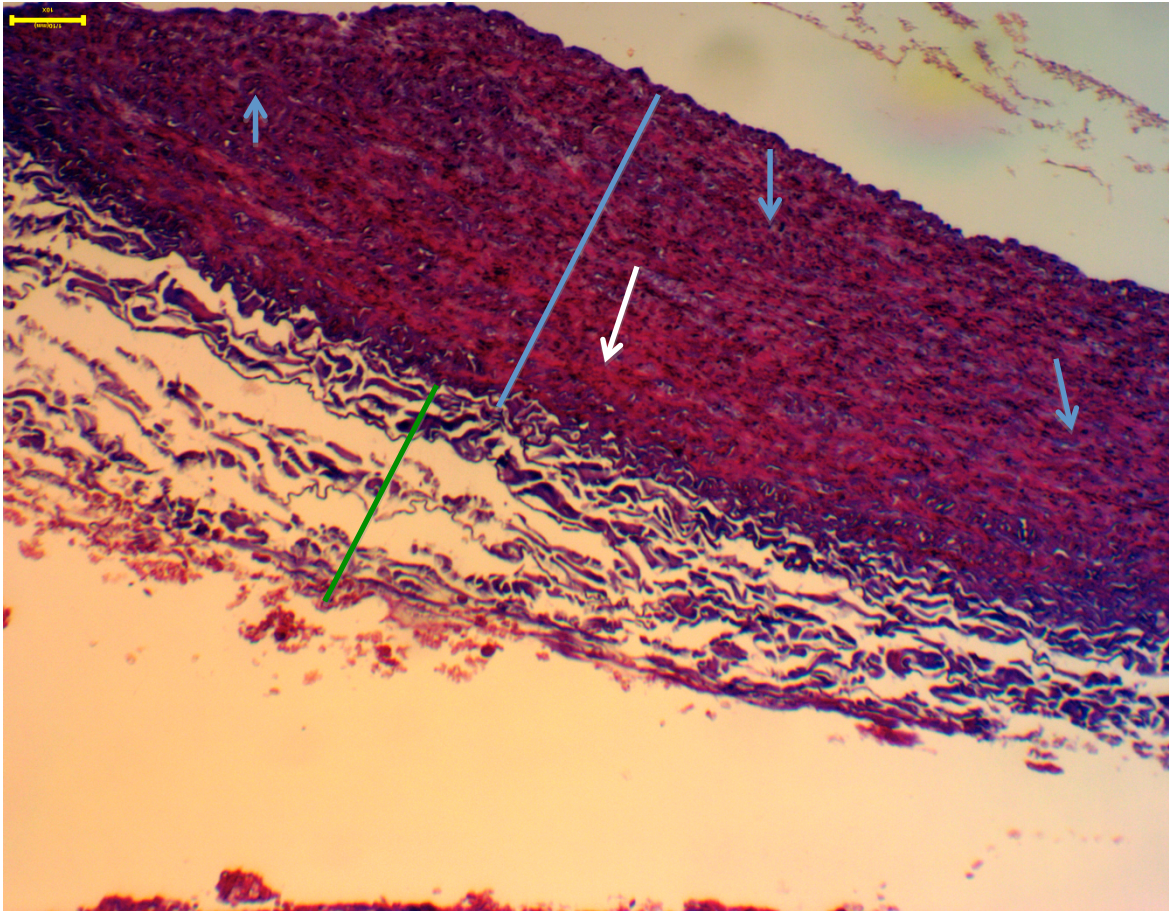


Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Barra azul demonstra a hiperplasia, Setas amarelas demonstram as células espumosas, a camada muscular está corada em vinho, a adventícia demonstrada pela linha verde com as fibras colágenas em ton azulado. Núcleos celulares em preto. Corte transversal - Masson 10x – Escala 1/10 mm. *Allium sativum* (animal 14)

Células espumosas são macrófagos que fagocitaram colesterol LDL oxidado e o acumula em grande quantidade em seu citoplasma.

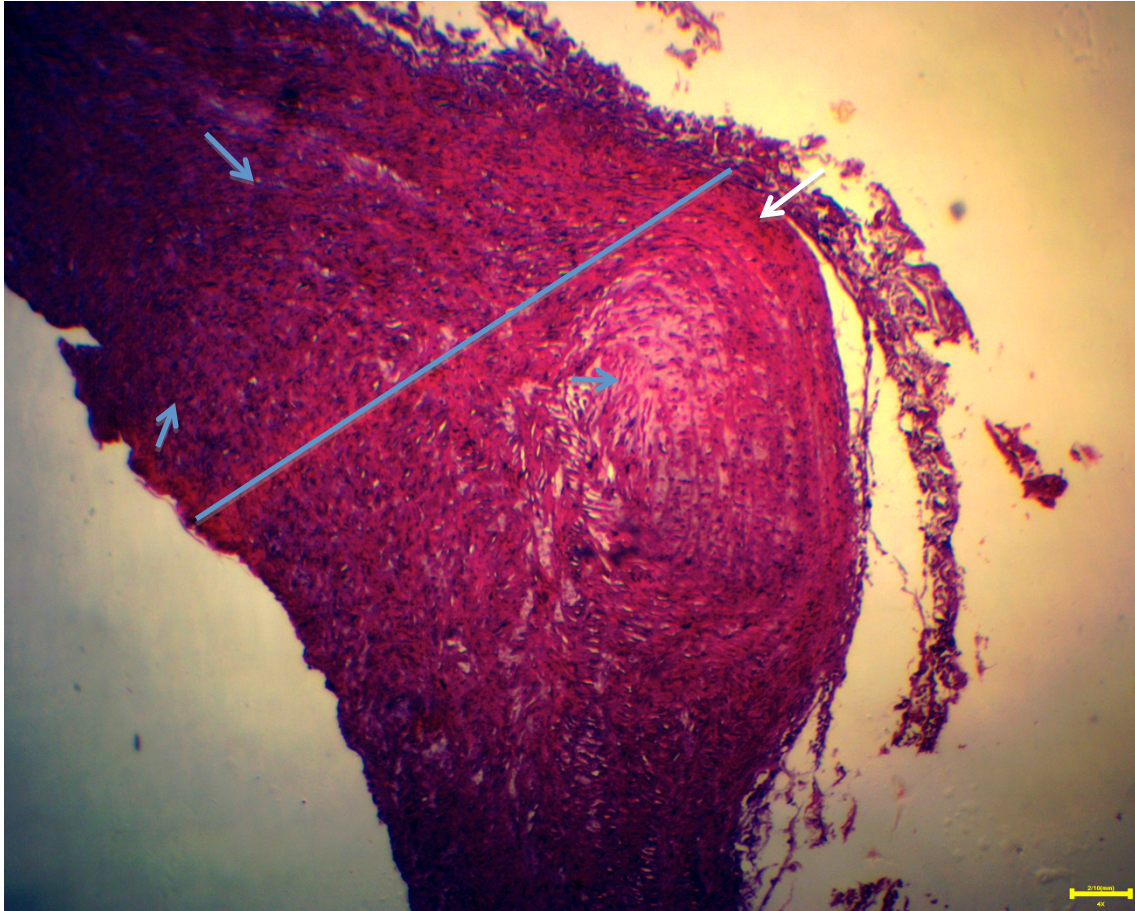
Figura 8 – Calcificações na camada média



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Setas azuis demonstram calcificações. Seta branca mostra muscular normal (em vinho). Reta azul mostra área de hiperplasia miointimal e a verde a cama adventícia com fibras colágenas em ton azulado. Núcleos em preto. Acima das estruturas é a luz do vaso. Corte transversal - Masson 10x - Escala 1/10 mm. Cilostazol (animal 33)

Figura 9 – Calcificações na camada média (externamente)



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Setas azuis demonstram calcificações na camada muscular desestruturando-a. Seta branca mostra muscular normal, reta azul área de hiperplasia miointimal. a camada adventícia está esgarçada à direita da muscular. Corte transversal - Masson 4x – Escala 2/10 mm. *Allium sativum* (animal 13)

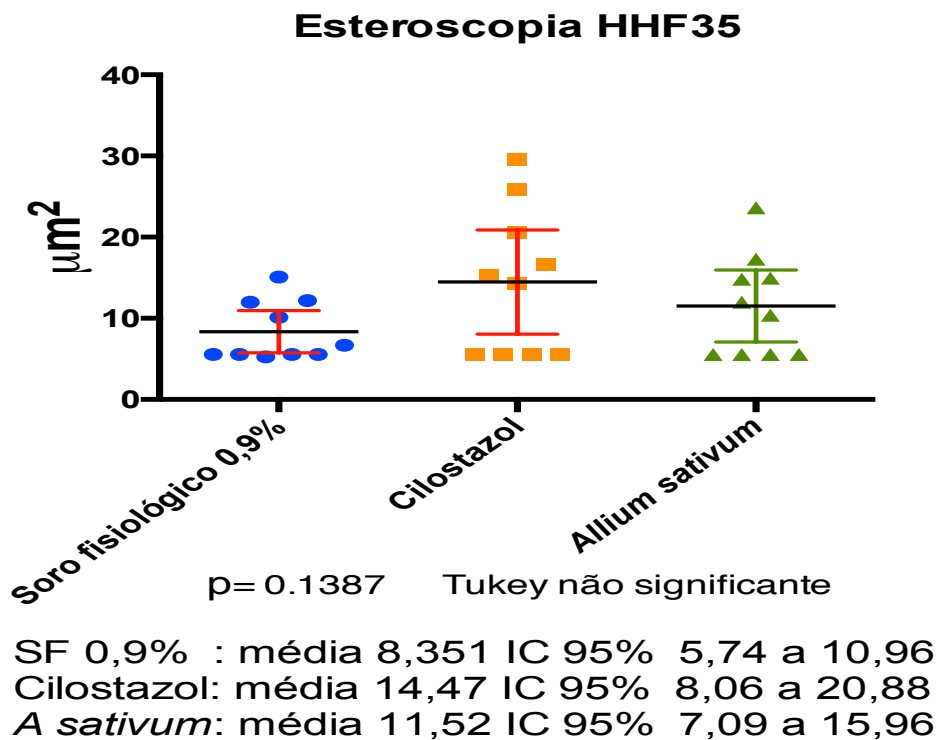
4.1.3 Variáveis secundárias

Considerando a área de invasão ou modificação em células musculares na camada miointimal, caracterizada pelo marcador imunistoquímico HHF35 monoclonal, obteve-se os seguintes resultados:

- grupo controle negativo, Soro Fisiológico teve uma média de $8,35 \mu\text{m}^2$ com IC de 95% variando 5,74 a $10,96 \mu\text{m}^2$;
- grupo controle positivo, Cilostazol, teve uma média de $14,47 \mu\text{m}^2$ com IC de 95% variando 8,06 a $20,88 \mu\text{m}^2$;
- grupo tratado, *Allium sativum*, teve uma média de $11,52 \mu\text{m}^2$ com IC de 95% variando 7,09 a $15,96 \mu\text{m}^2$;

Com $P = 0,1387$ e Tukey não significativo (Figura 10).

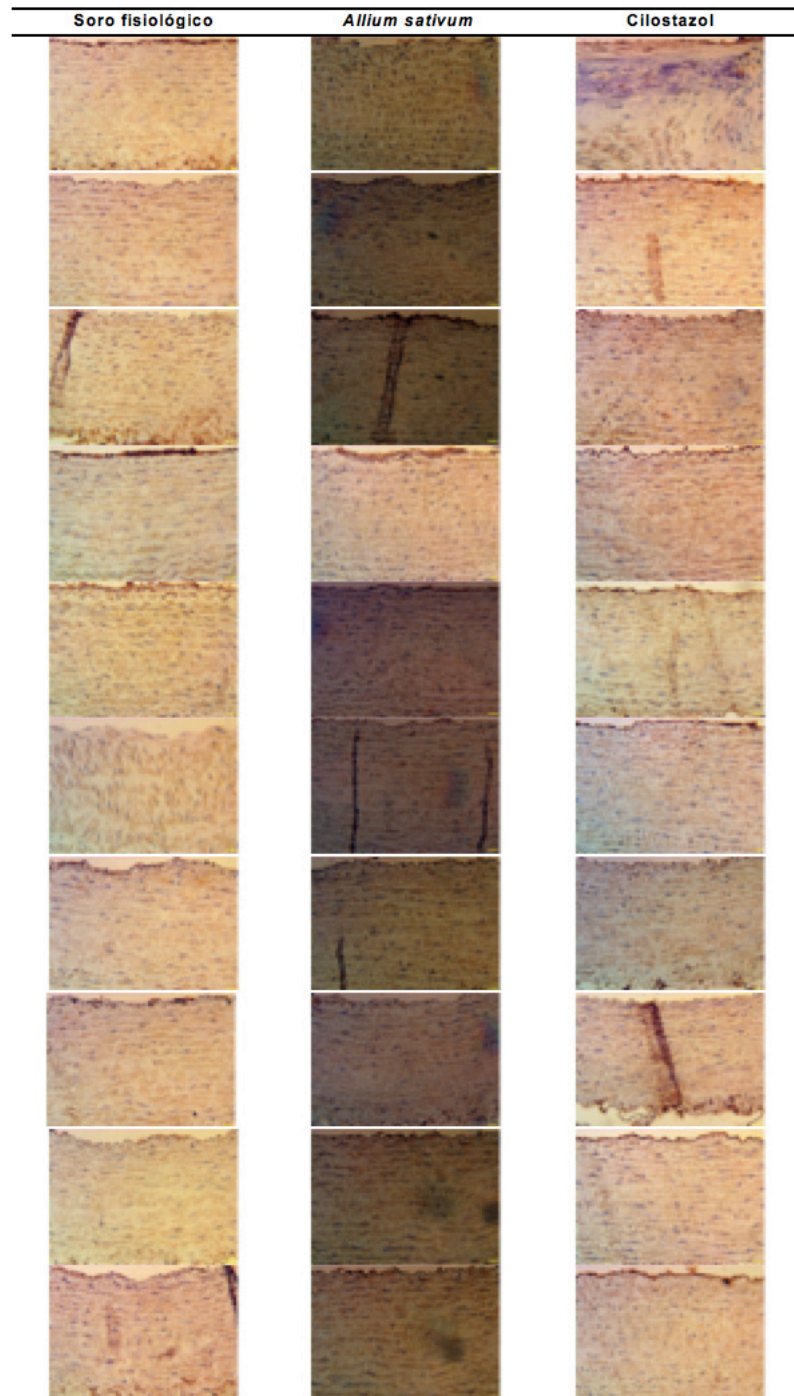
Figura 10 – Média da área do marcador HHF35 monoclonal



Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

A esteroscopia também foi útil, pois como variável qualitativa não pôde ser caracterizada a diferença entre os grupos testados (Figura 11).

Figura 11 – Microfotografias individuais das artérias ilíacas externas dos coelhos em corte transversal. Marcador HHF35 monoclonal. Objetiva 40x



Fonte: Acervo pessoal do autor.

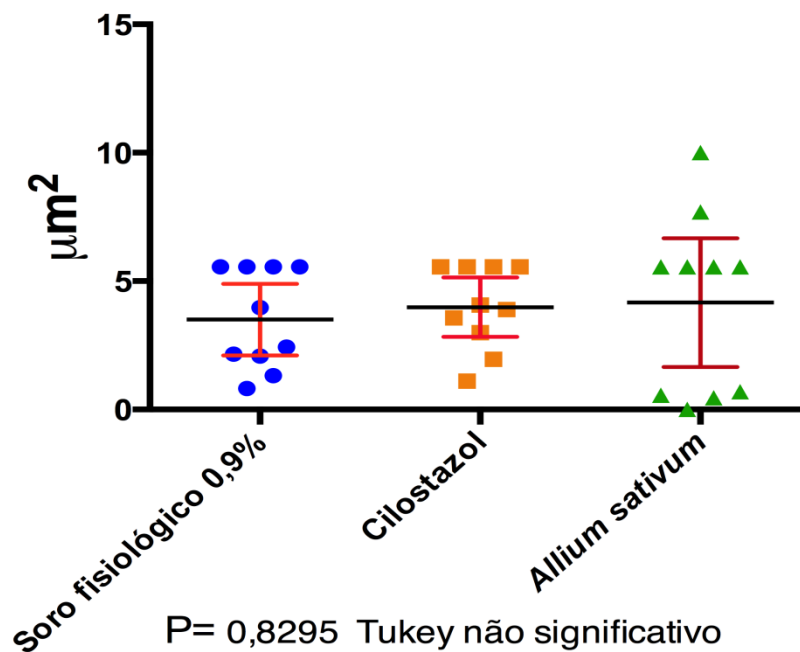
Pela área inflamatória medida pelo sistema imunológico complexo – complemento e caracterizada neste estudo pelo marcador imunistoquímico C4d policlonal, obteve-se os seguintes resultados:

- grupo controle negativo, Soro Fisiológico, apresentou uma média de 3,50 μm^2 com IC de 95% variando 2,11 a 4,89 μm^2 ;

- grupo controle positivo, Cilostazol, teve uma média de $3,98 \mu\text{m}^2$ com IC de 95% variando 2,83 a $5,14 \mu\text{m}^2$;
- grupo tratado, *Allium sativum*, apresentou uma média de $4,16 \mu\text{m}^2$ com IC de 95% variando 1,66 a $6,67 \mu\text{m}^2$;

Com $P = 0,8295$ e Tukey não significativo (Figura 12).

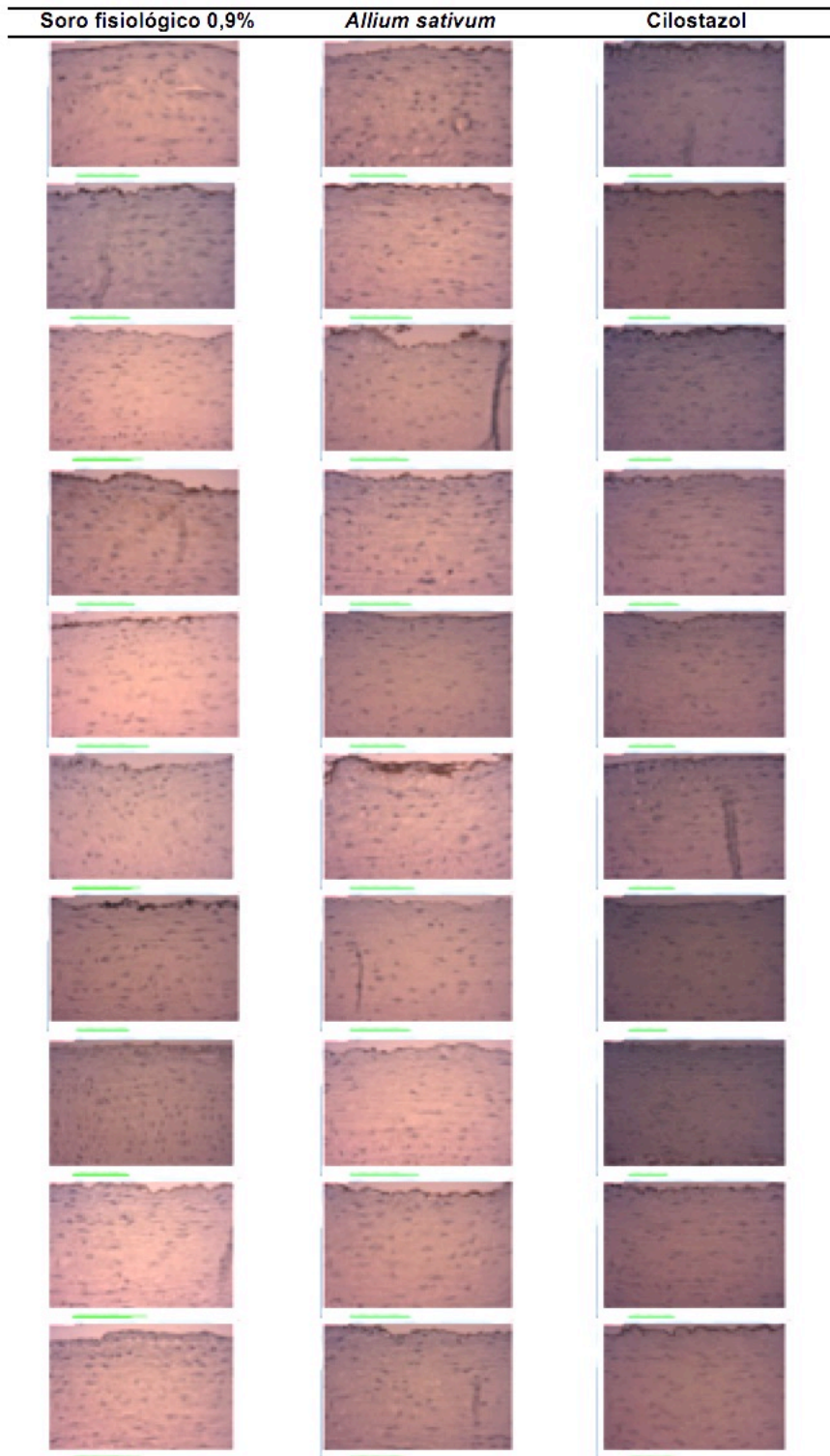
**Figura 12 – Média da área do marcador C4d policlonal
Esteroscopia C4d**



SF 0,9% : média $3,50 \mu\text{m}^2$ IC 95% (2,11 a $4,89 \mu\text{m}^2$)
 Cilostazol: média $3,98 \mu\text{m}^2$ IC 95% (2,83 a $5,14 \mu\text{m}^2$)
Allium sativum: média $4,16 \mu\text{m}^2$ IC 95% (1,66 a $6,67 \mu\text{m}^2$)

Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

Figura 13 – Microfotografias individuais das artérias ilíacas externas dos coelhos em corte transversal. Marcador C4d policlonal. Objetiva 40x

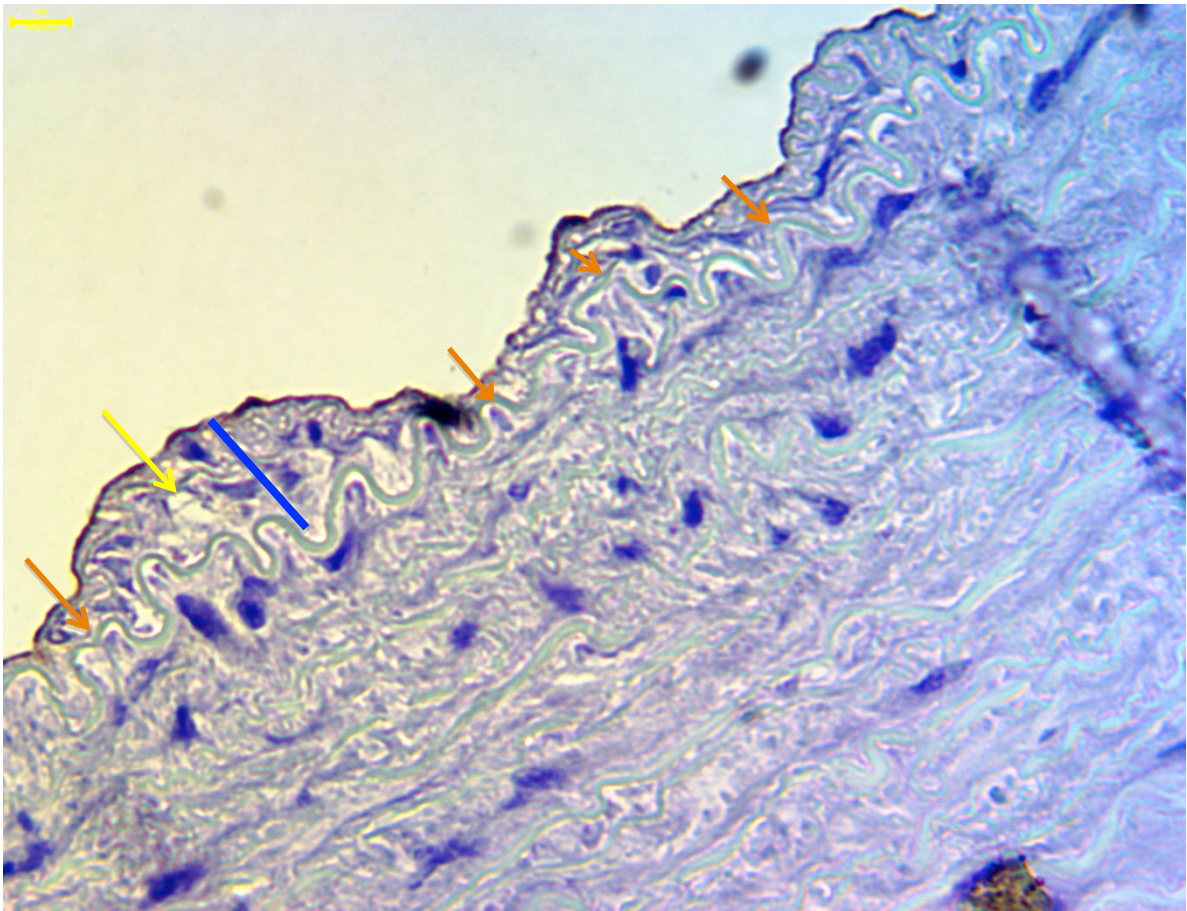


Fonte: Acervo pessoal do autor.

Ao observar o marcador imunistoquímico C4d, não foi possível determinar uma padronização inflamatória na camada íntima (Figura 13), haja vista ter tido animais que tiveram hiperplasia da íntima sem reação inflamatória pelo sistema

complemento (Figura 14) e outros com inflamação (Figura 15). Considerando o marcador imunistoquímico HHF35 monoclonal para células musculares, também não houve um padrão de hiperplasia mioíntimal, pois observou-se animais com hiperplasia com invasão ou metaplasia muscular na íntima vascular (Figuras 16 e 17) como também sem alteração muscular (Figura 19); com o HHF35 monoclonal, pôde-se observar melhor a deposição de cálcio na camada média (Figura 18).

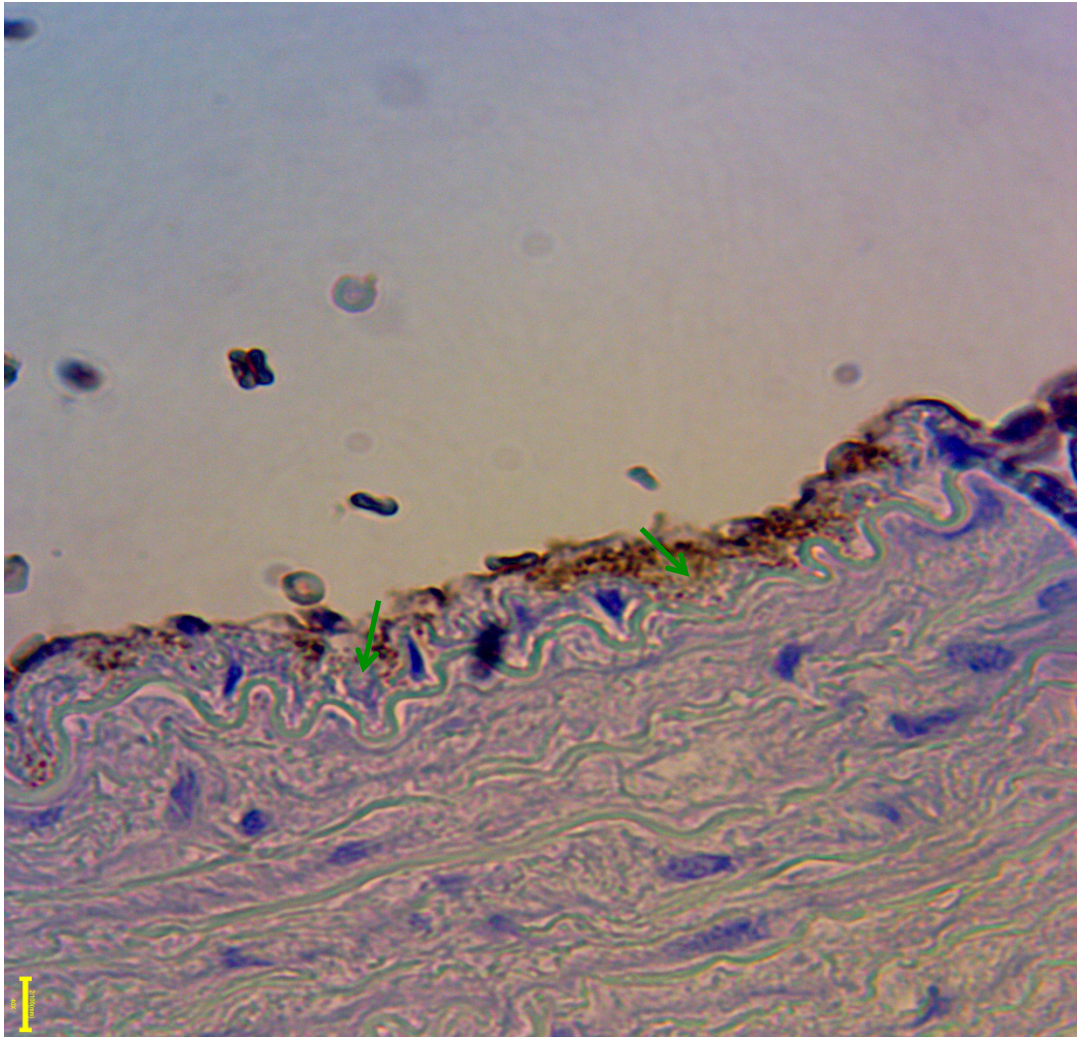
Figura 14 - Hiperplasia sem inflamação ativa na íntima



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Seta amarela mostra célula espumosa, setas laranjas apontam para a membrana limitante elástica interna e a seta azul a hiperplasia. Fibras elásticas são as ondulações em verde azulado claro. Núcleas em azul escuro. Acima da estrutura é a luz do vaso. Corte transversal - C4d 40x – Escala 2/100 mm. *Allium sativum* (animal 06)

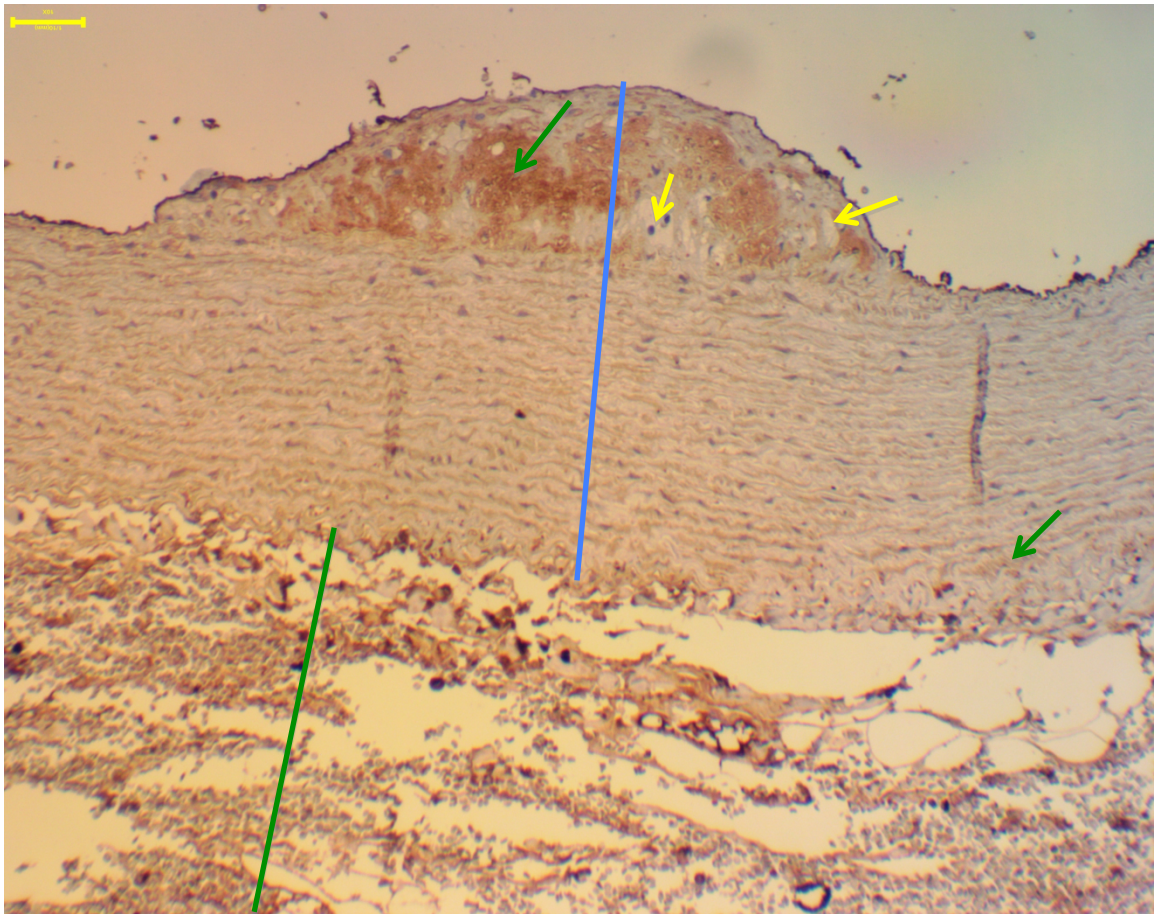
Figura 15 – Hiperplasia com inflamação ativa na íntima



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Setas verdes apontam o C4d positivo (granulação marrom). Núcleos em azul. Acima das estruturas é a luz vascular. Fibras elásticas são as ondulações em verde claro. Corte transversal - C4d 40x – Escala 2/100 mm. *Allium sativum* (animal 14)

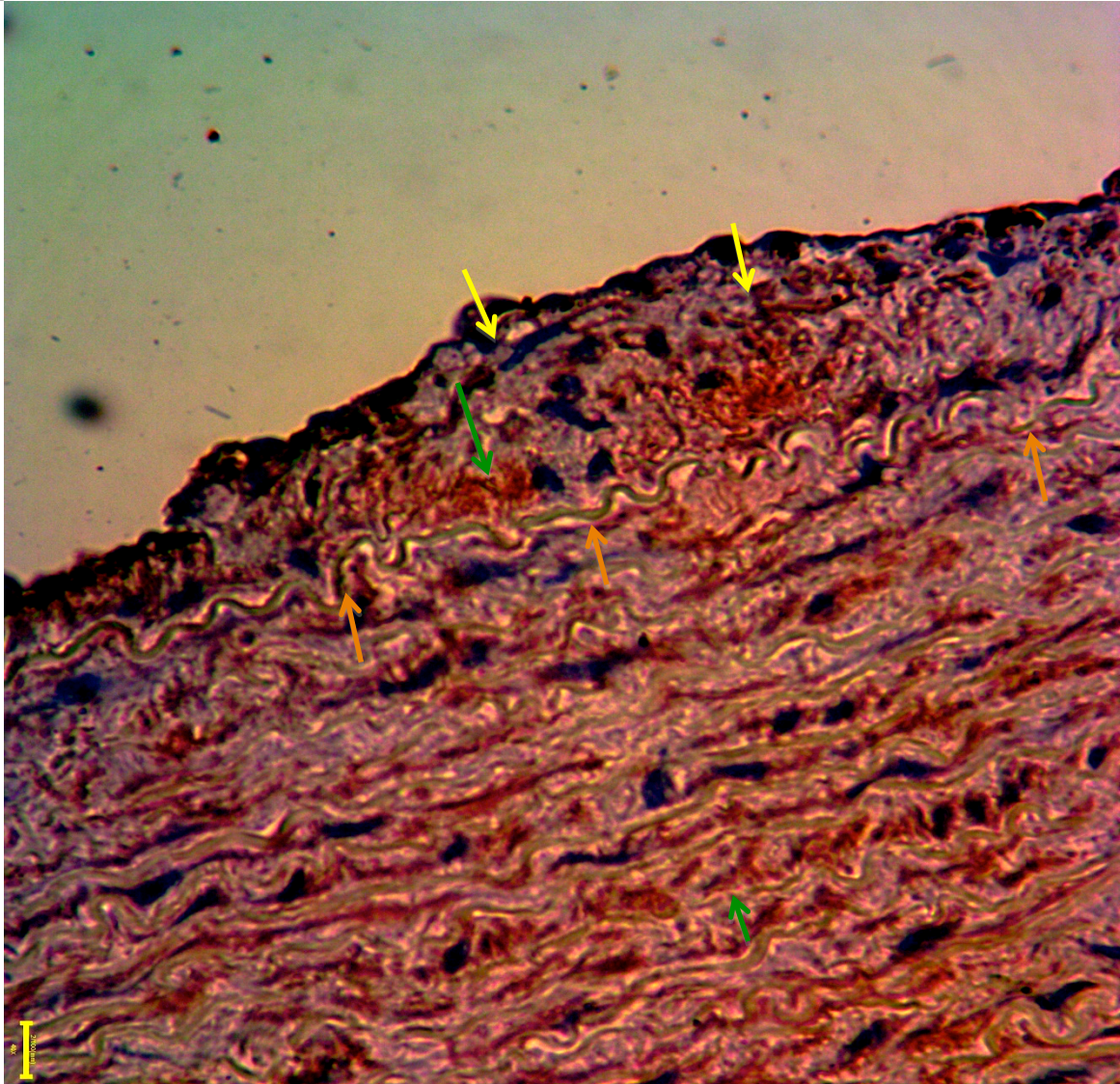
Figura 16 – Hiperplasia com invasão muscular na íntima (A)



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Reta azul mostra a hiperplasia e as setas verdes a positividade do HHF35 monoclonal e as amarelas células espumosas. A reta verde é a adventícia. Os núcleos estão corados em preto. Acima das estruturas está a luz vascular. Corte transversal - HHF35 monoclonal 10x - Escala 1/10 mm. *Allium sativum* (animal 14)

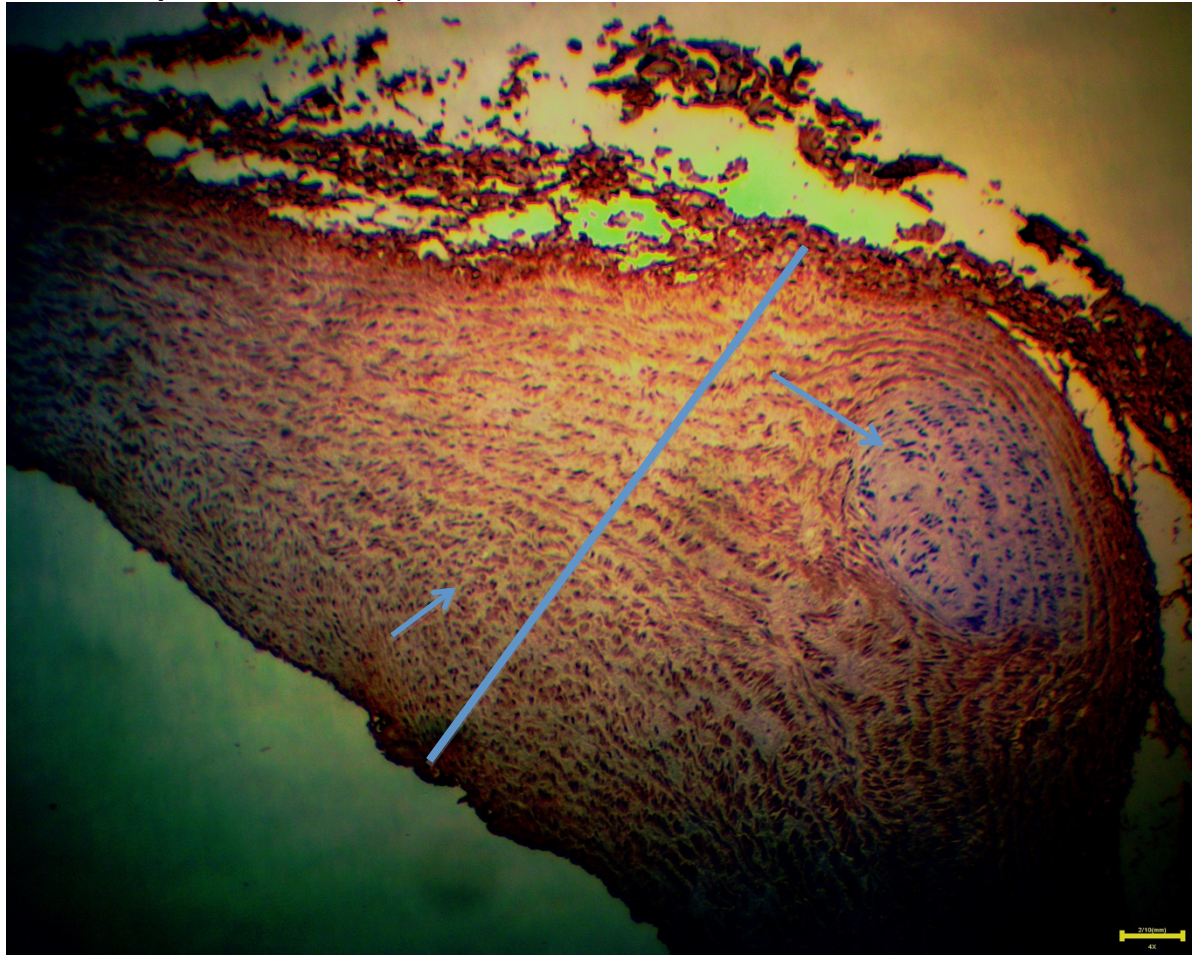
Figura 17 – Hiperplasia com invasão muscular na íntima (B)



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Setas laranjas mostram a membrana limitante elástica interna (MLEI), as amarelas células espumosas e as verdes a positividade do HHF35 monoclonal na hiperplasia da íntima. Muscular em marron abaixo da MLEI. Núcleos em preto. Acima das estruturas está a luz do vaso. Corte transversal - HHF35 monoclonal 40x – Escala 2/100 mm. Soro Fisiológico 0,9% (animal47)

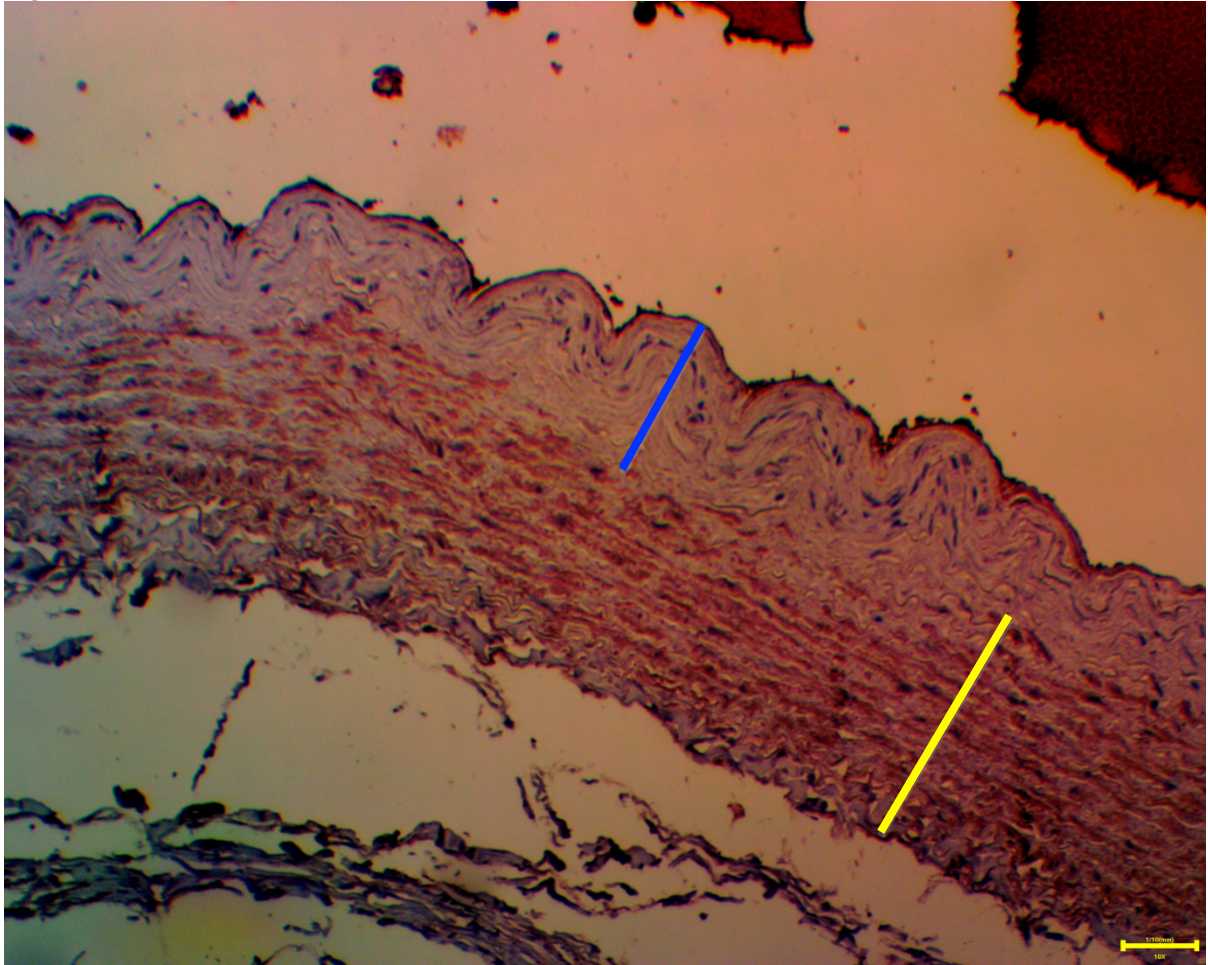
Figura 18 – Substituição do tecido muscular por cálcio (áreas azuladas indicadas pelas setas azuis).



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Nota: Reta azul demonstra a hiperplasia. Núcleos em preto. A camada muscular encontra-se desestruturada. a luz vascular encontra-se abaixo da estrutura. Corte transversal – HHF35 monoclonal 4x – Escala 2/10 mm. *Allium sativum* (animal 13)

Figura 19 – Hiperplasia sem invasão muscular na íntima

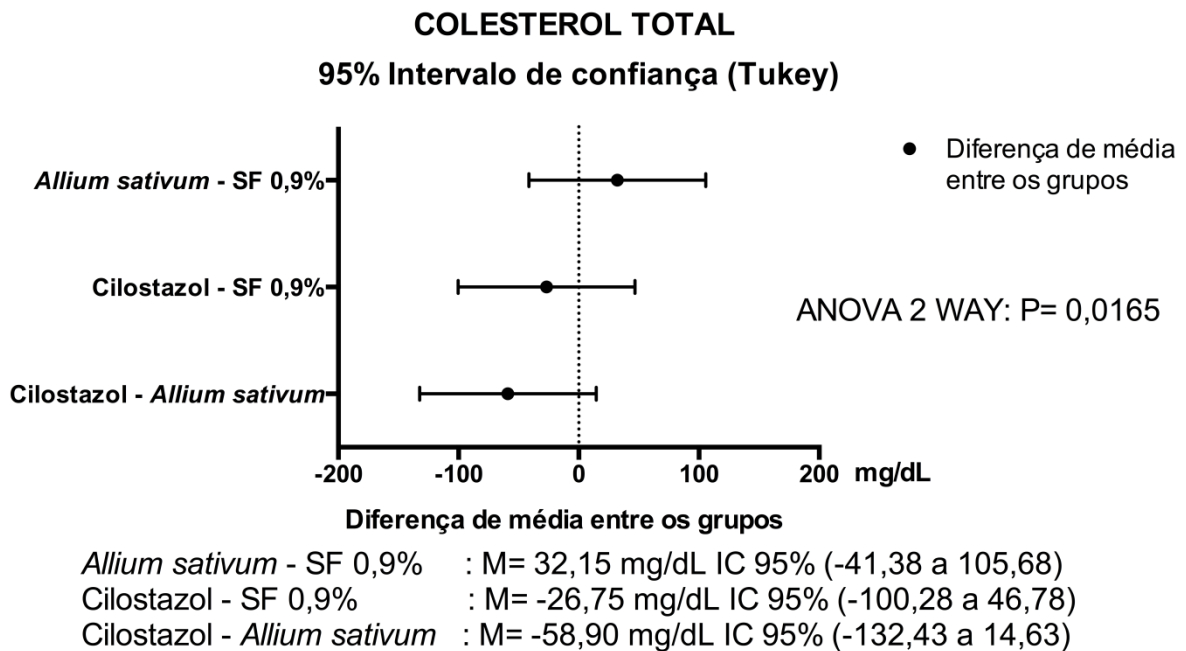


Fonte: Acervo pessoal do autor.

Nota: A reta azul demonstra a hiperplasia limitada à íntima, mas sem invasão muscular. A reta verde amarela demonstra a camada muscular. Abaixo da camada muscular está a adventícia do vaso. Os núcleos estão corados e preto. HHF35 monoclonal 10x - Escala 1/10 mm. Corte transversal Soro Fisiológico 0,9% (animal 47)

Quanto à diferença de média de colesterol total entre os grupos *Allium sativum* e Soro Fisiológico 0,9% obteve-se 32,15 mg/dL com IC 95%, variando de -41,38 a 105,68 mg/dL. Entre os grupos Cilostazol e Soro Fisiológico 0,9%, a diferença de média entre esses grupos foi de -26,75 mg/dL com IC 95% variando de -100,28 a 46,78 mg/dL. Já entre os grupos Cilostazol e *Allium sativum*, a diferença de média foi de -58,90 mg/dL com IC 95% de -132,43 a 14,63 mg/dL. O cálculo do ANOVA *TWO-WAY* teve $P = 0,0165$, mas com teste de Tukey não significante, logo não houve diferença entre os três grupos, quanto ao colesterol total (Figura 20). Ver também os valores absolutos na Tabela 2.

Figura 20 – Estatística da média de colesterol total entre os grupos



Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

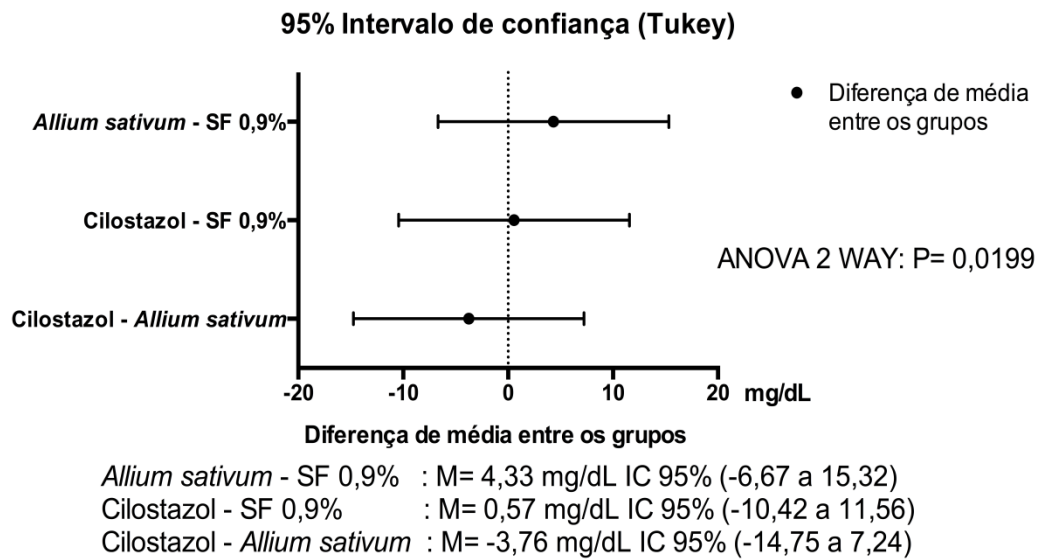
Tabela 2 – Valores absolutos de colesterol total (mg/dL)

Cilostazol		Allium sativum		Soro Fisiológico 0,9%	
Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
46,	30,	48,	36,	48,	50,
32,	34,	36,	49,	35,	59,
31,	29,	23,	36,	194,	97,
44,	34,	80,	43,	37,	39,
37,	33,	39,	39,	35,	38,
39,	50,	30,	29,	45,	41,
37,	46,	44,	28,	28,	28,
42,	26,	20,	82,	25,	34,
24,	29,	897,	228,	40,	31,
40,	28,	62,	40,	302,	40,
Média 35,55 (IC 95% 31,72 a 39,38)		94,45 (IC 95% -23,41 a 212,3)		62,30 (IC 95% 25,55 a 99,05)	

Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

A diferença de média de colesterol HDL entre os grupos *Allium sativum* e Soro Fisiológico 0,9% foi de 4,33 mg/dL com IC 95%, variando de -6,68 a 15,32 mg/dL. Entre os grupos Cilostazol e Soro Fisiológico 0,9%, a diferença de média entre esses grupos foi de 0,57 mg/dL com IC 95%, variando de -10,42 a 11,56 mg/dL. Já entre os grupos Cilostazol e *Allium sativum*, a diferença de média foi de -3,76 mg/dL com IC 95% de -14,75 a 7,24 mg/dL. O cálculo do ANOVA TWO-WAY teve P= 0,0199, porém o teste de Tukey não demonstrou significância entre os três grupos, como pode ser visto na Figura 21. Os valores absolutos estão expostos na Tabela 3.

Figura 21 – Estatística da média do HDL entre os grupos
HDL



Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

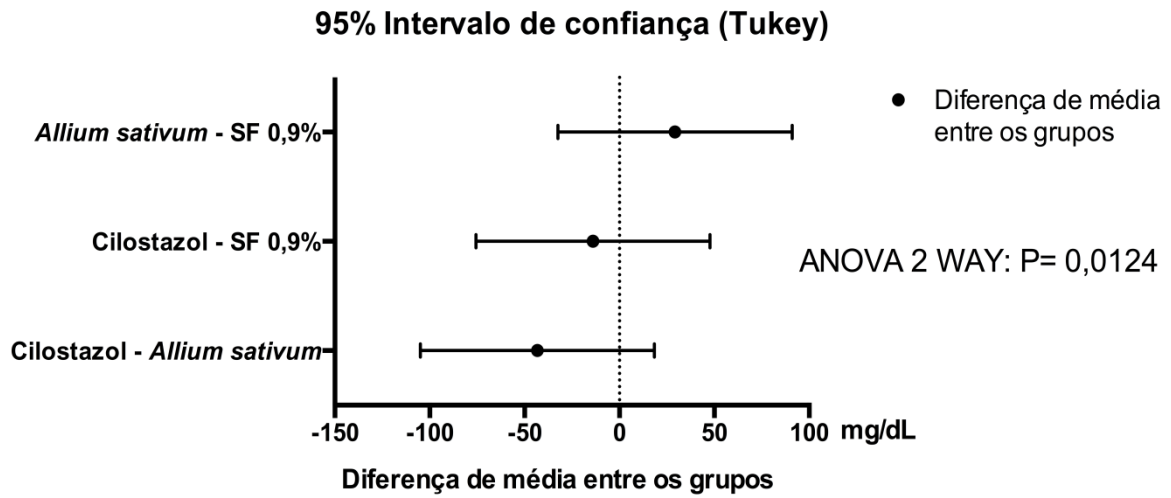
Tabela 3 – Valores absolutos do HDL

Cilostazol		<i>Allium sativum</i>		Soro Fisiológico 0,9%	
Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
26,5	25,1	32,8	23,8	20,7	26,7
20,0	17,7	21,6	19,8	21,3	6,6
26,0	18,5	9,6	16,9	3,9	5,2
25,7	19,7	12,0	17,4	21,3	18,5
28,7	21,3	10,1	9,8	22,4	18,3
17,0	15,6	28,1	18,0	20,8	14,5
25,4	25,3	24,8	16,4	21,3	14,7
21,4	19,3	12,5	0,9	22,6	14,6
13,2	18,5	133,0	40,6	23,2	14,7
21,3	9,7	25,1	17,8	69,2	24,0
Média 20,80 (IC 95% 17,91 a 23,68)		24,55 (IC 95% 8,23 a 40,88)		20,23 (IC 95% 12,65 a 27,80)	

Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

A diferença de média de colesterol LDL entre os grupos *Allium sativum* e Soro Fisiológico 0,9% foi de 29,31 mg/dL com IC 95%, variando de -32,37 a 90,98 mg/dL. Entre os grupos Cilostazol e Soro Fisiológico 0,9%, a diferença de média entre esses grupos foi de -13,93 mg/dL com IC 95%, variando de -75,60 a 47,75 mg/dL. Já entre os grupos Cilostazol e *Allium sativum*, a diferença de média foi de -43,23 mg/dL com IC 95% de -104,90 a 18,44 mg/dL. O cálculo do ANOVA TWO-WAY teve P= 0,0124, porém o teste comprovatório de Tukey não demonstrou significância entre os três grupos, como pode ser visto na Figura 22. Os valores absolutos estão expostos na Tabela 4.

Figura 22 – Estatística da média do LDL entre os grupos
LDL



Allium sativum - SF 0,9% : M= 29,31 mg/dL IC 95% (-32,37 a 90,98)
 Cilostazol - SF 0,9% : M= -13,93 mg/dL IC 95% (-75,60 a 47,75)
 Cilostazol - *Allium sativum* : M= -43,23 mg/dL IC 95% (-104,90 a 18,44)

Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

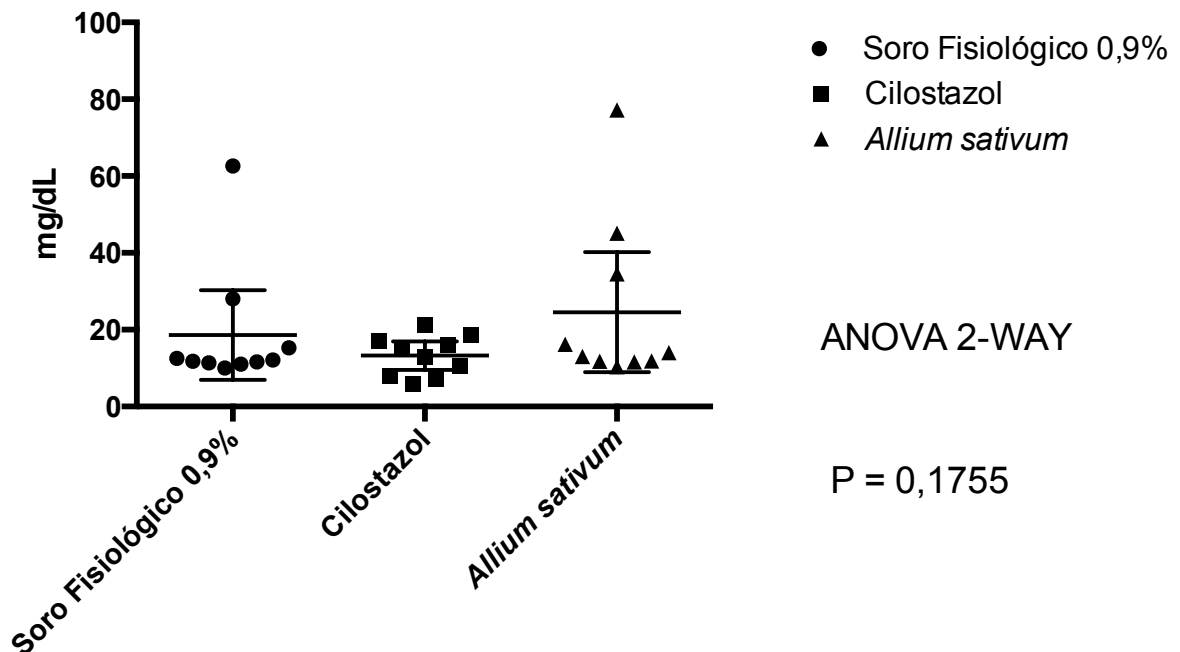
Tabela 4 – Valores absolutos do LDL

Cilostazol		<i>Allium sativum</i>		Soro Fisiológico 0,9%	
Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
6,0	12,5	1,0	-1,6	8,9	12,1
6,0	8,1	2,0	16,0	3,0	7,6
-2,0	-3,5	3,0	6,5	3,1	38,0
-4,0	-5,7	-12,8	16,2	4,0	7,7
1,0	3,3	-19,0	8,6	3,0	4,7
0,0	19,6	-7,0	-1,2	14,0	13,3
7,0	-6,5	7,0	0,0	-2,0	-31,1
7,0	-5,5	-6,0	-59,3	-6,0	9,2
1,0	-3,5	749,4	178,8	5,0	5,3
6,0	-3,1	22,5	4,2	213,2	9,2
Média	2,18 (IC 95% -1,38 a 5,75)	45,42 (IC 95% -60,20 a 151)	16,11 (IC 95% -8,75 a 40,97)		

Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

Quanto à diferença de média de VLDL entre os grupos *Allium sativum* e Soro Fisiológico 0,9%, Cilostazol e Soro Fisiológico 0,9%; e Cilostazol e *Allium sativum* foram infinito positivo com cálculo de ANOVA TWO-WAY com P= 0,1755, logo não houve diferença entre os grupos, quanto ao colesterol VLDL (Figura 23). O teste de Tukey não cabe, haja vista o ANOVA já não ter sido significativo. Os valores absolutos do VLDL estão na Tabela 5.

Figura 23 – Estatística da média do VLDL entre os grupos
VLDL colesterol



Soro Fisiológico 0,9% vs. Cilostazol = 5,37 IC 95% (-10,32 a 21,06)
Soro Fisiológico 0,9% vs. *Allium sativum* = -5,94 IC 95% (-21,63 a 9,75)
Cilostazol vs. *Allium sativum* = -11,31 IC 95% (-27 a 4,38)

Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

Tabela 5 – Valores absolutos do VLDL

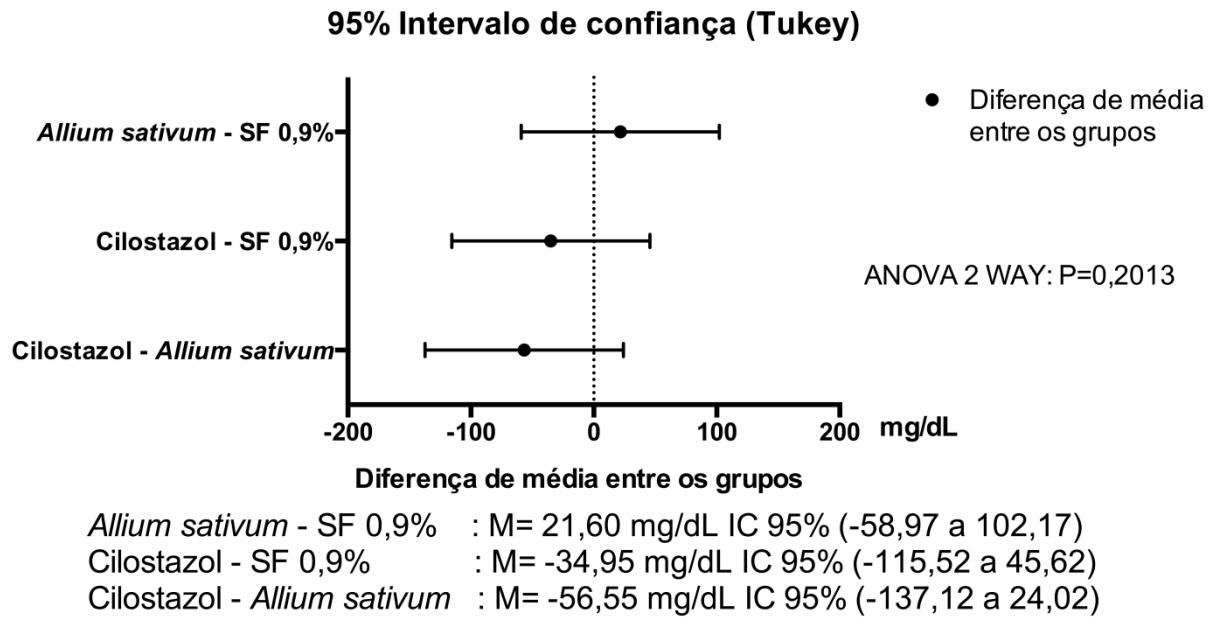
	Cilostazol		<i>Allium sativum</i>		Soro Fisiológico 0,9%	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
	13,2	17,4	14,2	13,8	18,4	12,2
	6,2	8,2	12,8	13,2	11,2	44,8
	7,2	14,0	11,0	12,6	71,4	53,8
	22,2	20,0	80,8	9,4	11,4	12,8
	7,4	8,4	48,4	20,6	10,0	15,0
	22,6	14,8	8,6	12,2	10,0	13,2
	4,8	27,2	12,2	11,6	9,0	14,6
	13,6	12,2	14,0	140,4	9,0	11,0
	10,2	1,4	14,6	8,6	14,2	7,8
	12,8	21,4	14,4	18,0	12,8	10,0
Média	13,26 (IC 95% 9,52 a 17)		24,57 (IC 95% 8,94 a 40,20)		18,63 (IC 95% 6,96 a 30,30)	

Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

Já diferença de média de triglicérides entre os grupos *Allium sativum* e Soro Fisiológico 0,9% foi de 21,60 mg/dL com IC 95%, variando de -58,97 a 102,17 mg/dL. Entre os grupos Cilostazol e Soro Fisiológico 0,9%, a diferença de média entre esses grupos foi de -34,95 mg/dL com IC 95% variando de -115,52 a 45,62

mg/dL. Já entre os grupos Cilostazol e *Allium sativum*, a diferença de média foi de -56,55 mg/dL com IC 95% de -137,12 a 24,02 mg/dL. O cálculo do ANOVA TWO-WAY teve P= 0,2013 e com teste de Tukey não significativo, logo não houve diferença entre os três grupos (Figura 24). Os valores absolutos estão na Tabela 6.

Figura 24 – Estatística da média do triglicerídeos entre os grupos
TRIGLICERÍDEOS



Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

Tabela 6 – Valores absolutos do triglicerídeos

Cilostazol		<i>Allium sativum</i>		Soro Fisiológico 0,9%	
Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
66,	87,	71,	69,	92,	61,
31,	41,	64,	66,	56,	224,
36,	70,	55,	63,	353,	269,
111,	100,	404,	47,	57,	64,
37,	42,	242,	103,	50,	75,
113,	74,	43,	61,	50,	66,
24,	136,	61,	58,	43,	222,
68,	61,	70,	702,	45,	51,
51,	7,	73,	43,	60,	55,
64,	107,	72,	90,	98,	34,
Média 66,30 (IC 95% 47,61 a 84,99)		122,9 (IC 95% 44,68 a 201)		101,3 (IC 95% 43,77 a 158,7)	

Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

4.1.4 Dados Complementares

Apesar de ter ocorrido duas complicações como demonstradas na Tabela 7, não houve diferença significativa entre os grupos estudados.

Tabela 7 – Complicações pós-cirúrgicas

	P no χ^2	Cilostazol n= 10		<i>Allium sativum</i> n= 10		Soro fisiológico 0,9% n= 10	
Isquemia de membro	0,1328	00	0%	01	10%	03	30%
Perda de membro	0,1328	00	0%	01	10%	03	30%
Morte	-	00	0%	00	0%	00	0%
Hematoma e/ou equimose	-	00	0%	00	0%	00	0%

Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

Observou-se infecção em todos os grupos, porém com $P= 0,7494$, logo não significativo entre os grupos (Tabela 8).

Tabela 8 – Infecção

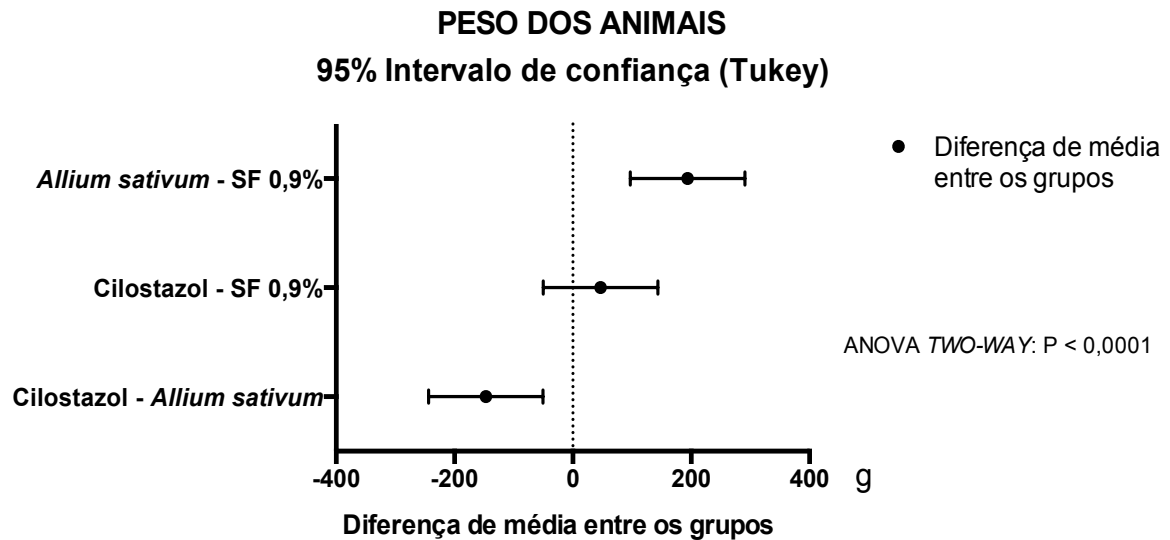
χ^2 P= 0,7494	Cilostazol n= 10	<i>Allium sativum</i> n= 10	Soro fisiológico 0,9% n= 10
n	1	1	2
Bactéria isolada	Enterobacter cloacae +Pseudomonas aeruginosa	Bastonetes gram positivos da pele norma	Proteus mirabilis Citobacter diversus

Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

A diferença de média de peso dos animais entre os grupos *Allium sativum* e Soro Fisiológico 0,9% foi de 194,08 g com IC 95%, variando de 97,29 a 290,87 g. Entre os grupos Cilostazol e Soro Fisiológico 0,9%, foi de 46,98 g com IC 95%, variando de -49,81 a 143,77 g. Já entre os grupos Cilostazol e *Allium sativum*, a diferença de média foi de -147,10 g com IC de 95% variando de -243,89 a -50,31 g. O ANOVA *TWO-WAY* demonstrou $P < 0,001$ e o teste de Tukey demonstrou diferença entre os grupos (Figura 25):

1. *Allium Sativum* e Soro Fisiológico 0,9%, com significância para o grupo Soro Fisiológico; e
2. Cilostazol e *Allium sativum*, com significância para o grupo Cilostazol.

Figura 25 – Estatística da média do peso dos coelhos entre os grupos

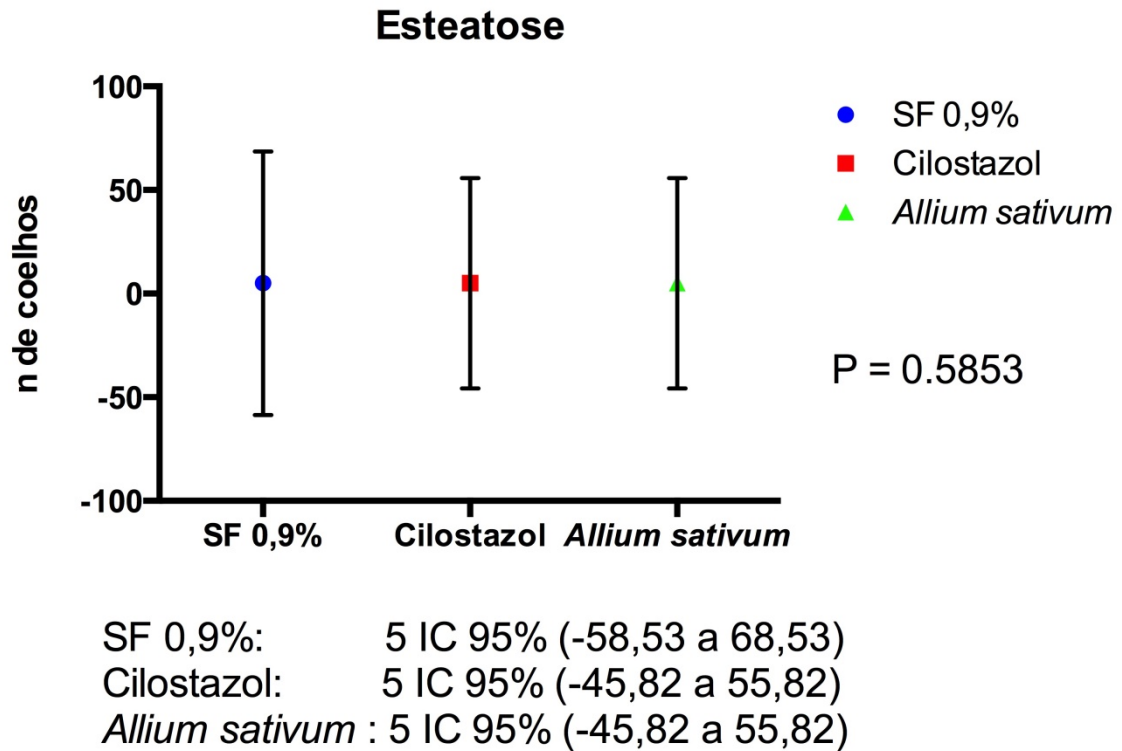


Allium sativum - SF 0,9% : M= 194,08 g IC 95% (97,29 a 290,87) P < 0,0001
 Cilostazol - SF 0,9% : M= 46,98 g IC 95% (-49,82 a 143,77) P = 0,4843
 Cilostazol - *Allium sativum* : M= -147,10g IC 95%(-243,89 a -50,31) P = 0,0013

Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

Quanto ao efeito das substâncias testadas no fígado foi obtido um P = 0,5853 para a presença de esteatose em todos os grupos, com média de frequência de esteatose hepática de 5 (cinco) para o grupo SF 0,9% com IC 95%, variando de -58,53 a 68,53; média de frequência de esteatose hepática de 5 (cinco) para o grupo Cilostazol com IC 95%, variando de -45,82 a 55,82; e também uma média de frequência de esteatose hepática de 5 (cinco) para o grupo *Allium sativum* com IC 95%, variando de -45,82 a 55,82; como pode ser observado nas Figuras 26 e 30. Além disso, todas as peças mantiveram a estrutura lobar do fígado.

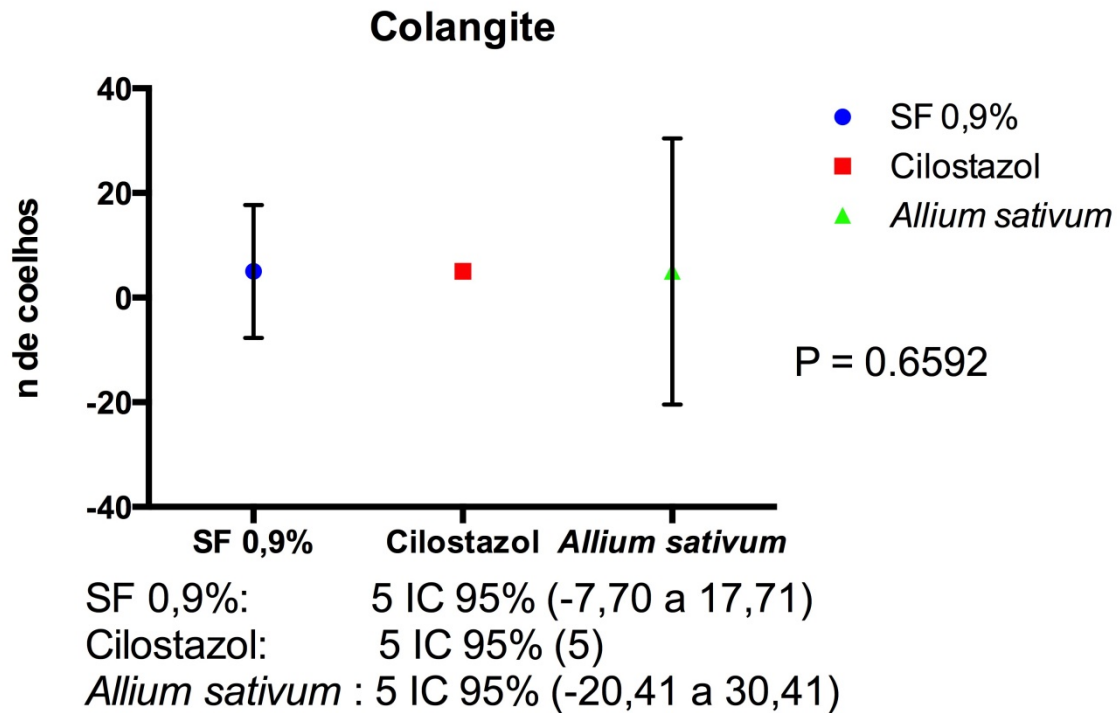
Figura 26 – Estatística da frequência de esteatose hepática



Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

O fígado dos animais teve uma média de frequência de colangite de 5 (cinco) para o grupo SF 0,9% com IC de 95% variando de -7,70 a 17,71; uma média de frequência de colangite de 5 (cinco) para o grupo Cilostazol com IC 95% de 5; e o grupo *Allium sativum* teve uma média de frequência de colangite também de 5 (cinco) sendo o IC 95% variando de -20,41 a 30,41. O P foi igual a 0,6592. (Figuras 27 e 31)

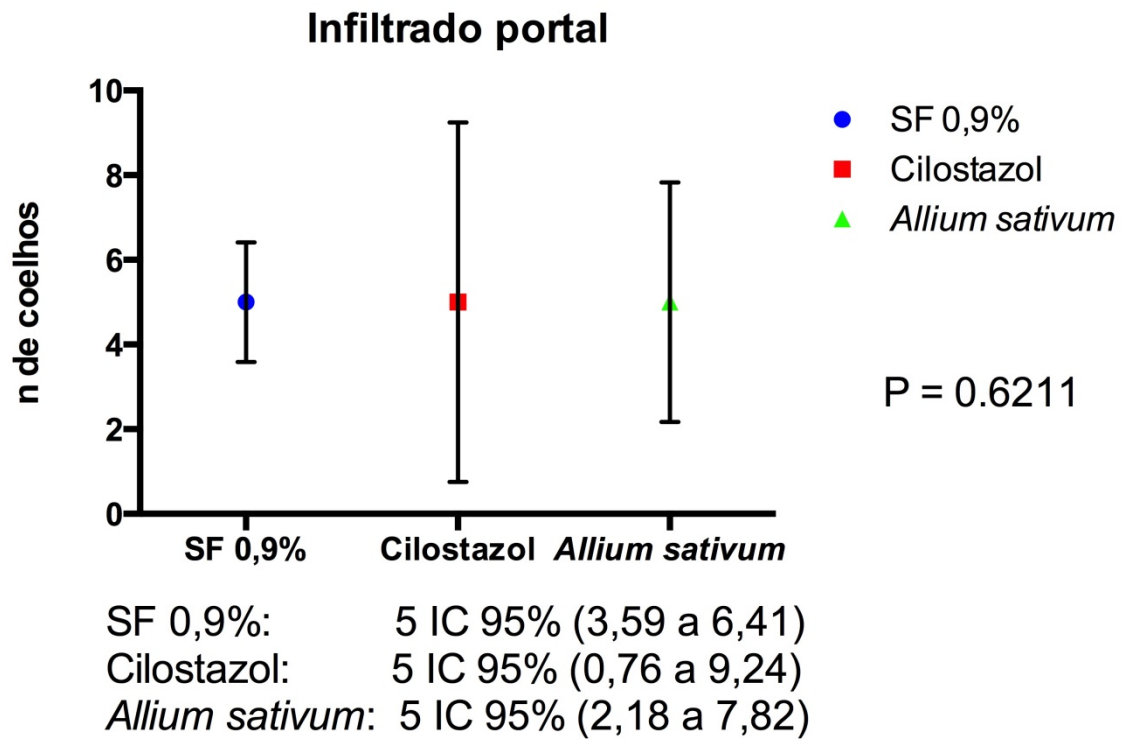
Figura 27 – Estatística da frequência de colangite nos animais



Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

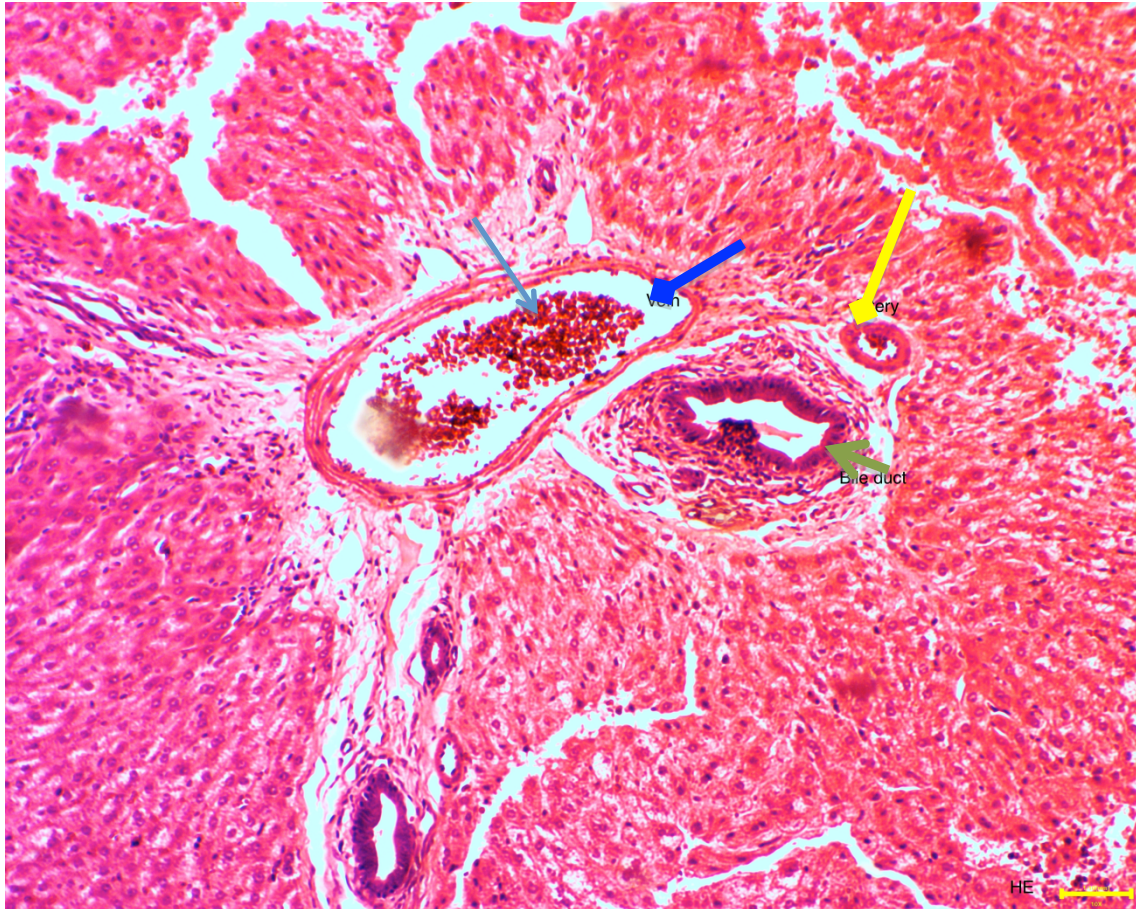
Ainda avaliando o fígado dos animais, observou-se uma média de frequência de infiltrado portal de 5 (cinco) para o grupo SF 0,9% com IC de 95%, variando de 3,59 a 6,41; uma média de frequência de infiltrado portal de 5 (cinco) para o grupo Cilostazol com IC de 95% de 0,76 a 9,24; e o grupo *Allium sativum* teve uma média de frequência de infiltrado portal também de 5 (cinco), sendo o IC 95%, variando de 2,18 a 7,82. O P foi igual a 0,6211. (Figuras 28, 32 e 34)

Figura 28 – Estatística da frequência de infiltrado portal nos animais



Fonte: Autor. Dados da pesquisa.

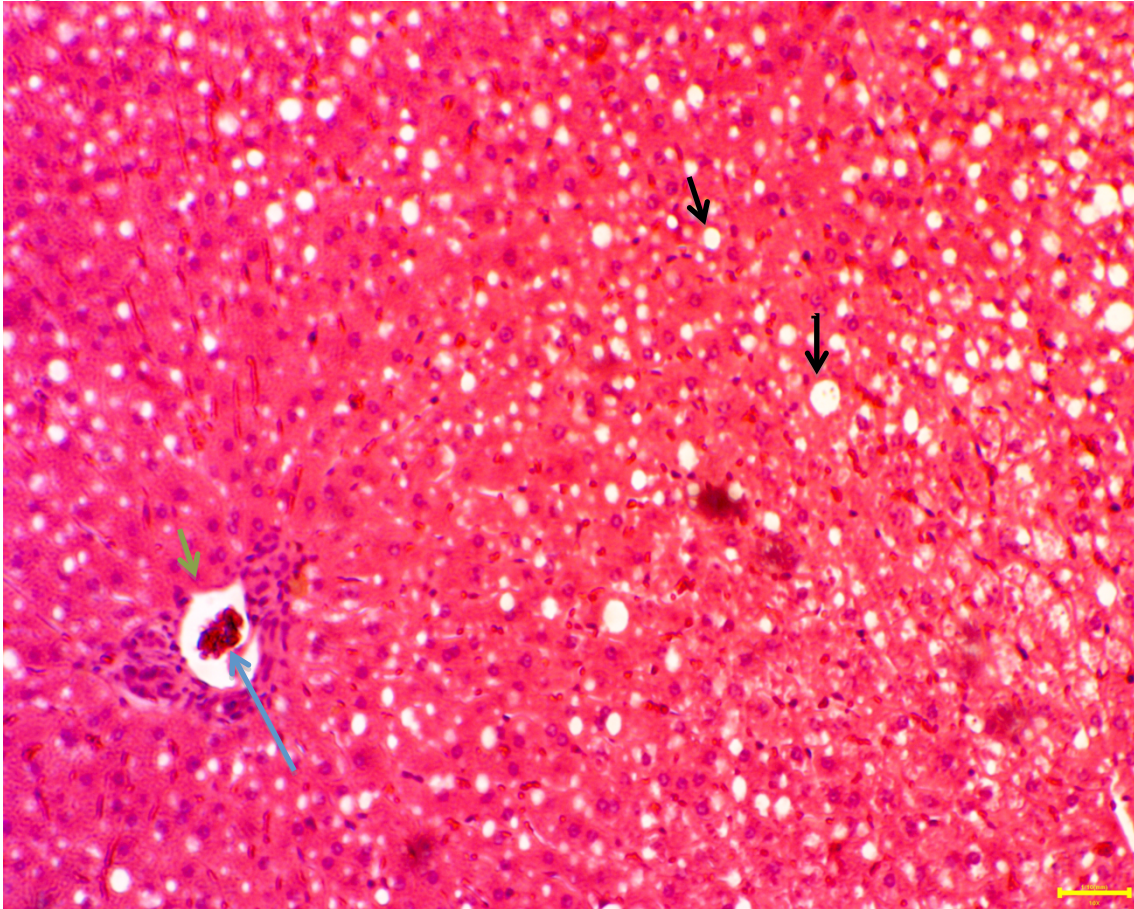
Figura 29 – Fígado normal



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Dúctos biliares (setas verdes), veia hepática (seta azul), artéria hepática (seta amarela), a seta ciano mostra hemácias. Hepatócitos em vermelho claro, núcleo dos hepatócitos em vermelho escuro. HE 10x - Escala 1/10 mm. *Allium sativum* (animal 30)

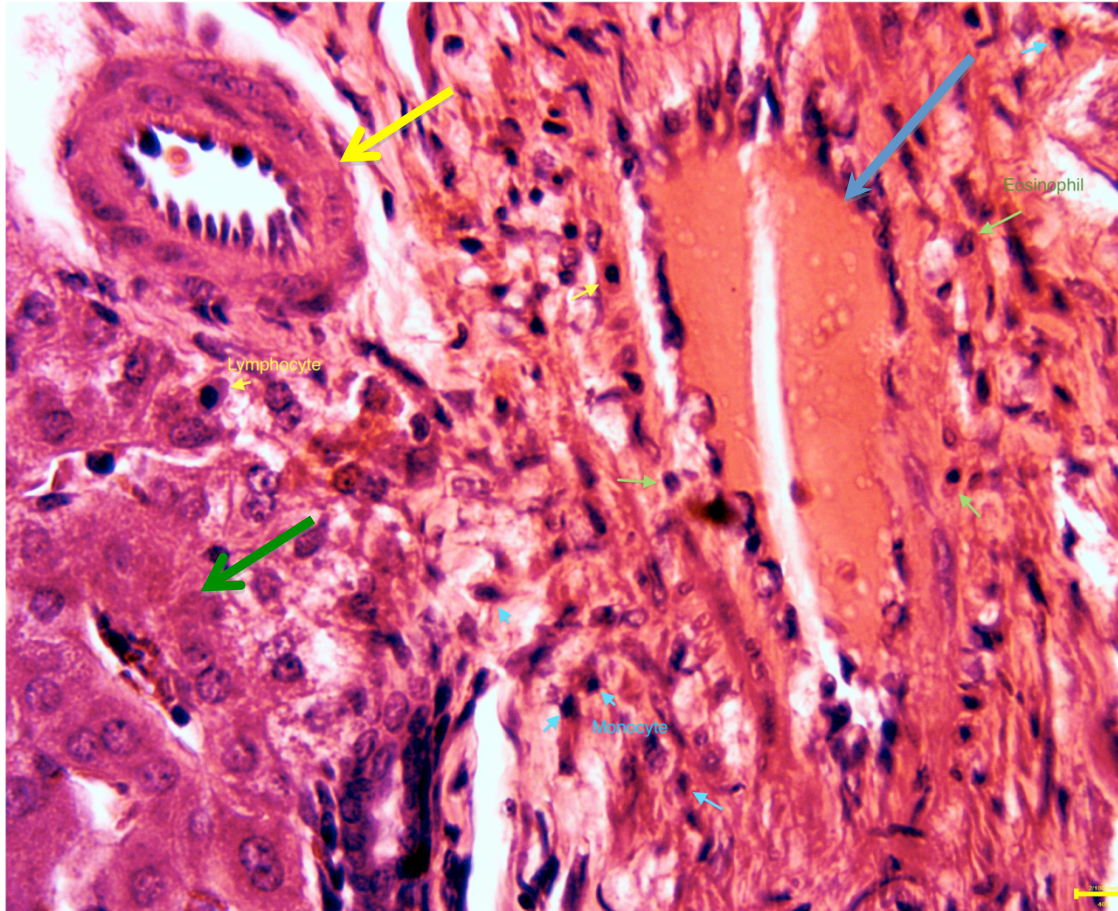
Figura 30 – Esteatose hepática.



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Macrófagos com lípidos (setas pretas), duto biliar (seta verde), hemácias (seta ciano), hepatócitos em vermelho claro e seu núcleos em vermelho escuro. - HE 10x - Escala 1/10 mm. Cilostazol (animal 50)

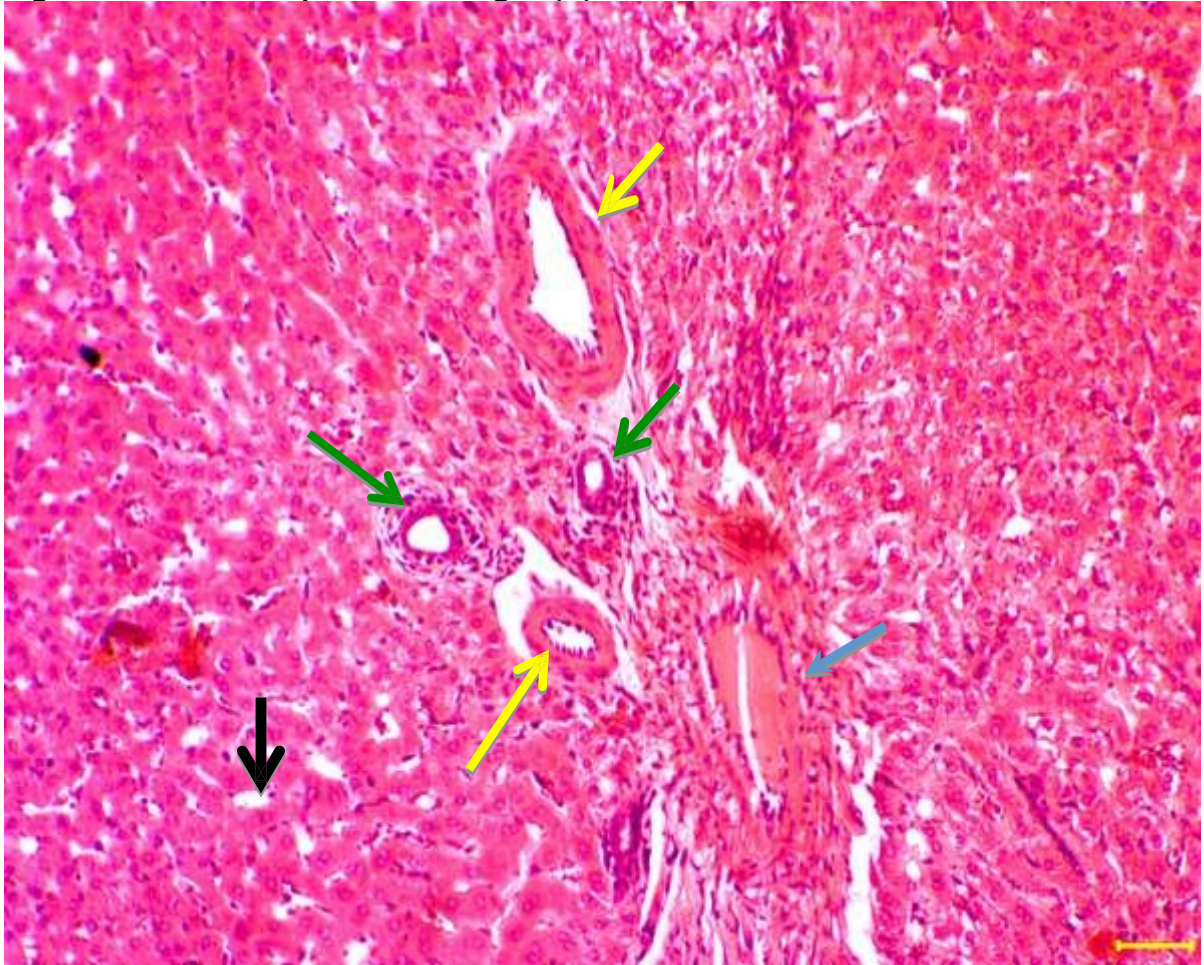
Figura 31 – Infiltrado portal e colangite (A)



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Dúctos biliares (setas verdes), veia hepática (seta azul), artéria hepática (seta amarela).
Coloração HE 40x. Setas azuis monócitos, setas verdes eosinófilos e setas amarelas
linfócitos – Escala 2/100 mm. Soro Fisiológico 0,9% (animal 16)

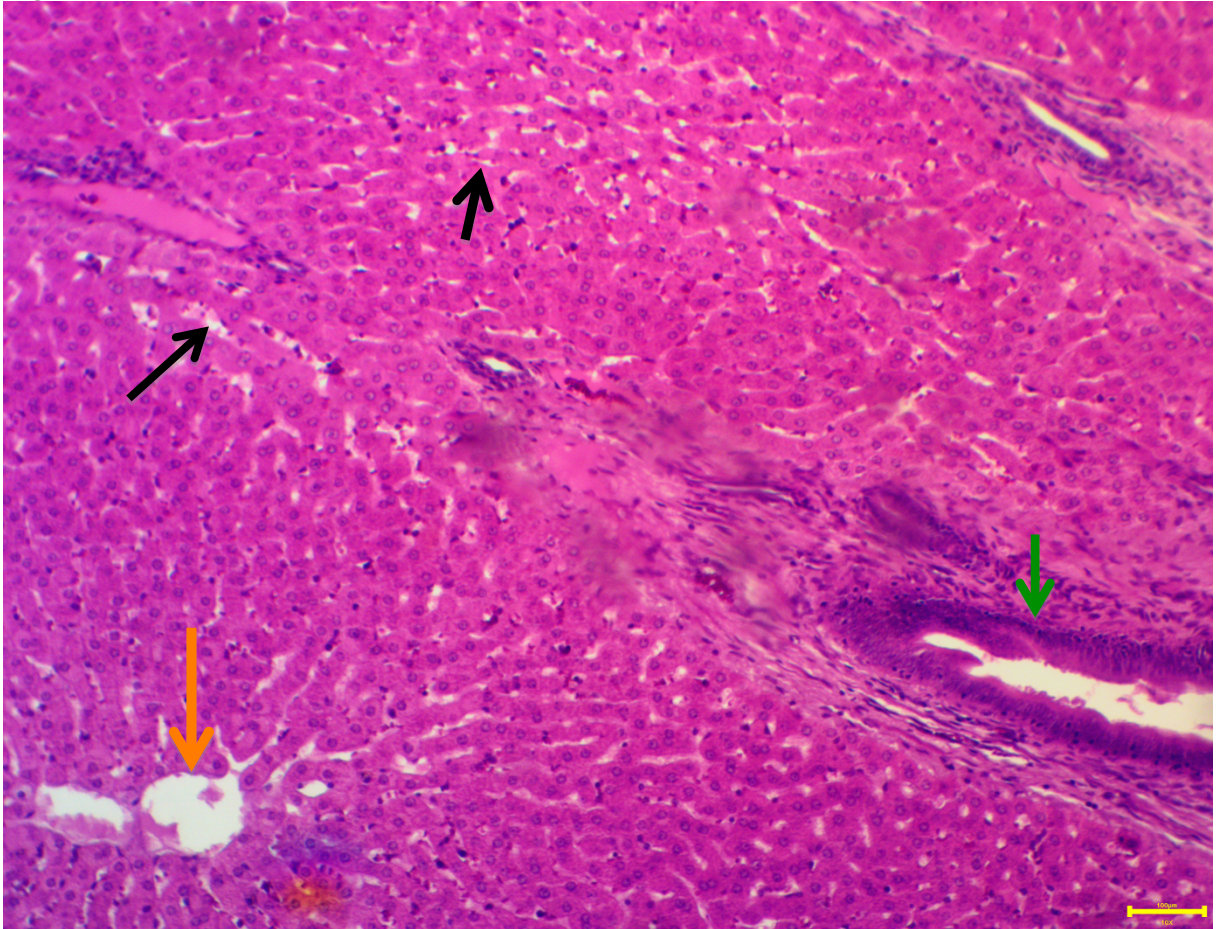
Figura 32 – Infiltrado portal e colangite (B)



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Dúctos biliares (setas verdes), veia hepática (seta azul), artéria hepática (seta amarela). Seta preta demonstra o infiltrado intersticial em branco. Hepatócitos em vermelho claro, núcleo dos hepatócitos em vermelho escuro HE 10x – Escala 1/10 mm. Soro fisiológico 0,9% (animal 16)

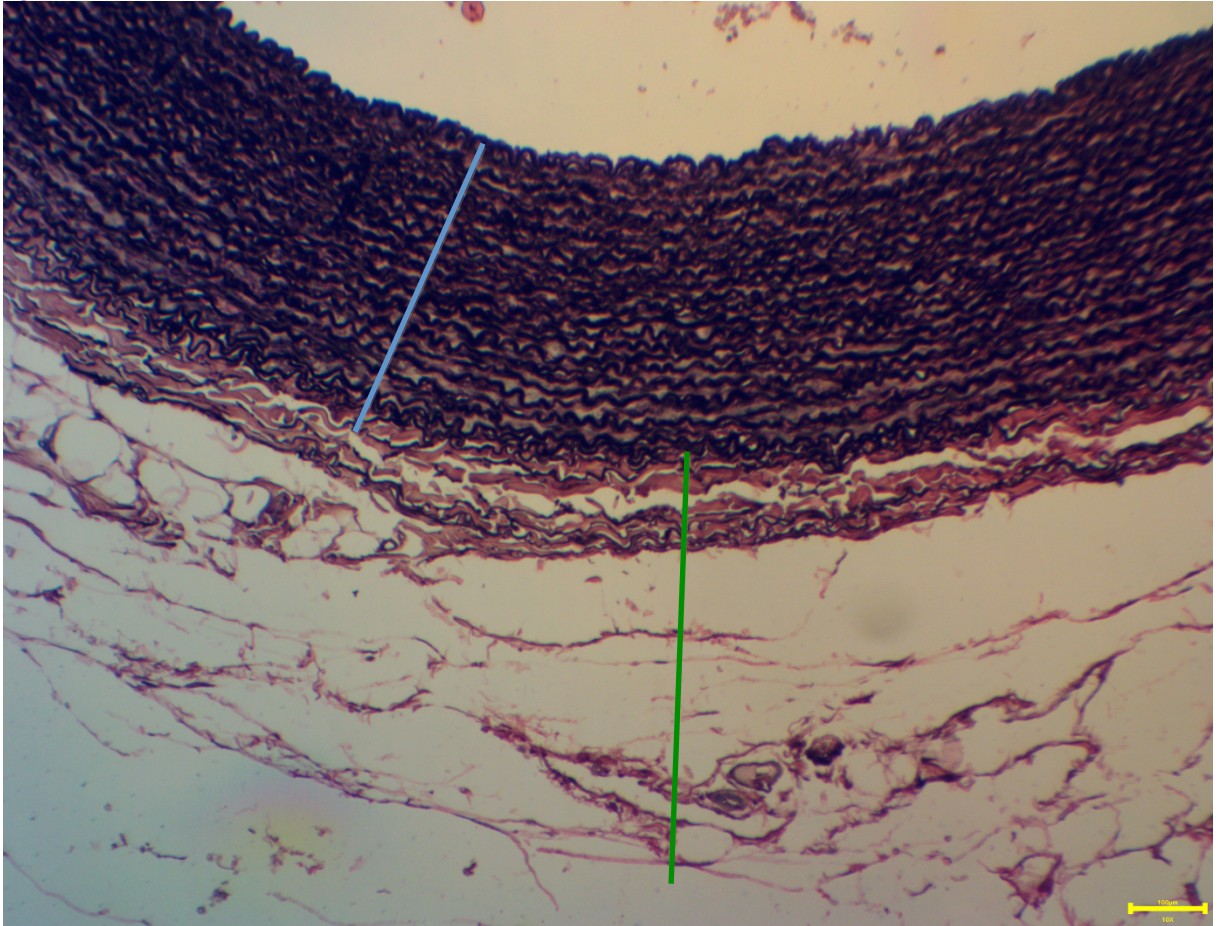
Figura 33 – Infiltrado portal



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Dúcto biliar (seta verde), veia central lobular (seta laranja), infiltrado intersticial (setas pretas). HE 10x – Escala 1/10 mm. *Allium sativum* (animal14)

Figura 34 – Isolamento da camada íntima impossibilitado - Fibras elásticas em preto



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Notas: Reta verde demonstra a cama adventícia do vaso e a azul o complexo miointimal. Fibras colágenas em marron avermelhado. Acima das estruturas está a luz vascular. Corte transversal – Coloração Verhoeff 10x. Escala 1/10 mm. Soro Fisiológico 0,9% (animal 12)

5 DISCUSSÃO

O resultado da pesquisa foi satisfatório, pois o grupo testado, *Allium sativum*, foi, estatisticamente, semelhante ao grupo controle positivo, Cilostazol. E os dois grupos *Allium sativum* e Cilostazol, foram, estatisticamente, superiores ao grupo controle negativo, Soro Fisiológico 0,9%.

A escolha do cilostazol como controle foi decorrente ao seu efeito superior ao ácido acetilsalicílico como demonstrado por Plate (1989), Qian (2013) e Lin (2014) (LIN et al., 2014; PLATE et al., 1989; QIAN; BI, 2013) e por o clopidogrel não ser tão eficaz e necessitar do uso concomitante com o Cilostazol como mostrado no trabalho de Maruyama (2013) (MARUYAMA et al., 2013), além do fato do paclitaxel, para fins de inibição de hiperplasia miointimal, dever ser aplicado topicamente no local alvo por meio de stent como visto nos trabalhos de Axel (1997) e Herdeg (2000) (AXEL et al., 1997; HERDEG et al., 2000) ou balão como no trabalho de Yasuda (2002) (YASUDA, S. et al., 2002).

O *Allium sativum* foi escolhido como teste do estudo para inibir a hiperplasia miointimal, pois segundo Efendy (1997), Campbell (2001), Kwon (2003) e Yamuji (2004), ele apresenta efeito antiaterosclerótico; Conforme Lau (2001) e Kwon (2003) o *Allium sativum* apresenta efeito hipocolesterolêmico; em adição, Borek (2001) relata efeitos antitumoral, anti-inflamatório e antioxidante. Logo, havia grande possibilidade do *Allium sativum* também atuar, favoravelmente, na inibição da hiperplasia miointimal. A concentração de 800 µg/kg foi escolhida para ser a concentração do produto teste nesta pesquisa, pois Efendy et al. (1997), com essa concentração de extrato bruto de alho, conseguiu inibir o desenvolvimento de camadas de gordura e o acúmulo de colesterol na parede dos vasos, protegendo-os contra o aparecimento da aterosclerose. O fato de ter sido utilizado o *Allium sativum*, *in natura*, foi devido ao trabalho de Borek (BOREK, 2001) onde ele percebeu que o allicin, um componente do *Allium sativum*, é instável quando em solução, pois é o organossulfúrico lipossolúvel volátil. Sendo assim, tentou-se manter o máximo das substâncias ativas do *Allium sativum*.

Foram escolhidos coelhos para a pesquisa, pois segundo a pesquisa de Ferrer et al. (2010) o coelho é um animal válido como modelo aterogênico e para injúria vascular; já no trabalho de Takagi et al. (1997) foi comprovado que a hiperplasia, que ocorre em coelhos WHHL, é semelhante à que ocorre nas

coronárias humanas; e na pesquisa de Ylä-Herttuala et al. (1994) foi demonstrado que tanto em coelhos como em humanos há um padrão comum de reação inflamatória do sistema complemento. Os coelhos fêmeas foram escolhidos por serem mais dóceis e fáceis de serem manipulados que os machos. Além de poderem ficar mais de uma numa mesma gaiola, ganhando-se espaço no laboratório; uma vez que, pela literatura, não há diferença no uso entre coelhos fêmeas e machos para este tipo de estudo, como nos trabalhos de (FERRER et al., 2010; GUZELOGLU et al., 2012; PLATE et al., 1989; VAN CRAEYVELD et al., 2012), além de haver trabalhos semelhantes, que também utilizaram fêmeas, como pode ser visto nos trabalhos de Efendy et al. (1997), Campbell et al. (2001), Nogueira (2012) e Rolim (2012).

Escolheu-se gema de ovo para provocar aterosclerose nos coelhos fêmeas, porque nos trabalhos de Srilatha (SRILATHA et al., 1997) e dos Santos (SANTOS, 2008) foi demonstrado um método barato e eficaz. Esse fato também foi confirmado nas dissertações de Nogueira (NOGUEIRA, 2012) e Rolim (ROLIM, 2012).

O n populacional da pesquisa (número de indivíduos) foi adequado como pode ser visto nos trabalhos relacionados ao assunto (ALESSI et al., 2010; BAUMGARTNER, 1973; BORJA et al., 2013; BRASSELET et al., 2008; CORTELEKOGLU et al., 2006; FERRER et al., 2010; HERDEG et al., 2000; KNOPFHOLZ et al., 2006; KWON et al., 2003; LAFONT et al., 1995; LIDDELL et al., 2005; NOGUEIRA, 2012; PLATE et al., 1989; ROLIM, 2012; SANTOS, 2008; SRILATHA et al., 1997; STADIUS et al., 1994; WAKSMAN et al., 2008; YASUDA, S. et al., 2002) e pelo próprio cálculo realizado com a calculadora *on line* LEE; como também o teste estatístico foi adequado, haja vista o ANOVA TWO WAY ser usado para variáveis contínuas temporais e ONE WAY para as variáveis contínuas transversais, além do teste de Tukey ter sido utilizado para os dados quantitativos (variáveis contínuas) devido haver mais de um grupo com diferentes produtos (GUZELOGLU et al., 2012; NOGUEIRA, 2012; ROLIM, 2012) e o teste do Qui-quadrado para os dados qualitativos (variáveis categóricas nominais) (DORIA FILHO, 1999; DOUGLAS JR. et al., 2005; FLETCHER, R.; FLETCHER, S., 2011; HULLEY et al., 2008).

A avaliação ultrassonográfica prévia das artérias ilíacas, descrita na literatura por Ferrer et al. (2010), poderia ter sido utilizada para a determinação do diâmetro do balão a ser usado para provocar a injúria do endotélio, mas aparelho de

ultrassonografia não era disponível e o diâmetro do balão, que se utilizou era seguro e eficaz segundo o próprio Ferrer, Gellman, entre outros (FERRER et al., 2010; GELLMAN et al., 1991; KNOPFHOLZ et al., 2006; LAFONT et al., 1995). Apesar de ter havido complicações isquêmicas distais, inerentes ao próprio procedimento cirúrgico, a técnica descrita na literatura é com ligadura do vaso (porta de entrada do cateter balão) e não, com arteriorrafia (sutura da abertura da luz vascular) (BAUMGARTNER, 1973; GELLMAN et al., 1991; KNOPFHOLZ et al., 2006; LIDDELL et al., 2005; NOGUEIRA, 2012; ROLIM, 2012; STADIUS et al., 1994; TAKAGI et al., 1997).

O presente estudo focou a hiperplasia miointimal, assim como os trabalhos de Lafont, Gellman, Nogueira e Rolim (GELLMAN et al., 1991; LAFONT et al., 1995; NOGUEIRA, 2012; ROLIM, 2012), não se detendo ao perfil lipídico; mas se fosse considerada como variável primária o perfil lipídico da população estudada, dever-se-ia ter mantido a dieta hipercolesterolêmica durante todo o experimento, como fizeram Efendy et al. (1997) e Campbell et al. (2001); pois a parada da dieta após a angioplastia favoreceu a normalização do perfil lipídico dos animais, conforme foi percebido nesta tese.

Wissowzky (1876) utilizou a eosina, a qual cora o citoplasma de rosa claro e o tecido colágeno em rosa escuro. Adicionalmente, a hematoxilina dá uma coloração violácea ao núcleo celular. Verhoeff (1908) determinou uma coloração específica para as fibras elásticas, diferenciando-as dos tecidos vizinhos; onde as fibras elásticas se coram em preto (Figura 34). Utilizou-se essa coloração no intuito de tentar delimitar só a camada íntima do vaso, porém não se teve sucesso (Figura 34); então, realizou-se o estudo da camada miointimal, que inclui as duas camadas alvas da hiperplasia. Masson (1929) desenvolveu um corante tricrômico onde os núcleos ficam corados em azul escuro ou preto, os músculos e citoplasma das células em vermelho e o colágeno e a cartilagem em azul. Essa coloração facilitou determinar as calcificações se destacando em azul, na camada muscular, em vermelho.

Realizou-se o estudo imuno-histoquímico das peças com HHF35 monoclonal (ALESSI et al., 2010; ASADA et al., 1996; HIRSCH; KARNOVSKY, 1991; STADIUS et al., 1994; TSUKADA et al., 1987) e o C4d policlonal (COHEN et al., 2012; DE SERRE et al., 2008) para tentar estabelecer o padrão de ação do *Allium sativum*, haja vista o primeiro ser um marcador para células musculares e o C4d

para processo inflamatório, mediado pelo complexo complemento, uma vez que no trabalho de Ylä-Herttuala et al. (1994) demonstrou-se ação do sistema complemento nas lesões ateroscleróticas e no trabalho de Tsai et al. (2008), identificou-se uma atividade inibitória do p38 pelo cilostazol e como a inibição do p38 está sendo associado a possíveis efeitos terapêuticos nas doenças auto-imunes e processos inflamatórios (GOLDSTEIN; GABRIEL, 2005); foi testado o efeito do *Allium sativum* no processo inflamatório, mediado pelo complemento, por meio do marcador C4d. Mas, em todos os animais, não houve diferença estatística quanto à invasão muscular na íntima como também ao processo inflamatório, mediado pelo complexo complemento na parede miointimal. Logo, o presente estudo não foi capaz de caracterizar como ocorreu a inibição ou diminuição da hiperplasia miointimal, haja vista não ter havido nem inibição da invasão muscular nem diminuição do processo inflamatório, pelo uso do *Allium sativum*, nem pelo Cilostazol, estatisticamente, significativa.

Entretanto, há 4 (quatro) pilares na biopatologia da hiperplasia miointimal, como descreve Davies (2007), que são: formação de infiltrado inflamatório, ativação das células adventíciais, lesão da célula endotelial e lesão da camada muscular lisa; já os níveis elevados de LDL oxidado que ocorre na aterosclerose pode ser um iniciador ou agravante da hiperplasia como referendado nos trabalhos de Cox e Yamaji (COX et al., 1991; YAMAJI et al., 2004), pois esses autores demonstram que o LDL oxidado é fagocitado pelos macrófagos e se transformam em células espumosas, que por sua vez iniciam ou perpetuam processos inflamatórios locais, sendo esses estimuladores de células progenitoras presentes nas três camadas vasculares, a saber: íntima, média (ou muscular) e adventícia. Assim sendo, o *Allium sativum* pode ter atuado nos 2 (dois) primeiros pilares e na inibição da oxidação do LDL intracelular, pois a lesão endotelial e da camada muscular foi feita, artificialmente, por meio de angioplastia por balão. A atuação contra a formação do infiltrado inflamatório e ativação das células adventíciais pode ter ocorrido devido ao efeito anti-inflamatório e antitumoral do *Allium sativum* descrito por Borek (2001), haja vista se esses fatores não forem inibidos ocorre ativação de células progenitoras que ocasionam a hiperplasia, como demonstrado no trabalho de Davies (2007); e também por seu efeito anti-oxidante por meio de seus compostos lipossolúveis: sulfido diallil, sulfido triallil, dissulfido diallil e polissulfido diallil, e o fenólico allixin como descritos no trabalho de Borek (2001). Adicionalmente, o *Allium*

sativum pode ter atuado no metabolismo do colesterol, pois segundo Kwon et al. (2003) o alho inibe a atividade da CETP que, por conseguinte, eleva o HDL e diminuiu a transformação do LDL em LDL oxidado.

Na avaliação morfométrica, como pode ser observado nas Figuras 4, 7-9 e 14- 19, não houve um padrão de hiperplasia entre os grupos, pois alguns animais tiveram hiperplasia da camada média com desarranjo das células musculares e deposição de cálcio (Figuras 8, 9 e 18); outros só tiveram alteração da íntima como estratificação da camada íntima (Figura 19) e invasão muscular (Figuras 16 e 17); e outros nas duas camadas, que fala a favor de haver vários mecanismos responsáveis pela hiperplasia miointimal; mesmo tendo ocorrido apenas dois mecanismos de indução, que foram a dieta hipercolesterolêmica e a injúria endotelial (por balão). Porém, esses achados se assemelham com os dados obtidos por Davies (2007), que afirma que a distribuição da hiperplasia pode ser da íntima, difuso, focal ou dentro do corpo do vaso; e no trabalho de Van Craeyveld et al. (2012) e Lafont et al. (1995) onde ele constatou que as alterações principais da aterosclerose e hiperplasia ocorreram na realidade, nas camadas profundas do vaso (média) e não, na íntima dele. O *Allium sativum* e o Cilostazol foram capazes de inibir a hiperplasia miointimal em 40,9% e 54,64%, respectivamente, em relação ao controle negativo (Soro Fisiológico 0,9%), demonstrando, assim, a eficácia de ambos. Apesar do cilostazol ter sido em número absoluto, 13,74%, superior ao *Allium sativum*; deve ser lembrado que o Cilostazol é uma droga que já é o princípio ativo e nesta pesquisa, apesar de ter sido utilizado uma planta (BLOCK, 2010) *in natura*, sem isolamento do seu princípio ativo, obteve-se resultado, estatisticamente, semelhante ao controle positivo.

O *Allium sativum* e o cilostazol não foram capazes de diminuir as taxas lipídicas, contradizendo assim, El-Sayyad (EL-SAYYAD et al., 2010; RIED; TOBEN; FAKLER 2013; UENO et al., 2011) onde o *Allium sativum* é usado para tratamento da hipercolesterolemia, porém assim como na presente pesquisa, nos trabalhos de Efendy et al. (1997), Campbell et al. (2001) e El-Sayyad et al. (2010) também não houve diferença nos níveis lipídicos na concentração de 800 µg/Kg de peso corporal, em coelhos. A causa principal desse fato, na presente pesquisa se deveu, provavelmente, a parada da dieta hipercolesterolêmica no dia da angioplastia da artéria ilíaca externa, apesar de que Lafont et al. (1995) também ter parado a dieta após a angioplastia; assim sendo, o animal voltou para uma dieta

balanceada própria dele e, nos 35 (trinta e cinco) dias de tratamento, o organismo do animal teve tempo hábil de eliminar o excesso de colesterol, haja vista na literatura, os animais ficavam sem dieta hipercolesterolêmica por menos tempo (GELLMAN et al., 1991); ou segundo as observações de Augusti (AUGUSTI; MATHEW, 1973), de Bordia (BORDIA; VERMA; KHABIA; et al., 1977; ORDIA; VERMA; VYAS; et al., 1977), de Gebhardt (GEBHARDT, 1993) e de Agarwal e Steiner (AGARWAL, 1996; STEINER et al., 1996), onde eles só observaram a ação hipolipidêmica do alho após 2 (dois) a 6 (seis) meses da administração ininterrupta do *Allium sativum*; logo, o tempo que utilizamos (35 dias) não foi suficiente para observar tal efeito hipolipidêmico, o que também foi demonstrado por Ried, Toben e Fakler (2013).

Houve valores dispersos (*outlier*) de lipídeos entre os animais, até mesmo num mesmo grupo, mas eles foram mantidos para manter a imparcialidades dos dados, evitando, assim, manipulação da pesquisa. Além disso, os testes estatísticos já levam em consideração os valores ao acaso.

Os coelhos, que evoluíram com isquemia e perda do membro, pós-angioplastia, decorreram, provavelmente, de uma ligadura alta da artéria femoral, comprometendo assim, as vias colaterais, pois na passagem do balão por via retrógrada (contrária ao fluxo sanguíneo) para a artéria ilíaca esgaçou a arteriotomia, sendo necessário tal procedimento. (Tabela 7).

As infecções relatadas não comprometeram a pesquisa, haja vista, terem se limitado à pele no local da incisão e o vaso alvo ficava intracavitário. (Tabela 8)

Com relação ao peso dos animais, a diferença existente entre os grupos *Allium sativum* e Soro Fisiológico 0,9%, sendo significativo para o grupo Soro Fisiológico 0,9%, que é o controle negativo; e entre os grupos Cilostazol e *Allium sativum*, sendo esse significativo para o grupo Cilostazol, que é o controle positivo, demonstra que o *Allium sativum* não influencia nem no ganho nem na perda de peso. Isso é um dado a mais, pois os trabalhos utilizados nesta pesquisa não se preocuparam com este dado. (Figura 25).

Como dados complementares, a realização da histologia hepática foi feita assim como nos trabalhos de Kwon, dos Santos, Nogueira e Rolim (KWON et al., 2003; NOGUEIRA, 2012; ROLIM, 2012; SANTOS, 2008), onde o órgão alvo foi a artéria e o fígado, o primeiro para saber quanto à aterosclerose e hiperplasia, e o fígado quanto à toxicidade dos produtos testados.

Em relação à segurança do *Allium sativum*, no emprego da inibição da hiperplasia miointimal em animais, teve-se sucesso, pois não houve diferença entre os três grupos (Figuras 26 a 28) quanto à esteatose, colangite e infiltrado portal; todos mantiveram a estrutura lobular do fígado (Figuras 30 a 33). Os casos de esteatose ocorridos, provavelmente, foram decorrentes a própria dieta hipercolesterolêmica e eliminação dos lipídeos pelo fígado do animal, haja vista o coelho não ser hipercolesterolêmico nem sofrer de aterosclerose; ou em decorrência do uso dos anestésicos e anti-inflamatórios durante os atos cirúrgicos e para conter a dor pós-cirúrgica. Além disso, o *Allium sativum* tem uma DL50 de 3034 mg/kg e concentração máxima sem efeito colateral de 2200 mg/kg, segundo o trabalho de Mikail (MIKAIL, 2010) e não é contra-indicado em animais prenhos como demonstrado no trabalho de El-Sayyad (EL-SAYYAD et al., 2010). Assim sendo, pode-se expandir a pesquisa para outros animais, até mesmo para humanos.

A presente pesquisa abre caminho para um novo medicamento contra a hiperplasia miointimal que é a principal causa de falha das angioplastias tanto coronarianas, levando a reinfartos, como nas periféricas e de falha de enxertos vasculares, levando a amputações de membros de muitas pessoas, em especial nos diabéticos. Ele é de fácil acesso à população, tanto na disponibilidade quanto ao seu baixo preço e segurança. Não precisa de manipulações laboriosas e pode ser consumido cru. Outro ponto importante é que as medicações atualmente utilizadas para aquela finalidade, como cilostazol, paclitaxel, ácido acetilsalicílico, clopidogrel e entre outros, são caras.

Esse produto trará grande impacto econômico e social, diminuindo a população de aposentados por invalidez (amputados e infartados) ao oferecer grande acessibilidade ao tratamento.

Essa pesquisa serve de base para novas pesquisas, podendo ser utilizadas concentrações maiores do *Allium sativum*, uma vez que nessa dose utilizada e por se tratar da planta (bulbo) (BLOCK, 2010), ou seja, não é ainda nem o extrato, pode-se igualar ao efeito protetor de um medicamento caro para a nossa população de terceiro mundo. Assim sendo, pesquisar com o extrato bruto e depois com o fracionamento do extrato para buscar o seu princípio ativo.

Tentar determinar se há toxicidade com o uso crônico do *Allium sativum*.

Ou até mesmo realizar uma pesquisa multicêntrica em humanos, haja vista o *Allium sativum* ser uma planta segura e há a necessidade de saber se também

ocorrerá proteção para os vasos contra a hiperplasia miointimal em seres humanos.

6 CONCLUSÃO

O *Allium sativum* tem a mesma eficácia na inibição da hiperplasia miointimal quando comparado aos coelhos tratados com Cilostazol.

O tempo de administração do *Allium sativum*, nessa pesquisa, não foi suficiente para caracterizar o efeito dessa planta sobre o lipidograma dos animais.

A coloração Verhoeff não é adequada para o isolamento da camada íntima vascular.

O *Allium sativum* demonstrou ser seguro quanto à toxicidade, pelo método aqui adotado.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, K. C. Therapeutic actions of garlic constituents. **Med. Res. Rev.**, New York, v. 16, n. 1, p. 111-124, Jan. 1996. ISSN 0198-6325.
- ALESSI, A. et al. Rosiglitazone and vascular injury in hypercholesterolemic rabbits: neointimal formation assessment. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 95, n. 3, p. 283-288, Sep. 2010. ISSN 0066-782X.
- AMELI, F. M. et al. The effect of postoperative smoking on femoropopliteal bypass grafts. **Ann. Vasc. Surg.**, Detroit, v. 3, n. 1, p. 20-25, Jan. 1989. ISSN 0890-5096.
- ASADA, Y. et al. Effects of inflation pressure of balloon catheter on vascular injuries and subsequent development of intimal hyperplasia in rabbit aorta. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 121, n. 1, p. 45-53, Mar. 1996. INSS 0021-9150.
- AUGUSTI, K. T.; MATHEW, P. T. Effect of long-term feeding of the aqueous extracts of onion (*Allium cepa* Linn.) and garlic (*Allium sativum* Linn.) on normal rats. **Indian J. Exp. Biol.**, New Delhi, v. 11, n. 3, p. 239-241, May, 1973. ISSN 0019-5189.
- AXEL, D. I. et al. Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery. **Circulation**, Dallas, v. 96, n. 2, p. 636-645, Jul. 1997. ISSN 0009-7322.
- BAUMGARTNER, H. R. [A new method for the induction of thrombi by controlled over-dilatation of the vascular wall]. **Z. Gesamte Exp. Med.**, Berlin, v. 137, p. 227-247, Sep. 1963. ISSN 0044-2534.
- _____. The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition, and formation of mural thrombi. **Microvasc. Res.**, New York, v. 5, n. 2, p. 167-179, Mar. 1973. ISSN 0026-2862.
- BIREME. Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. Biblioteca Virtual em Saúde. **DeCS-Descritores em Ciências da Saúde 2014**. São Paulo: BIREME: 2014. Disponível em: <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/?IsisScript=../cgi-bin/decserver/decserver.xis&interface_language=p&previous_page=homepage&previous_task=NULL&task=start>. Acesso em: nov. 2014.
- BLEDSOE, S. et al. Effect of clopidogrel on platelet aggregation and intimal hyperplasia following carotid endarterectomy in the rat. **Vascular**, Hamilton, v. 13, n. 1, p. 43-49, Jan.-Feb. 2005. ISSN 1708-5381.
- BLOCK, E. **Garlic and other Alliums: the lore and the science**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2010. ISBN 978-0-85404-190-9.

BORDIA, A. et al. The effective of active principle of garlic and onion on blood lipids and experimental atherosclerosis in rabbits and their comparison with clofibrate. **J. Assoc. Physicians. India**, Bombay, v. 25, n. 8, p. 509-516, Aug. 1977. ISSN 0004-5772.

BORDIA, A. et al. Effect of essential oil of onion and garlic on experimental atherosclerosis in rabbits. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 379-386, Mar. 1977. INSS 0021-9150.

BOREK, C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. **J. Nutr.**, Philadelphia, v. 131, n. 3s, p. 1010S-1015S, Mar. 2001. ISSN 0022-3166.

BORJA, M. S. et al. HDL-apoA-I exchange: rapid detection and association with atherosclerosis. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 8, p. e71541, Aug. 2013. ISSN 1932-6203.

BRASSELET, C. et al. Effect of local heating on restenosis and in-stent neointimal hyperplasia in the atherosclerotic rabbit model: a dose-ranging study. **Eur. Heart J.**, London, v. 29, n. 3, p. 402-412, Feb. 2008. ISSN 0195-668X.

CAMPBELL, J. H. et al. Molecular basis by which garlic suppresses atherosclerosis. **J. Nut.**, Philadelphia, v. 131, n. 3s, p. 1006S-1009S, Mar 2001. ISSN 0022-3166.

COHEN, D. et al. Pros and cons for C4d as a biomarker. **Kidney Int.**, New York, v. 81, n. 7, p. 628-639, Apr. 2012. ISSN 0085-2538.

CORTELEKOGLU, T. et al. The effects of clopidogrel and calcium dobesilate on intimal hyperplasia following vascular injury. **Acta Chir. Belg.**, Bruxelles, v. 106, n. 2, p. 206-210, Mar.-Apr. 2006. ISSN 0001-5458.

COSTA, R. F. B.; FAGUNDES, D. J. Modelos experimentais de hiperplasia intimal: efeitos da radiação ionizante. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 17, n. 3, May, 2002. ISSN 0102-8650.

COX, J.; CHIASSON, D.; GOTLIEB, A. Stranger in a stranger land the pathogenesis of saphenous vein graft stenosis with emphasis on structural and functional differences veins and arteries. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, Philadelphia, v. 34, n. 1, p. 45-68, Jul.-Aug.1991. ISSN 0033-0620.

DAVIES, M. G. Hiperplasia da íntima: resposta básica à lesão e reconstrução do enxerto arterial e venoso. In: RUTHERFORD, R. B. (Ed.). **Cirurgia Vascular**. 6.ed. Rio de Janeiro: DiLivros, 2007. v.1, cap. 11, p.149-72. ISBN 978-85-86703-46-1.

DE SERRE, N. P. et al. Evaluation of c4d deposition and circulating antibody in small bowel transplantation. **Am. J. Transplant.**, Copenhagen, v. 8, n. 6, p. 1290-1296, Jun. 2008. ISSN 600-6135.

DORIA FILHO, U. **Introdução à bioestatística**: para simples mortais. 21.ed. São Paulo: Elsevier, 1999. 158 p. ISBN 85-860-1436-2.

DOUGLAS JR, J. S. et al. Coronary stent restenosis in patients treated with cilostazol. **Circulation**, Dallas, v. 112, n. 18, p. 2826-2832, Nov. 2005. ISSN 0009-7322.

DOUGLAS, J. S.; WEINTRAUB, W. S.; HOLMES, D. Rationale and design of the randomized, multicenter, cilostazol for RESTenosis (CREST) trial. **Clin. Cardiol.**, New York, v. 26, n. 10, p. 451-454, Oct. 2003. ISSN 0160-9289.

DUCASSE, E. et al. Ionizing radiation to prevent arterial intimal hyperplasia at the edges of the stent: induces necrosis and fibrosis. **J. Surg. Res.**, Philadelphia, v. 135, n. 2, p. 331-6, Oct. 2006. ISSN 0022-4804.

EFENDY, J. L. et al. The effect of the aged garlic extract, 'Kyolic', on the development of experimental atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 132, n. 1, p. 37-42, Jul. 11 1997. ISSN 0021-9150.

EL-SAYYAD, H. I. et al. Protective effects of *Allium sativum* against defects of hypercholesterolemia on pregnant rats and their offspring. **Int. J. Clin. Exp. Med.**, Madison, v. 3, n. 2, p. 152-163, Jun. 2010. ISSN: 1940-5901.

FERRER, M. D. et al. [The rabbit as an experimental model: technique for the induction of vascular lesions and incidents]. **Radiologia**, Madrid, v. 52, n. 1, p. 45-50, Jan.-Feb. 2010. ISSN: 0033-8338.

FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S. W. **Epidemiologia clínica: elementos essenciais**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 288 p. ISBN 978-85-363-0640-7.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clin. Chem.**, Baltimore, v. 28, n. 10, p. 2077-2080, Oct. 1982. ISSN 0009-9147.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, Baltimore, v. 18, n. 6, p. 499-502, Jun. 1972. ISSN 0009-9147.

GEBHARDT, R. Multiple inhibitory effects of garlic extracts on cholesterol biosynthesis in hepatocytes. **Lipids**, Berlin, v. 28, n. 7, p. 613-619, Jul. 1993. ISSN 0024-4201.

GELLMAN, J. et al. Effect of lovastatin on intimal hyperplasia after balloon angioplasty: a study in an atherosclerotic hypercholesterolemic rabbit. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v. 17, n. 1, p. 251-259, Jan. 1991. ISSN 0735-1097.

GIMBRONE JR, M. A. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. **Am. J. Cardiol.**, New York, v. 75, n. 6, p. 67B-70B, Feb. 23 1995. ISSN 0002-9149.

GOLDSTEIN, D. M.; GABRIEL, T. Pathway to the clinic: inhibition of P38 MAP kinase. A review of ten chemotypes selected for development. **Curr. Top. Med. Chem.**, Hilversum, v. 5, n. 10, p. 1017-1029, 2005. ISSN: 1568-0266.

GUZELOGLU, M. et al. The effects of PPARgamma agonist rosiglitazone on neointimal hyperplasia in rabbit carotid anastomosis model. **J. Cardiothorac. Surg.**, London, v. 7, p. 57, Jun. 2012. ISSN 1568-0266.

HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. Procedimentos clínicos. In: HARKNESS, J. E. (Ed.). **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. 3. ed. São Paulo: Roca, 1993. cap. 3, p.57-85. ISBN 85-7241-057-0.

HERDEG, C. et al. Local paclitaxel delivery for the prevention of restenosis: biological effects and efficacy in vivo. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v. 35, n. 7, p. 1969-1976, Jun. 2000. ISSN 0735-1097.

HIRSCH, G. M.; KARNOVSKY, M. J. Inhibition of vein graft intimal proliferative lesions in the rat by heparin. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 139, n. 3, p. 581-587, Sep. 1991. ISSN 0002-9440.

HULLEY, S. B. et al. **Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 384 p. ISBN 978-85-363-1361-0.

ISHIZAKA, N. et al. Effects of a single local administration of cilostazol on neointimal formation in balloon-injured rat carotid artery. **Atherosclerosis**, Amesderdan, v. 142, n. 1, p. 41-46, Jan. 1999. ISSN 0021-9150.

KAMIYA, T.; SAKAGUCHI, S. Hemodynamic effects of the antithrombotic drug cilostazol in chronic arterial occlusion in the extremities. **Arzneimittelforschung**, Aulendorf, v. 35, n. 7A, p. 1201-1203, 1985. ISSN 0004-4172.

KIMURA, Y. et al. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. **Arzneimittelforschung**, Aulendorf, v. 35, n. 7A, p. 1144-1149, 1985. ISSN 0004-4172.

KNOPFHOLZ, J. et al. The effect of L-arginine on neointimal proliferation and artery remodeling on an iliac artery lesion caused by a balloon catheter in hypercholesterolemic rabbits. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 87, n. 4, p. 520-4, Oct. 2006. ISSN 0066-782X.

KOHLER, T. R.; KIRKMAN, T.; CLOWES, A. W. Effect of heparin on adaptation of vein grafts to arterial circulation. **Arteriosclerosis**, Dallas, v. 9, n. 4, p. 523-528, Jul.-Aug. 1989. ISSN 0276-5047.

KWON, M. J. et al. Cholesteryl ester transfer protein activity and atherogenic parameters in rabbits supplemented with cholesterol and garlic powder. **Life Sci.**, Oxford, v. 72, n. 26, p. 2953-2964, May, 2003. ISSN 0024-3205.

- LAFONT, A. et al. Restenosis after experimental angioplasty. Intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodeling. **Circ. Res.**, Baltimore, v. 76, n. 6, p. 996-1002, Jun. 1995. ISSN 0009-7330.
- LANDYMORE, R. W.; MACAULAY, M. A.; MANKU, M. S. The effects of low, medium and high dose aspirin on intimal proliferation in autologous vein grafts used for arterial reconstruction. **Eur. J. Cardiothorac. Surg.**, Berlin, v. 4, n. 8, p. 441-444, 1990. ISSN 1010-7940.
- LARSON, K. et al. Hematoxylin and eosin tissue stain in Mohs micrographic surgery: a review. **Dermatol. Surg.**, New York, v. 37, n. 8, p. 1089-1099, Aug. 2011. ISSN 1076-0512.
- LAU, B. H. Suppression of LDL oxidation by garlic. **J. Nutr.**, Philadelphia, v. 131, n. 3s, p. 985S-9858S, Mar. 2001. ISSN 0022-3166.
- LI, J.; BROOKS, G. Cell cycle regulatory molecules (cyclins, cyclin-dependent kinases and cyclin dependent kinase inhibitors) and the cardiovascular system. - Potential targets for therapy? **Eur. Heart J.**, London, v. 20, n. 6, p. 406-420, Mar. 1999. ISSN 0195-668X.
- LIBBY, P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 83, n. 2, p. 456S-460S, Feb. 2006. ISSN 0002-9165.
- LIBBY, P.; TANAKA, H. The molecular bases of restenosis. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, Philadelphia, v. 40, n. 2, p. 97-106, Sep.-Oct. 1997. ISSN 0033-0620.
- LIDDELL, R. P. et al. Endovascular model of rabbit hindlimb ischemia: a platform to evaluate therapeutic angiogenesis. **J. Vasc. Interv. Radiol.**, Reston, v. 16, n. 7, p. 991-998, Jul. 2005. ISSN 1051-0443.
- LIN, G. et al. Effectiveness of cilostazol in transient ischemic attack refractory to aspirin: A report of two cases. **Exp. Ther. Med.**, Athens, v. 7, n. 3, p. 739-741, Mar. 2014. ISSN: 1792-0981.
- MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 4, p. 469-486, Dec. 2003. ISSN 0001-3765.
- MARUYAMA, H. et al. Dual antiplatelet therapy clopidogrel with low-dose cilostazol intensifies platelet inhibition in patients with ischemic stroke. **Intern. Med.**, Tokyo, v. 52, n. 10, p. 1043-1047, 2013. ISSN 0918-2918.
- MASSON, C. L. P. Some histological methods: trichrome stainings and their preliminary technique. **J. Techn. Methods**, v. 12, p. 75-90, 1929.
- MCCANN, R.; HANGEN, P.; FUCHS, J. ACetyl salicylic acid and dipyridamol decrease intimal hyperplasia in experimental vein grafts. **Ann Surg.**, Philadelphia, v. 191, p. 238-243, 1980. ISSN 0003-4932.

MIKAIL, H. G. Phytochemical screening, elemental analysis and acute toxicity of aqueous extract of *Allium sativum* L. bulbs in experimental rabbits. **J. Med. Plant. Res.**, v. 4, n. 4, p. 322-326, Feb. 2010. ISSN 1996-0875.

MIN, P. K. et al. Effect of cilostazol on in-stent neointimal hyperplasia after coronary artery stenting: a quantitative coronary angiography and volumetric intravascular ultrasound study. **Circ. J.**, Kyoto, v. 71, n. 11, p. 1685-1690, Nov. 2007. ISSN 1346-9843.

NOGUEIRA, M. R. S. **Diferença da média de hiperplasia médio-intimal pós angioplastia na artéria ilíaca de coelhos tratados com extrato seco da Curcuma longa**. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

PARK, S. J. et al. A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 348, n. 16, p. 1537-1545, Apr. 2003. ISSN 0028-4793.

PEREIRA, A. H.; PEREIRA, A. A.; COSTA, L. F. M. D. Hiperplasia intimal. In: BRITO, C. J. D. (Ed.). **Cirurgia vascular**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2008. v.1, cap. 10, p.165-175. ISBN 978-85-372-0142-8.

PINTO, J. T.; RIVLIN, R. S. Antiproliferative effects of allium derivatives from garlic. **J. Nutr.**, Philadelphia, v. 131, n. 3s, p. 1058S-1060S, Mar, 2001. INSS 0022-3166.

PLATE, G. et al. Effect of platelet inhibitors on platelet and fibrin deposition following transluminal angioplasty of the atherosclerotic rabbit aorta. **Eur. J. Vasc. Surg.**, London, v. 3, n. 2, p. 127-133, Apr. 1989. ISSN 0950-821X.

QIAN, Y.; BI, Q. Systematic study of cilostazol on secondary stroke prevention: a meta-analysis. **Eur. J. Med. Res.**, Munich, v. 18, p. 53, Dec. 2013. ISSN 0949-2321.

RIED, K.; TOBEN, C.; FAKLER, P. Effect of garlic on serum lipids: an updated meta-analysis. **Nutr. Rev.**, Washington, v. 71, n. 5, p. 282-299, May, 2013. ISSN 0029-6643.

ROLIM, J. C. **Diferença da hiperplasia médio intimal em coelhos submetidos a angioplastia e tratados com Moringa oleifera**. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Cirúrgicas) - Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

ROSS, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 340, n. 2, p. 115-126, Jan. 1999. ISSN 0028-4793.

SANTOS, J. A. B. D. **Estudo da aterosclerose induzida por diferentes tipos de dieta hiperlipídica em coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*)**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Macéio, 2008.

SRILATHA, B. et al. Effects of feeding egg yolk on the serum lipid levels in rabbits. **Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.**, Barcelona, v. 19, n. 7, p. 489-492, Sep. 1997. ISSN 0379-0355.

STADIUS, M. L. et al. Cell proliferation after balloon injury of iliac arteries in the cholesterol-fed New Zealand White rabbit. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v. 14, n. 5, p. 727-733, May, 1994. ISSN 1049-8834.

STEINER, M. et al. A double-blind crossover study in moderately hypercholesterolemic men that compared the effect of aged garlic extract and placebo administration on blood lipids. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 64, n. 6, p. 866-870, Dec. 1996. ISSN 0002-9165.

STERPETTI, A. V. et al. Progression and regression of myointimal hyperplasia in experimental vein grafts depends on platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor production. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v. 23, n. 4, p. 568-575, Apr. 1996. ISSN 0741-5214.

TAKAGI, M. et al. The Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit is a suitable experimental model to study differences in tissue response between intimal and medial injury after balloon angioplasty. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v. 17, n. 12, p. 3611-3619, Dec. 1997. ISSN 1079-5642.

TSAI, C. S. et al. Cilostazol attenuates MCP-1 and MMP-9 expression in vivo in LPS-administrated balloon-injured rabbit aorta and in vitro in LPS-treated monocytic THP-1 cells. **J. Cell. Biochem.**, New York, v. 103, n. 1, p. 54-66, Jan. 2008. ISSN 0730-2312.

TSUCHIKANE, E. et al. Impact of cilostazol on restenosis after percutaneous coronary balloon angioplasty. **Circulation**, Dallas, v. 100, n. 1, p. 21-26, Jul. 1999. ISSN 0009-7322.

TSUKADA, T. et al. HHF35, a muscle-actin-specific monoclonal antibody. I. Immunocytochemical and biochemical characterization. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 126, n. 1, p. 51-60, Jan. 1987. ISSN 0002-9440.

UENO, H. et al. Comparison of the effect of cilostazol with aspirin on circulating endothelial progenitor cells and small-dense LDL cholesterol in diabetic patients with cerebral ischemia: a randomized controlled pilot trial. **J. Atheroscler. Thromb.**, Tokyo, v. 18, n. 10, p. 883-890, 2011. ISSN 1340-3478.

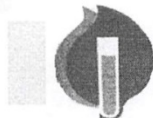
VAN CRAEYVELD, E. et al. A critical reassessment of murine and rabbit models of atherosclerosis: focus on lesion progression and remodelling. **Acta Cardiol.**, Bruxelles, v. 67, n. 1, p. 11-21, Feb. 2012. ISSN 0001-5385.

VERHOEFF, F. H. Some new staining methods of wide applicability; including a rapid differential stain for elastic tissue. **JAMA**, v. 50, n. 11, p. 876-877, Mar. 1908.

VIEIRA, S. **Metodologia científica para a área de saúde**. São Paulo: Sarvier, 1984.

- WAKSMAN, R. et al. Effect of clopidogrel on neointimal formation and inflammation in balloon-denuded and radiated hypercholesterolemic rabbit iliac arteries. **J. Interv. Cardiol.**, Mount Kisco, v. 21, n. 2, p. 122-128, Apr. 2008. ISSN 0896-4327.
- WAKSMAN, R. et al. Effect of intravascular irradiation on cell proliferation, apoptosis, and vascular remodeling after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. **Circulation**, Dallas, v. 96, n. 6, p. 1944-1952, Sep. 1997. ISSN 0009-7322.
- WISSOWZKY, A. Ueber das Eosin als reagenz auf Hämoglobin und die Bildung von Blutgefäßen und Blutkörperchen bei Säugetier und Hühnerembryonen. **Archiv für mikroskopische Anatomie**, v. 13, p. 479-496, 1876.
- YAMAJI, K. et al. Anti-atherogenic effects of an egg yolk-enriched garlic supplement. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, Basingstoke, v. 55, n. 1, p. 61-66, Feb. 2004. ISSN 0963-7486.
- YASUDA, K.; SAKUMA, M.; TANABE, T. Hemodynamic effect of cilostazol on increasing peripheral blood flow in arteriosclerosis obliterans. **Arzneimittelforschung**, Aulendorf, v. 35, n. 7A, p. 1198-1200, 1985. ISSN 0004-4172.
- YASUDA, S. et al. Local delivery of low-dose docetaxel, a novel microtubule polymerizing agent, reduces neointimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery model. **Cardiovasc. Res.**, London, v. 53, n. 2, p. 481-486, Feb. 2002. ISSN 0008-6363.
- YLÄ-HERTTUALA, S. et al. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v. 14, n. 1, p. 32-40, Jan. 1994. ISSN 1049-8834.

ANEXOS

ANEXO A**Comprovante comitê de ética LTF-UFPB**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
CERTIDÃO

João Pessoa, 16 de dezembro de 2009

CEPA N°. 0412/09

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisadores: Profa. Paulo Roberto da Silva Lima

Departamento/Setor: LTF

Ref.: A diferença de frequência de hiperplasia intimal pós-angiosplastia na artéria ilíaca de coelhos com aterosclerose experimental tratados com extrato aquoso das folhas da *Moringa oleifera* comparados aos tratados com a associação AAS-clopidogrel.

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU e APROVOU** a execução do projeto acima.

Número de coelhos: 30

Período: dezembro de 09 até junho de 2011.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB

ANEXO B**Comprovante comitê de ética UNCISAL**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE ALAGOAS – UNCISAL
Transformada pela lei nº 6.660 de 28 de dezembro de 2005
Campus Governador Lamenha Filho
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UNCISAL
Rua Jorge de Lima 113, Trapiche da Barra,
Cep 57.010.300 – Maceió-AL.

Protocolo N° 63-A

Título: "Espessamento intimal pós-angioplastia na artéria ilíaca de coelhos com aterosclerose experimental tratados com allium sativum"

Pesquisador Responsável: Paulo Roberto da Silva Lima


Maceió, 03 de junho de 2010

Sr(ª). Pesquisador(a),

Conforme deliberação em plenária ordinária do CEP/UNCISAL ocorrida no dia 02/06/10 foi de consenso a **aprovação de alteração de título** do protocolo nº 63-A, intitulado: "A diferença de frequência de hiperplasia intimal pós-angioplastia na artéria ilíaca de coelhos com aterosclerose experimental tratados com extrato aquoso das folhas da Moringa Oleífera comparados aos tratados com a associação AAS - clopidogrel", passando à : **Espessamento intimal pós-angioplastia na artéria ilíaca de coelhos com aterosclerose experimental tratados com allium sativum.** podendo a pesquisa ser iniciada.

Nesta oportunidade, lembramos que o pesquisador tem o dever de durante a execução do experimento, manter o CEP informado através do envio a cada seis meses, de relatório consubstanciado acerca da pesquisa, seu desenvolvimento, bem como qualquer alteração, problema ou interrupção da mesma.

Atenciosamente,



Ana Lúcia de Gusmão Freire
Vice-Coordenadora do CEP/UNCISAL

ANEXO C

Protocolo Colesterol total

COLESTEROL Liquiform

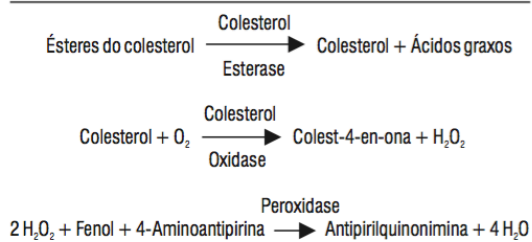
Instruções de Uso

Ref.: 76
MS 10009010068

Finalidade . Sistema enzimático para a determinação do colesterol total em amostras de soro, por reação de ponto final.

[Somente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio . O colesterol total é determinado de acordo com as seguintes reações:



Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina que tem absorvidade máxima em 500 nm.

A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

Características do Sistema . Os valores elevados do colesterol, principalmente o colesterol ligado às lipoproteínas de baixa densidade, são um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento da doença arterial coronariana. O National Cholesterol Education Program (NCEP)⁵ recomenda que os sistemas de medição do colesterol apresentem características de desempenho capazes de atingir os requisitos de exatidão e precisão necessários para que os resultados tenham utilidade médica.

Os dados de exatidão, repetitividade e reprodutibilidade obtidos com o sistema Colesterol Liquiform demonstram que o método é capaz de fornecer resultados que superam as exigências do NCEP, fazendo com que possa ser considerado como bastante seguro para a medição confiável do colesterol total nos níveis de decisão mais importantes. Adicionalmente, a comparação entre as imprecisões encontradas na repetitividade e na reprodutibilidade demonstra que o sistema de medição é bastante robusto nas regiões de concentrações significativas para uso clínico, indicando um desempenho estável no dia a dia.

O sistema é composto de um único reagente pronto para uso, com estabilidade que garante desempenho consistente em sua forma líquida original e manutenção das condições ótimas da reação.

Colesterol Liquiform possui um sistema clarificador de alta eficiência que elimina as interferências positivas produzidas por valores de triglicérides até 2600 mg/dL.

O sistema é facilmente aplicável em analisadores automáticos e semi-automáticos capazes de medir uma reação de ponto final em 500 nm e pode ser usado para medição do colesterol HDL após precipitação seletiva das LDL e VLDL.

Metodologia . Enzimático-Trinder.

Reagentes**1. [REI] - Reagente 1 - Armazenar entre 2 - 8 °C.**

Contém tampão 50 mmol/L, pH 7,0; fenol 24 mmol/L; colato de sódio 500 μmol/L; azida sódica 15 mmol/L; 4-aminoantipirina 500 μmol/L; colesterol esterase ≥250 U/L, colesterol oxidase ≥250 U/L e peroxidase ≥1000 U/L.

Para preservar o desempenho, o reagente deve permanecer fora da geladeira somente o tempo necessário para se obter o volume a ser utilizado. Evitar exposição à luz solar direta.

2. [CAL] - Padrão - 200 mg/dL - Armazenar entre 2 - 30 °C.

Contém azida sódica 15 mmol/L. Após o manuseio sugere-se armazenar bem vedado para evitar evaporação.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos à contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Precauções e cuidados especiais

Não utilizar o Reagente 1 quando sua absorvância, medida contra a água em 500 nm, for igual ou maior que 0,300 ou quando mostrar-se turvo ou com sinais de contaminação.

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação do reagente. O Reagente 1 e o Padrão contém azida sódica que é tóxica. Deve-se tomar cuidado para evitar a ingestão e no caso de contato com os olhos deve-se lavar imediatamente com grande quantidade de água e procurar auxílio médico. A azida pode formar compostos altamente explosivos com tubulações de chumbo e cobre. Portanto, utilizar grandes volumes de água para descartar o reagente.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos à contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Material necessário e não fornecido

1. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
2. Fotômetro capaz de medir, com exatidão, a absorvância entre 490 e 510 nm.
3. Pipetas para medir amostras e reagente.
4. Cronômetro.

Influências Pré-analíticas . A postura durante a colheita da amostra deve ser padronizada porque pode ter efeitos significativos nos resultados. Se as amostras são obtidas com o paciente na posição sentada, deve-se padronizar para que o indivíduo esteja sentado durante 15 minutos e não mais que 30 minutos.

Um garroteamento maior que 1 minuto produz hemoconcentração, o que pode aumentar os valores do colesterol em 5,0% após 2 minutos e 10,0 a 15,0% após 5 minutos. Portanto, é muito importante obter a amostra de sangue após liberar o torniquete devendo-se padronizar todo o procedimento da colheita.

A variação biológica do colesterol, decorrente da variação também biológica das lipoproteínas transportadoras do colesterol, é observada quando a dosagem do colesterol é repetida em um mesmo laboratório no espaço mínimo de uma semana. Ela ocorre independentemente do erro analítico e pode variar entre 1,7 e 11,6% com uma média de 6,1% devido, principalmente, à variação biológica da LDL que é a principal lipoproteína transportadora de colesterol.

Níveis elevados de ascorbato (vitamina C) produzem interferências negativas por competição com o cromogênio na reação da peroxidase. Se houver suspeita da presença de ácido ascórbico deixar o soro em repouso durante 90 minutos antes de iniciar a dosagem para minimizar a ação do interferente.

Amostra

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para colheita, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

De modo geral, a amostra de sangue pode ser obtida com ou sem jejum, mas é altamente recomendável que todos os ensaios dos lípides sanguíneos, incluindo o colesterol, sejam realizados em amostras colhidas em jejum. As vantagens da utilização de amostras colhidas em jejum são decorrentes da padronização da colheita, pois permitem a realização da determinação de outros lípidos que requerem o jejum e minimizam a interferência da lipemia pós prandial que está frequentemente presente em amostras obtidas sem o jejum.

Usar soro. Anticoagulantes como citrato, oxalato ou EDTA produzem resultados falsamente diminuídos. O analito é estável 7 dias entre 2 - 8 °C e 6 meses a 20 °C negativos⁵. Homogeneizar bem as amostras lipêmicas antes de iniciar a dosagem. Não utilizar amostras fortemente hemolisadas.

Como o volume de amostra é pequeno, deve-se pipetar com cuidado para minimizar a imprecisão do sistema de medição.

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras de sangue não transmitam infecções, todas elas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las, deve-se seguir as normas estabelecidas para biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico, sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

Valores de bilirrubina até 5 mg/dL, hemoglobina até 180 mg/dL e triglicérides até 2600 mg/dL não produzem interferências significativas. Valores de bilirrubina entre 5 e 38 mg/dL produzem resultados falsamente diminuídos proporcionais à concentração da bilirrubina.

Para avaliar a concentração aproximada da hemoglobina em uma amostra hemolisada pode-se proceder do seguinte modo: Diluir 0,05 mL da amostra em 2,0 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) e medir a absorvância em 405 ou 415 nm acertando o zero com água deionizada ou destilada.

$$\begin{aligned} \text{Hemoglobina(mg/dL)} &\cong \text{Absorbância}_{405} \times 601 \\ \text{Hemoglobina(mg/dL)} &\cong \text{Absorbância}_{415} \times 467 \end{aligned}$$

Procedimento

Ver observações 1, 2 e 3

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (Nº 2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e incubar em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. O nível de água no banho deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 510), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado.

Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculo se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

Cálculos

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 200$$

Exemplo

Absorbância do Teste = 0,290
Absorbância do Padrão = 0,345

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{0,290}{0,345} \times 200 = 168$$

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia, pode-se utilizar o método do fator.

$$\text{Fator de Calibração} = \frac{200}{\text{Absorbância do Padrão}}$$

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \text{Absorbância do Teste} \times \text{Fator}$$

Exemplo

$$\text{Fator} = \frac{200}{0,345} = 580$$

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = 0,290 \times 580 = 168$$

Calibração**Rastreabilidade do Sistema**

O padrão é rastreável ao *Standard Reference Material (SRM) 911* do *National Institute of Standards and Technology (NIST)*.

Calibrações manuais

Obter o fator de calibração ao usar novo lote de reagentes ou quando o controle interno da qualidade indicar.

Sistemas automáticos

Branco de reagentes: água deionizada ou destilada, ou solução de cloreto de sódio 150 mmol/L (0,85%);

Padrões: usar calibradores protéicos. As concentrações de Colesterol nos calibradores da linha Calibra Labtest são rastreáveis ao SRM 1951 do NIST.

Intervalo de calibrações

Deve-se recalibrar o sistema nas seguintes situações:

Calibração de 2 ou 3 pontos ao mudar de lote;

Calibração de 2 ou 3 pontos quando o controle interno da qualidade indicar.

Linearidade

O resultado da medição é linear até 500 mg/dL. Quando for obtido um valor igual ou maior que 500 mg/dL, diluir a amostra com NaCl 150 mmol/L (0,85%), realizar nova medição e multiplicar o resultado pelo fator de diluição. Diluir a amostra de tal modo que o valor encontrado se situe entre 150 e 300 mg/dL. Sugerimos a verificação da linearidade metodológica e fotométrica, no mínimo semestralmente, utilizando amostras com valores até 500 mg/dL.

Controle interno da qualidade . O laboratório deve manter um programa de controle da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações da qualidade e limites de controle, ações corretivas e registro das atividades.

Materiais de controle devem ser utilizados para avaliar a imprecisão e/ou desvios da calibração. Sugere-se procurar atender como limites máximos de controle as especificações propostas por NCEP¹⁰ para coeficiente de variação $\leq 3,00\%$, erro sistemático (bias) $\leq \pm 3,00\%$ e erro total $\leq 9,0\%$.

Sugere-se utilizar as preparações estabilizadas da linha Qualitrol - Labtest para controle interno da qualidade em ensaios de química clínica.

Valores recomendáveis ou desejados . Os valores abaixo substituem os valores de referência e foram determinados a partir de dados epidemiológicos tratados estatisticamente, que relacionam os níveis do colesterol com a prevalência de doença coronariana isquêmica (DCI).

Classificação ATP III de LDL, Colesterol Total e HDL (mg/dL):**Adultos¹⁰****Colesterol Total (mg/dL)**

Desejável	<200
Limiar elevado	200 - 239
Elevado	≥ 240

Colesterol HDL (mg/dL)

Baixo	<40
Elevado (Desejável)	≥ 60

Colesterol LDL (mg/dL)

Ótimo	<100
Limiar ótimo	100 - 129
Limiar elevado	130 - 159
Elevado	160 - 189
Muito Elevado	≥ 190

Crianças e Adolescentes⁹**Colesterol Total (mg/dL)**

2 a 19 anos	Desejável	<170
	Limítrofe	170 - 199
	Elevado	200

Colesterol HDL (mg/dL)

<10 anos	Desejável	40
10 a 19 anos	Desejável	35

Colesterol LDL (mg/dL)

2 a 19 anos	Desejável	<110
	Limítrofe	110 - 129
	Elevado	130

Conversão: Unidades Convencionais (mg/dL) x 0,026 = Unidades SI (mmol/L).

Características do desempenho¹¹

Exatidão . Em duas amostras com concentrações de colesterol iguais a 146 e 245 mg/dL foram adicionadas quantidades diferentes do analito, obtendo-se recuperações entre 94 e 110%. O erro sistemático proporcional médio obtido em um valor de 200 mg/dL foi igual a 4,0 mg/dL ou 2,0%.

Especificidade . O método proposto foi comparado com um método similar utilizando 60 amostras com valores situados entre 96 e 495 mg/dL. A comparação resultou na equação da regressão: $y = 6,92 + 0,96x$ e um coeficiente de correlação (r) igual a 0,996.

O erro sistemático total (constante e proporcional) verificado no nível de decisão (200 mg/dL) foi igual a 1,08 mg/dL ou 0,54%. Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e pacientes hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada.

Repetitividade - Imprecisão intra-ensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	10	175	2,69	1,5
Amostra 2	10	255	3,08	1,2
Amostra 3	10	357	4,23	1,2

Reprodutibilidade - Imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	10	173	4,23	2,4
Amostra 2	10	253	5,77	2,2
Amostra 3	10	353	8,46	2,1

Sensibilidade metodológica . Uma amostra protéica não contendo colesterol foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio tendo sido encontrado um valor igual a 1,04 mg/dL, equivalente a média de 20 ensaios mais dois desvios padrão. Utilizando-se a absorbância do padrão como parâmetro verificou-se que o limite de detecção fotométrica é de 0,06 mg/dL, correspondendo a uma absorbância igual a 0,0001.

Efeitos da diluição da matriz . Duas amostras com valores iguais a 330 e 400 mg/dL foram utilizadas para avaliar a resposta do sistema nas diluições da matriz com NaCl 150 mmol/L (0,85%). Usando fatores de diluição que variaram de 2 a 8 encontraram-se recuperações entre 99 e 113%.

Significado clínico . O grande dilema da aterosclerose é que ela é um processo silente. Está ativa em todos os indivíduos e permanece sem qualquer manifestação por décadas e, subitamente se manifesta através de dor torácica, infarto agudo do miocárdio ou morte súbita. Estudos populacionais longitudinais como os de Tecumset, Albany, Framingham, Evans, Chicago, Oslo entre outros, e também dados epidemiológicos e estudos experimentais em animais, demonstraram uma correlação positiva entre os níveis do colesterol, mais especificamente do colesterol LDL e o risco de doença arterial coronariana (DAC). Ao mesmo tempo foi evidenciado que os níveis de colesterol HDL são inversamente proporcionais ao risco de DAC.

Valores aumentados de colesterol são encontrados na nefrose, hipotireoidismo, doenças coleostáticas do fígado e nas hiperlipoproteinemias dos tipos IIa, IIb e III.

Níveis diminuídos são encontrados no hipertireoidismo, doenças consumptivas e desnutrição crônica.

Além do nível do colesterol sérico, a hipertensão e o fumo constituem fatores de risco de aterosclerose e DAC.

Observações

1. A limpeza e secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

2. A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, deve ter resistividade ≥ 1 megaohm ou condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L (água tipo II). Para o enxágüe da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade $\geq 0,1$ megaohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens.

No enxágüe final utilizar água tipo II. Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre a produção de água alcalina com liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

3. Para uma revisão das fontes fisiopatológicas e medicamentosas de interferência nos resultados e na metodologia sugere-se consultar Young DS. *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests*, 3ª edição, Washington: AACC Press, 1990.

Referências

- Alain CA, Poon LS, Cahn CSG, Richmond W, Fu PC. Clin Chem 1974;20:470.
- Bergmeyer HU. Methods of Enzymatic Analysis, 3ª edição, Verlag Chemie:Weinheim, 1984;8:141-8.
- Bull Org Mond Santé. 1970;43:891.
- Fredrickson DS, Levy RJ, Lee RS. New Engl J Med 1967; 276:24, 94, 148, 215, 276.
- Good NE, Winger GD, Winter W, Connoly TN, Izawa S, Singh RMM. Biochemistry 1966;5:467.
- Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH. Handbook of lipoprotein testing. AACC Press: Washington, 1997:75-97.
- Tonks DB. Quality Control in Clinical Laboratories, Warner-Chilcott Laboratories, Diagnostics Reagents Division, Scarborough, Canada, 1972.
- Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. Clin Chem 1981;27:493-501.

ANEXO D

Protocolo HDL

COLESTEROL HDL

Instruções de Uso

Ref.: **13**
MS 10009010026

Finalidade . Sistema para determinação do Colesterol HDL através da precipitação seletiva das lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL), por reação de ponto final.

[Somente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio . As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são quantitativamente precipitadas e, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (Colesterol HDL) é determinado no sobrenadante.

Características do sistema . Na seleção de um sistema para dosar o Colesterol HDL, a Labtest optou pelo ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio, que precipitando seletiva e quantitativamente as VLDL e LDL, permitem a obtenção de resultados comparáveis aos do método de referência.

Após centrifugação, o Colesterol HDL é determinado no sobrenadante utilizando o sistema enzimático Colesterol Liquiform Labtest (Ref. 76).

O sistema de medida colorimétrica é facilmente adaptável à maioria dos analisadores automáticos capazes de medir uma reação de ponto final em 500 nm.

Metodologia . Labtest.

Reagentes

1. [RE1] - Precipitante - Armazenar entre 2 - 8 °C.

Contém ácido fosfotúngstico 1,5 mmol/L e cloreto de magnésio 54 mmol/L.

2. [CAL] - Padrão 20 mg/dL - Armazenar entre 2 - 30 °C.

Contém colesterol 0,52 mmol/L e azida sódica 14,6 mmol/L. Armazenar bem vedado para evitar evaporação.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos à contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Precauções e cuidados especiais

Não utilizar o Reagente 1 - Colesterol Liquiform - Labtest (Ref. 76) quando sua absorbância, medida contra a água em 500 nm, for igual ou maior que 0,300 ou quando mostrar-se turvo ou com sinais de contaminação.

O padrão contém azida sódica que é tóxica. Deve-se tomar cuidado para evitar a ingestão e no caso de contato com os olhos, deve-se lavar imediatamente com grande quantidade de água e procurar auxílio médico.

A azida pode formar compostos altamente explosivos com tubulações de chumbo e cobre. Portanto, utilizar grandes volumes de água para descartar o reagente.

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação dos reagentes.

Materiais necessários e não fornecidos

1. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
2. Fotômetro capaz de medir, com exatidão, a absorbância entre 490 e 540 nm.
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.
5. Centrífuga com capacidade superior a 3500 rpm.
6. Reagente para determinação de colesterol.

Influências pré-analíticas . As concentrações do colesterol HDL medidas em um mesmo indivíduo e em diferentes ocasiões podem flutuar consideravelmente devido às variações biológicas e também às variações do método analítico. As concentrações no sangue são fortemente influenciadas por fatores tais como dieta recente, ingestão de álcool, variações do peso corporal, atividades físicas e hábito tabagista. Os hormônios e outras medicações também produzem variações na concentração do colesterol HDL.

Considera-se que a variação biológica seja em torno de 7,5%. Assim, em uma série de repetições da dosagem em um mesmo indivíduo, dois terços dos resultados estarão entre $\pm 7,5\%$ do valor médio. Portanto, a variação biológica se constitui no fator mais importante da variabilidade total do colesterol HDL. Os efeitos da variação biológica podem ser controlados até certo ponto através da padronização das condições de preparo do paciente e da colheita da amostra, mas o colesterol HDL não pode ser estimado com confiança através de um ensaio de uma única amostra. Várias amostras devem ser obtidas e a média dos resultados pode ser considerada como a concentração usual do colesterol HDL ou, mais exatamente, pode ser considerada a faixa usual de resultados para o indivíduo.

Amostra

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para colheita, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

Usar soro ou plasma (heparina-lítio e EDTA). Amostras com citrato ou oxalato não devem ser usadas porque produzem resultados falsamente diminuídos.

As amostras de soro ou plasma não devem permanecer entre 15 - 30 °C por mais de 14 horas. Quando as medições não são completadas dentro de 14 horas, as amostras devem ser armazenadas entre 2 - 8 °C por 7 dias e por 30 dias a 20 °C negativos. Deve-se armazenar em temperaturas ≤70 °C negativos quando houver necessidade de preservação por períodos maiores de tempo. Evitar congelamentos e descongelamentos repetidos. Amostras descongeladas devem ser bem misturadas antes da utilização. Não usar vórtex ou similar. Não usar amostras com sinais de contaminação microbiana.

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras de sangue não transmitem infecções, todas elas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las deve-se seguir as normas estabelecidas para biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

Concentrações de bilirrubina até 5 mg/dL, hemoglobina até 180 mg/dL e triglicérides até 750 mg/dL não produzem interferências significativas.

Concentrações de bilirrubina acima de 5 mg/dL produzem resultados falsamente diminuídos.

Concentrações de triglicérides acima de 750 mg/dL produzem resultados falsamente elevados.

Para avaliar a concentração aproximada da hemoglobina em uma amostra hemolisada pode-se proceder do seguinte modo: diluir 0,05 mL da amostra em 2,0 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) e medir a absorbância em 405 ou 415 nm acertando o zero com água deionizada ou destilada.

$$\begin{aligned} \text{Hemoglobina (mg/dL)} &\cong \text{Absorbância}_{405} \times 601 \\ \text{Hemoglobina (mg/dL)} &\cong \text{Absorbância}_{415} \times 467 \end{aligned}$$

Limitações do método . Manter sempre a relação Amostra/Precipitante igual a 1:1.

Após a centrifugação, remover o sobrenadante límpido dentro de 15 minutos para evitar resultados falsamente elevados.

Amostras lipêmicas e, ocasionalmente, amostras não lipêmicas podem apresentar o sobrenadante turvo. Neste caso, diluir a amostra 1:2 com NaCl 150 mmol/L e repetir a precipitação. Multiplicar o resultado final por 2. Caso o sobrenadante permaneça ainda turvo a amostra não pode ser utilizada para determinar o colesterol HDL.

Algumas amostras, principalmente lipêmicas, podem apresentar o sobrenadante límpido com uma camada na sua superfície que não deve ser pipetada, para evitar resultados falsamente elevados.

Procedimento

Ver limitações do método.

Precipitação das VLDL e LDL.

Em um tubo 12x75, adicionar:

Soro: 0,25 mL
Precipitante: 0,25 mL

Agitar vigorosamente durante 30 segundos. A agitação sugerida é fundamental para obtenção de resultados consistentes. Centrifugar a 3.500 rpm por pelo menos 15 minutos para obter um sobrenadante límpido. Pipetar o sobrenadante límpido imediatamente após a centrifugação, tomando o cuidado para não ressuspender o precipitado, a fim de evitar resultados falsamente elevados.

Colorimetria . Ver observações 1, 2 e 3.

Utilizar com o Reagente 1 - Colesterol Liquiform - Labtest (Ref. 76).

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Sobrenadante	----	0,1 mL	----
Padrão (nº2)	----	----	0,1 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e incubar em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 540) acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado.

Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculo se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

Cálculos . Devido a diluição 1:2 aplicada às amostras durante o procedimento de precipitação das VLDL e LDL, o valor do Padrão para cálculo dos resultados deve ser corrigido para 40 mg/dL.

$$\text{Colesterol HDL (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 40$$

Exemplo

Absorbância do Teste = 0,290
Absorbância do Padrão = 0,320

$$\text{Colesterol HDL (mg/dL)} = \frac{0,290}{0,320} \times 40 = 36$$

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia, pode-se utilizar o método do fator.

$$\text{Fator de Calibração} = \frac{40}{\text{Absorbância do Padrão}}$$

$$\text{Colesterol HDL (mg/dL)} = \text{Absorbância do Teste} \times \text{Fator}$$

Exemplo

$$\text{Fator} = \frac{40}{0,320} = 125$$

$$\text{Colesterol HDL (mg/dL)} = 0,290 \times 125 = 36$$

Unidades Convencionais: mg/dL

Unidades SI (mmol/L) = Unidades Convencionais x 0,026

Rastreabilidade do sistema . A calibração do sistema é rastreável ao Standard Reference Material (SRM) 911 do National Institute of Standards and Technology (NIST).

Linearidade

O resultado da medição é linear até 200 mg/dL. Quando for obtido um valor igual ou maior que 200 mg/dL, diluir a amostra 1:2 com NaCl 150 mmol/L (0,85%), realizar nova medição e multiplicar o resultado pelo fator de diluição.

Controle interno da qualidade . O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações da qualidade e limites de controle, ações corretivas e registro das atividades. Materiais de controle devem ser utilizados para avaliar a imprecisão e/ou desvios da calibração.

Sugere-se procurar atender como limites máximos de controle as especificações propostas por NCEP¹⁰ para coeficiente de variação $\leq 4,00\%$, erro sistemático (bias) $\leq 5,00\%$, erro total $\leq 12,8\%$.

Valores desejáveis ou recomendados . Estes valores devem ser usados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça, na população atendida, sua própria faixa de valores de referência.

Os valores desejáveis ou recomendados substituem os valores de referência e são determinados a partir de dados epidemiológicos, calculados estatisticamente, que relacionam os níveis do colesterol com a prevalência de doença coronariana isquêmica (DCI).

Classificação ATP III de Colesterol Total, LDL e HDL (mg/dL):

Crianças e Adolescentes⁹

Colesterol Total (mg/dL)

Idade: 2 a 19 anos	
Desejável	<170
Limítrofe	170 - 199
Elevado	≥ 200

Colesterol LDL (mg/dL)

Idade: 2 a 19 anos	
Desejável	<110
Limítrofe	110 - 129
Elevado	≥ 130

Colesterol HDL (mg/dL)

<10 anos	Desejável	≥ 40
10 a 19 anos	Desejável	≥ 35

Adultos¹⁰

Colesterol Total (mg/dL)

Desejável	<200
Limiar elevado	200 - 239
Elevado	≥ 240

Colesterol LDL (mg/dL)

Ótimo	<100
Limiar ótimo	100 - 129
Limiar elevado	130 - 159
Elevado	160 - 189
Muito Elevado	≥ 190

Colesterol HDL (mg/dL)

Baixo	<40
Elevado (Desejável)	≥ 60

Características do desempenho¹¹

Exatidão . Em duas amostras com concentrações de colesterol HDL iguais a 28 e 54 mg/dL foram adicionadas quantidades diferentes do analito, obtendo-se recuperações entre 95 e 100%. O erro sistemático proporcional médio obtido em um valor de 60 mg/dL foi igual a 1,2 mg/dL ou 2,0%.

Especificidade . O método proposto foi comparado com um método similar utilizando 80 amostras com valores situados entre 7 e 86 mg/dL. A comparação resultou na equação da regressão: $y = 1,337 + 0,932x$ e um coeficiente de correlação (r) igual a 0,993. O erro sistemático total (constante e proporcional) verificado no nível de decisão (60 mg/dL) foi igual a 2,74 mg/dL ou 4,5%.

Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e pacientes hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada.

Repetitividade - Imprecisão intra-ensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	40	0,60	1,5
Amostra 2	20	59	0,49	0,8

Reprodutibilidade - Imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	40	0,83	2,0
Amostra 2	20	58	0,99	1,7

Sensibilidade metodológica . Uma amostra protéica não contendo colesterol HDL foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio tendo sido encontrado um valor igual a 0,40 mg/dL, equivalente à média de 20 ensaios mais dois desvios padrão. Utilizando-se a absorbância do padrão como parâmetro, o limite de detecção fotométrica é de 0,12 mg/dL, correspondendo a uma absorbância igual a 0,001.

Efeitos da diluição da matriz . Uma amostra com valor igual a 92 mg/dL foi utilizada para avaliar a resposta do sistema nas diluições da matriz com NaCl 150 mmol/L (0,85%). Usando fatores de diluição que variaram de 1,2 a 2,0 encontraram-se recuperações entre 93 e 103%.

Significado clínico . Não há dúvida de que o colesterol é um fator de risco para DCI e que ele marcha - junto com o fumo, hipertensão e intolerância à glicose - como um dos quatro grandes fatores de DCI. Estudos prospectivos e retrospectivos não deixam dúvidas da existência de uma interrelação curvilínea entre os níveis de colesterol sérico, mais especificamente LDL e VLDL, e a incidência de DCI.

Em 1977 ficou demonstrado que o Colesterol HDL tem um efeito protetor contra a DCI. Os estudos de Framingham revelaram que os níveis do Colesterol HDL são inversamente proporcionais à prevalência de DCI.

Está bem estabelecido que níveis elevados de Colesterol LDL estão associados ao risco aumentado de DCI. Também, não há dúvida de que tanto o Colesterol Total quanto as frações LDL e VLDL podem ser diminuídas com dieta ou medicamento. A redução de 1% no valor do Colesterol Total diminui a prevalência de DCI em aproximadamente 2%.

As concentrações do Colesterol Total e do Colesterol HDL dependem de metabolismos distintos e não se deve fazer qualquer tentativa de buscar correlação entre seus níveis de concentração.

Como calcular a concentração do colesterol VLDL e LDL . As concentrações do Colesterol VLDL e LDL podem ser calculadas utilizando a equação de Friedewald, que é exata para amostras cujas concentrações de triglicérides não ultrapassem 400 mg/dL e não pertençam a pacientes portadores de lipoproteinemia do Tipo III.

Equação de Friedewald

Colesterol VLDL = Triglicérides / 5

Colesterol LDL = Colesterol Total - (HDL + VLDL)

Observações

1. A limpeza e secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

2. O laboratório clínico tem como objetivo fornecer resultados exatos e precisos. A utilização de água de qualidade inadequada é uma causa potencial de erros analíticos.

A água deionizada ou destilada utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes, usar nas medições e para uso no enxágüe final da vidraria, deve ter resistividade ≥ 1 megaohm.cm ou condutividade ≤ 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L. Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre produção de água alcalina com liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

3. Para uma revisão das fontes fisiopatológicas e medicamentosas de interferência nos resultados e na metodologia sugere-se consultar www.fxol.org/

Referências

- III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq Bras Cardiol 2001;77(suppl III):1-48.
- Tonks DB. Quality Control in Clinical Laboratories, Warner-Chilcott Laboratories, Diagnostic Reagents Division, Scarborough, Canada, 1972.
- Virella MFL, Stone P, Ellis S, Colwell G. Clin Chem 1977; 23:882-884.
- Warnick RG, Naguyent T, Albers AA. Clin Chem 1985; 2:217-222.
- Warnick RJ. Handbook of lipoprotein testing. Washington: AACC Press, 1997.
- Warnick RG, Wood PD. Clin Chem 1995; 41: 1427-33.
- NCEP - Detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). NIH Publication 02-5215, Bethesda, MD, 2002.
- Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Growth T. 1981;27:493-501.
- Leite PF, MartínezTLR, Halpern A, Cendoroglo MS, Novazzi JP, Fonseca FAH, dias JCA. Risco cardiovascular: fatores metabólicos e nutricionais: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Loyola, 1994. p.56.
- Executive Summary of the Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001;285:2486-97.
- Labtest. Dados de Arquivo.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo
Colesterol HDL	13-25	RI1 1 X 25 mL
		CAL 1 X 5 mL
	13-50	RI1 1 X 50 mL
		CAL 1 X 5 mL

ANEXO E

Protocolo triglicérides

TRIGLICÉRIDES Liquiform

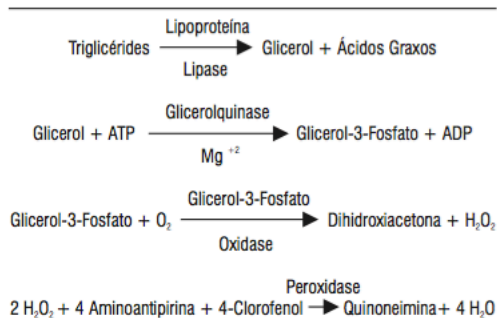
Instruções de Uso

Ref.: **87**
MS 10009010070

Finalidade . Sistema enzimático para determinação dos triglicérides por reação de ponto final em amostras de soro ou plasma (EDTA).

[Somente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio¹⁻⁵ . Os triglicérides são determinados de acordo com as seguintes reações:



A lipoproteína lipase promove a hidrólise dos triglicérides liberando glicerol, que é convertido, pela ação da glicerolquinase, em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina que tem máximo de absorvância em 505 nm.

A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração dos triglicérides na amostra.

Características do sistema . Triglicérides Liquiform utiliza metodologia colorimétrica enzimática que confere boa reprodutibilidade e grande especificidade ao sistema.

O reagente é disponibilizado sob a forma líquida, facilitando assim sua aplicação e eliminando a possibilidade de se introduzir erros durante as preparações de reagentes.

A necessidade de se repetir o teste em amostras de valores elevados é minimizada pela grande linearidade do sistema que se estende até 1100 mg/dL.

Os dados de repetitividade e reprodutibilidade obtidos com o sistema Triglicérides Liquiform demonstram que o método é capaz de fornecer resultados que superam as metas de desempenho para as medidas dos triglicérides estabelecidas pelo National Cholesterol Education Program (NCEP). A comparação entre as imprecisões encontradas na repetitividade e na reprodutibilidade demonstra que o sistema de medição é bastante robusto nas regiões de concentrações significativas para uso clínico, indicando que tem um desempenho muito estável no dia a dia.

O sistema é facilmente aplicável a analisadores automáticos e semi-automáticos capazes de medir com exatidão a absorvância em 505 nm.

Metodologia . Enzimático-Trinder⁶.

Reagentes:

1. [R1] - Reagente 1 - Armazenar entre 2 - 8 °C.

Contém tampão 50 mmol/L, pH 7,0; íons magnésio 4 mmol/L; 4-clorofenol 2,70 mmol/L; 4-aminoantipirina 300 µmol/L; ATP 1,8 mmol/L; lipoproteína lipase ≥1400 U/L; glicerolquinase ≥1000 U/L; glicerolfosfato oxidase ≥1500 U/L; peroxidase ≥900 U/L e azida sódica 0,095%.

Para preservar o desempenho, o reagente deve permanecer fora da geladeira somente o tempo necessário para se obter o volume a ser utilizado. Evitar exposição à luz solar direta. **O reagente apresenta uma tonalidade amarelada.**

2. [CAL] - Padrão - Armazenar entre 2 - 30 °C.

Contém triglicérides 200 mg/dL e azida sódica 0,045%.

Após o manuseio armazenar bem vedado para evitar evaporação.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução do tempo de estabilidade.

Precauções e cuidados especiais

Para preservar o desempenho, os reagentes devem permanecer fora da geladeira somente o tempo necessário para se obter o volume a ser utilizado. Evitar exposição à luz solar direta.

Não utilizar o Reagente 1 quando sua absorvância medida contra água em 505 nm for igual ou maior que 0,300 ou quando mostrar-se turvo ou com sinais de contaminação. **O reagente apresenta uma tonalidade amarelada.**

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação dos reagentes.

Os reagentes contêm azida sódica que é tóxica. Deve-se tomar cuidado para evitar a ingestão e no caso de contato com os olhos deve-se lavar imediatamente com grande quantidade de água e procurar auxílio médico.

A azida pode formar compostos altamente explosivos com tubulações de chumbo e cobre. Utilizar grandes volumes de água para descartar os reagentes.

Material necessário e não fornecido

1. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
2. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorvância entre 490 e 520 nm.
3. Pipetas para medir amostras e reagente.
4. Cronômetro.

Influências pré-analíticas^{5,7,8}. Como a concentração de triglicérides é influenciada por hábitos dietéticos recentes, como consumo de álcool e por variações do peso corporal e exercício físico, os valores dos triglicérides em um mesmo indivíduo são bastante variáveis. Os dados obtidos dentro de um mês, usando um método com CV analítico de 3,0%, mostraram que a variação biológica pode ser maior que 90% da variação intra-individual total. Mesmo nos estados de jejum, ocorre considerável variação biológica, podendo mostrar diferenças de 21% em medições repetidas no mesmo indivíduo.

Na ausência de jejum a concentração plasmática dos triglicérides modifica-se consideravelmente no mesmo indivíduo apresentando diferenças de até 1000%.

Amostras colhidas com heparina podem fornecer resultados falsamente diminuídos.

Obter a amostra com o paciente assentado. O torniquete não deve ser mantido por tempo maior que um minuto. Liberar o torniquete antes de aspirar o sangue.

A contaminação do material utilizado ou da amostra com glicerol fornece valores falsamente elevados. Assim, os resultados obtidos em pacientes recebendo alimentação parenteral devem ser interpretados com cautela porque esta alimentação contém elevados teores de glicerol.

Níveis elevados de ácido ascórbico (vitamina C) produzem interferências negativas por competição com o cromogênio na reação da peroxidase. Se houver suspeita da presença de ácido ascórbico, deixar o soro em repouso durante 90 minutos antes de iniciar a dosagem para evitar resultados de triglicérides falsamente diminuídos. Este procedimento minimiza os valores de ácido ascórbico, podendo não ser eficiente caso a concentração deste esteja elevada na amostra.

Amostra

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para colheita, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

A amostra de sangue deve ser obtida após jejum de 12-14 horas. Deve-se enfatizar ao paciente a necessidade do jejum no tempo recomendado. A falta de padronização nas colheitas das amostras para a dosagem dos triglicérides tem gerado enormes conflitos entre pacientes, médicos clínicos e os laboratórios, porque, em muitos casos, não se toma o cuidado de enfatizar aos pacientes a necessidade do jejum de 12-14 horas antes da colheita da amostra.

Usar soro ou plasma com EDTA. O analito é estável por dois dias entre 2 - 8 °C. O armazenamento prolongado da amostra não é recomendado. Os triglicérides podem ser hidrolisados, liberando glicerol, o que leva à obtenção de resultados falsamente diminuídos quando o ensaio utiliza branco para eliminar a interferência do glicerol livre.

A heparina promove a ativação in vivo ou in vitro da lipoproteína lipase, fazendo com que a concentração dos triglicérides se reduza gradativamente em amostras contendo heparina. Este fenômeno ocorre também em amostras de soro obtidas em pacientes recebendo doses terapêuticas de heparina.

Estas orientações para obtenção e conservação da amostra estão padronizadas segundo as recomendações do NCEP⁹.

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras de sangue não transmitam infecções, todas elas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las, deve-se seguir as normas estabelecidas para Biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico, sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

Valores de Bilirrubina até 10 mg/dL e Hemoglobina até 200 mg/dL não produzem interferências significativas. Valores de bilirrubina maiores que 10 mg/dL produzem resultados falsamente diminuídos.

Devido ao rápido consumo do oxigênio do meio, pode-se obter resultados de triglicérides normais em amostras fortemente lipêmicas (triglicérides superior a 2000 mg/dL). Deste modo, deve-se diluir essas amostras 1:10 (1 parte de amostra e 9 partes de NaCl 150 mmol/L), antes da realização do teste¹⁰.

Para avaliar a concentração aproximada da hemoglobina em uma amostra hemolisada pode-se proceder do seguinte modo: Diluir 0,05 mL da amostra em 2,0 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) e medir a absorvância em 405 ou 415 nm, acertando o zero com água deionizada ou destilada.

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} \approx \text{Absorbância}_{405} \times 601$$

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} \approx \text{Absorbância}_{415} \times 467$$

Procedimento

Separar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	----	0,01 mL	----
Padrão	----	----	0,01 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar em banho maria a 37 °C durante 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 505 nm ou filtro verde (490 a 520), acertando o zero com o branco. A cor é estável 60 minutos.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente, sem prejuízo para o desempenho do teste, mantendo-se inalterado o procedimento de cálculo. Em caso de redução dos volumes, é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes de amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

Cálculos . Ver linearidade

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 200$$

Exemplo:

$$\begin{aligned} \text{Absorbância do Teste} &= 0,174 \\ \text{Absorbância do Padrão} &= 0,244 \end{aligned}$$

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = \frac{0,174}{0,244} \times 200 = 143$$

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia, pode-se utilizar o método do fator.

$$\text{Fator de Calibração} = \frac{200}{\text{Absorbância do Padrão}}$$

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = \text{Absorbância do Teste} \times \text{Fator}$$

Exemplo:

$$\text{Fator} = \frac{200}{0,244} = 820$$

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = 0,174 \times 820 = 143$$

Calibração . O padrão é rastreável ao Standard Reference Material (SRM) 1951 do National Institute of Standards and Technology (NIST).

Calibrações manuais

Obter o fator de calibração ao usar novo lote de reagentes e quando o controle interno da qualidade indicar.

Sistemas automáticos

Branco de reagentes: água ou solução de cloreto de sódio 150 mmol/L (0,85%);

Usar calibrador da linha Calibra - Labtest. A concentração de Triglicérides no calibrador é rastreável ao SRM 1951 do NIST.

Frequência de calibrações

Calibração de 2 pontos ao mudar de lote;

Calibração de 2 pontos quando o controle interno da qualidade indicar.

Linearidade

O resultado da medição é linear até 1100 mg/dL. Para valores maiores, diluir a amostra com NaCl 150 mmol/L (0,85%), realizar nova medição e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

Controle interno da qualidade . O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações da qualidade e limites de controle, ações corretivas e registro das atividades. Materiais de controle devem ser utilizados para avaliar a imprecisão e/ou desvios da calibração. Sugere-se procurar atender como limites máximos de controle as especificações propostas pelo NCEP¹¹ para coeficiente de variação $\leq 5,0\%$, erro sistemático (bias) $\leq 5,0\%$ e erro total $\leq 15,0\%$ ¹².

Sugere-se utilizar as preparações estabilizadas da linha Qualitrol - Labtest para controle interno da qualidade em ensaios de química clínica.

Valores desejáveis ou recomendados . São valores que substituem os valores de referência. Foram determinados a partir de dados epidemiológicos tratados estatisticamente e estabelecem a concentração de triglicérides como fator de risco independente para doença coronariana isquêmica¹³.

Triglicérides (mg/dL)	
Desejável	< 150
Limiar Alto	150 - 199
Elevado	200 - 499
Muito Elevado	> 500

Valores desejáveis ou recomendados pediátricos¹⁴

	Triglicérides (mg/dL)	
	< 10 anos	10 a 19 anos
Desejável	≤ 100	≤ 130
Elevado	> 100	> 130

Conversão: Unidades Convencionais (mg/dL) x 0,0113 = Unidades SI (mmol/L).

Características do desempenho¹⁵

Estudos de recuperação . A recuperação foi obtida utilizando diluições de amostras com valores elevados de triglicérides. As recuperações variaram entre 100 e 102%. O erro sistemático proporcional médio obtido em um valor de 200 mg/dL é igual a 4 mg/dL ou 2%.

Comparação de métodos . O método proposto foi comparado com um método similar utilizando 40 amostras de soro com valores situados entre 38 e 652 mg/dL medidas em duplicata. A comparação resultou na equação da regressão: $y = 1,035x - 1,4$ e um coeficiente de correlação (r) igual a 0,998. O erro sistemático total (constante e proporcional) verificado no nível de decisão (200 mg/dL) é igual a 7,0 mg/dL ou 3,5%. O erro total no mesmo nível de decisão é 5,0%.

Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e pacientes hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada e atende aos requisitos especificados pelo NCEP⁹.

Estudos de precisão. Os estudos de precisão foram realizados no sistema Labtest/Labmax 240[®], utilizando amostras com concentrações iguais a 151, 197 e 412 mg/dL.

Repetitividade - Imprecisão intra-ensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	80	151	1,59	1,06
Amostra 2	80	197	2,59	1,31
Amostra 3	80	412	4,30	1,04

Reprodutibilidade - Imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	80	151	2,89	1,92
Amostra 2	80	197	3,80	1,93
Amostra 3	80	412	6,58	1,60

Sensibilidade metodológica. Limite de detecção: 3 mg/dL. Equivale a 3 desvios padrão (DP) obtido a partir do resultado de 20 medições de uma amostra com concentração de triglicérides igual a 70 mg/dL.

Utilizando-se a absorbância do padrão como parâmetro, verificou-se que o limite de detecção fotométrica é de 0,82 mg/dL, correspondendo a uma absorbância igual a 0,001.

Efeitos da diluição da matriz. Duas amostras com valores iguais a 977 e 1051 mg/dL foram utilizadas para avaliar a resposta do sistema nas diluições da matriz com NaCl 150 mmol/L (0,85%). Usando fatores de diluição que variaram de 2 a 8 encontraram-se recuperações entre 100 e 102%.

Significado clínico. Recentes meta-análises de estudos prospectivos indicam que os triglicérides elevados são também um fator de risco independente para doença coronariana isquêmica (DCI). Fatores que contribuem para valores elevados de triglicérides na população em geral incluem obesidade e sobrepeso, inatividade física, tabagismo, consumo excessivo de álcool e dietas com elevado conteúdo de carboidratos.

Os achados de que valores triglicérides elevados representam um fator de risco independente para DCI sugerem que algumas lipoproteínas ricas em triglicérides sejam aterogênicas, principalmente, as VLDL parcialmente degradadas, comumente chamadas lipoproteínas remanescentes.

Na prática clínica, o colesterol VLDL (Triglicérides + 5) é a mais simples medida das lipoproteínas aterogênicas remanescentes. Assim, o colesterol VLDL pode ser também um alvo da terapêutica para redução do colesterol. O Adult Treatment Panel (ATP) III proposto pelo NCEP identifica a soma dos valores de colesterol LDL + VLDL [Colesterol não HDL (colesterol total - colesterol HDL)] como alvo secundário da terapêutica em pessoas com triglicérides elevados (≥ 200 mg/dL).

A meta para o colesterol não HDL, em pessoas com valores elevados de triglicérides, pode ser estabelecida como sendo o valor do colesterol LDL mais 30 mg/dL (VLDL), com base na premissa de que valores de colesterol VLDL menores que 30 mg/dL são considerados desejáveis¹³.

São causas de elevação dos triglicérides as várias doenças de lipídeos chamadas hiperlipidemias ou hiperlipoproteinemias. Nestas, sejam de causa primária ou secundária, ocorre elevação dos triglicérides nos tipos I, IIb, III, IV e V.

As hiperlipidemias ocorrem secundariamente no diabetes, pancreatite, doença do armazenamento de glicogênio, síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, hipotireoidismo, gravidez e mieloma múltiplo.

Várias mulheres em uso de estrógenos ou contraceptivos orais apresentam aumento nas concentrações de triglicérides. A hipertrigliceridemia também encontra-se associada ao uso de bloqueadores beta-adrenérgicos, corticosteróides, diuréticos tiazídicos e retinóides.

Observações

1. A limpeza e secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

2. A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, deve ter resistividade ≥ 1 megaohm ou condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L (água tipo II). Para o enxágue da vidraria, a água pode ser do tipo III, com resistividade $\geq 0,1$ megaohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxágue final utilizar água tipo II. Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre a produção de água alcalina com liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

3. Para uma revisão das fontes fisiopatológicas e medicamentosas de interferência nos resultados e na metodologia sugere-se consultar Young DS, Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3^ª edição, Washington: AACC Press, 1990.

Referências

- Bucolo G, David H. Clin Chem 1973; 19: 475.
- Fossati P, Prencipe L. Clin Chem 1982; 28: 2077.
- Mc Gowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B. Clin Chem 1983; 29: 538.
- Nagele V, Hagele EO, Sauer G, Wiedeman E, Lehmann P, Wahlefeld AW, Gruber W J Clin Chem Clin Biochem 1984; 22: 165.
- Stein EA, Myers GI. Clin Chem 1995; 41: 1421-26.
- Trinder P. Ann Clin Biochem 1969; 6: 24.

ANEXO H

Patente depositada e liberada



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 10 2012 015857-4 A2

(22) Data de Depósito: 11/06/2012
(43) Data da Publicação: 29/04/2014
(RPI 2260)



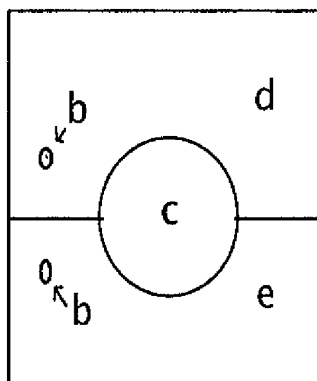
(51) Int.Cl.:
A01K 29/00
A01K 15/04

(54) Título: IMOBILIZADOR PARA COELHOS E ROEDORES MAIORES

(73) Titular(es): PAULO ROBERTO DA SILVA LIMA

(72) Inventor(es): PAULO ROBERTO DA SILVA LIMA

(57) Resumo: IMOBILIZADOR PARA COELHOS E ROEDORES MAIORES. compreendido por uma caixa sem uma das paredes na parte posterior, uma parte superior removível e na parte anterior possui um orifício circular grande em seu centro e dividida em duas partes, sendo a superior dobrável; é feita por materiais comuns já existentes no comércio e caracterizado por possuir uma forma de paralelograma (fig. 9) sendo um dos lados do quadrado aberto (fig. 2 e 9) e o outro quadrado com abertura circular em seu centro e dividido em duas metades (fig. 1, 6, 8 e 9), essas, unidas entre si por uma dobradiça (fig. 8 letra g) presa por meio de parafusos e fechada no lado esquerdo por um gancho (fig. 6 letra f, fig. 7 e fig. 9 letra f), esse, preso na porção superior (fig. 1, 6, 9 letra d) por um aro parafusado (fig. 1, 6, 9, letras b, b1 e b2) e que se encaixa com o outro aro parafusado (fig. 1, 6, 9, letras b, b1 e b2) na porção inferior não móvel da parte da frente do imobilizador (fig. 1, 6, 8, 9, letra e) para fixar as metades da frente do imobilizador. A abertura da frente (fig. 1 e 9, letra c) é pequena o suficiente para o crânio do animal e grande o suficiente para o pescoço do mesmo. As laterais possuem, em sua porção superior interna, uma aresta que serve de trilho (fig. 2, 5, 9, letra a) para uma tampa (fig. 4), para imobilizar mais, o animal. A porção interna de todo o imobilizador é dura, lisa e deslizante.



“Imobilizador para coelhos e roedores maiores”.

O invento tratado no presente pedido de patente, refere-se a obtenção de um imobilizador para coelhos e roedores
5 maiores, mediante sistema de encaixamento, sendo de uso veterinário, especialmente projetado para atender aos animais roedores, tipo coelho.

Mediante as apurações das pesquisas realizadas nos estabelecimentos de ordem veterinária e nos laboratórios de pesquisa que envolve animais, especificamente coelhos, constatou-se que são
10 grandes as dificuldades que o profissionais especializados nessas classes têm ao manipular esses animais sem a correta imobilização.

Os procedimentos de imobilização conhecidos para esses animais são compreendidos por: anestésicos, tranquilizantes, toalhas ou panos longos contornando o animal, porém nesse último
15 procedimento, pelo fato dos animais terem unhas grandes e afiadas, os tecidos rasgam e podem ferir o manipulador do coelho, como também sujar o manipulador do animal (pelos e uréia da sua urina). Alguns procedimentos como: pesagem, procedimentos tópicos na cabeça ou orelhas poderiam ser realizados apenas com anestesia local, evitando-se usar medicação sistêmica
20 e outros efeitos colaterais, ou até mesmo morte do roedor, dependendo da dosagem do anestésico administrada ao mesmo.

Os métodos tradicionais de imobilização e o método com o uso do imobilizador para coelhos e roedores maiores estão voltados para a questão de imobilizar esse espécie, com firmeza, conforto e

2/5

segurança, deixando o animal em posição confortável e tranquilo. Esses métodos tradicionais, com observação aos anestésicos e tranquilizantes, por caracterizarem-se por composições de uso de fármacos, possuem algumas desvantagens, que geralmente, são as de pequena acessibilidade à ação imediata do profissional para realizar os procedimentos. O uso de tecidos (toalhas, panos, entre outros) não dão a devida estabilidade e o manipulador necessita de outro indivíduo para realizar determinados procedimentos, haja vista um membro superior do manipulador estará segurando e mantendo a contenção do animal e se soltar o tecido envolvente do animal ele se soltará.

10 Tendo em vista esses problemas, no propósito de superá-los, e em decorrência às unhas cortantes dos coelhos (ao se sentirem ameaçados), projetou-se o imobilizador para coelhos e roedores maiores, que objetiva em levar à aplicabilidade industrial, uma técnica de imobilização para essa espécie, que ofereça maior estabilidade e segurança, correspondendo as mais diversas necessidades da classe veterinária e dos pesquisadores nos laboratórios.

O imobilizador para coelhos e roedores maiores abrange amplamente as mais diversas variedades em atividades práticas, podendo ser de utilidade em hospitais veterinários, consultórios veterinários, laboratórios de análises e pesquisas animais, faculdades e aplicações particulares outras. Pode atender diferentes tamanhos dos coelhos ao colocar em mini-tapete emborrachado em seu interior para os animais menores.

3/5

Com a construção técnica assim descrita nesse documento, torna-se mais simples que os métodos convencionais, pelo fato de que suas características específicas aos processos de imobilização, não oferecem qualquer tipo de restrições que venham impedir a ação de seu operador, nem que venha oferecer qualquer tipo de desconforto ao animal. Sua configuração técnica caracteriza-se por ser composto de objetos já conhecidos e comercializados, proporcionando o emprego de melhor adaptação, frente aos métodos já mencionados, sendo de utilidade para fabricação, nas indústrias de artefatos em plástico, em PVC – Cloreto de Polivinila e madeiras.

Os desenhos anexos mostram a disposição do imobilizar para coelhos e roedores maiores, nos quais:

- A fig. 1 mostra a visão de frente;
- A fig. 2 mostra a visão de trás;
- A fig. 3 mostra a visão inferior;
- A fig. 4 mostra a visão superior da tampa removível e opcional;
- A fig. 5 mostra a visão da porção lateral, vista por dentro e em destaque marrom o trilho para tampa;
- A fig. 6 mostra a visão lateral esquerda da frente, dividida em uma porção superior móvel em balança (letra d) e uma porção inferior não móvel (letra e);
- A fig. 7 mostra a trava de fechamento tipo gancho;

4/5

- A fig. 8 mostra a visão lateral direita da frente do imobilizador, dividida em uma porção superior móvel em báscula (letra d) por meio de uma dobradiça e uma porção inferior não móvel (letra e).

De conformidade com as figuras acima

5 mencionadas, o modelo de imobilizador para coelhos, objeto do presente pedido de patente, consiste em uma caixa em forma de paralelograma (fig. 9) sendo um dos lados do quadrado aberto (fig. 2 e 9) e o outro quadrado com abertura circular em seu centro e dividido em duas metades (fig. 1,6,8 e 9), essas, unidas entre si por uma dobradiça (fig. 8 letra g) presa por meio de

10 parafusos e fechada no lado esquerdo por um gancho (fig. 6 letra f, fig. 7 e fig. 9 letra f), esse, preso na porção superior (fig. 1, 6, 9 letra d) por um aro parafusado (fig. 1,6,9, letras b, b1 e b2) e que se encaixa com o outro aro parafusado (fig. 1,6,9, letras b,b1 e b2) na porção inferior não móvel da parte da frente do imobilizador (fig. 1,6,8, 9, letra e) para fixar as metades da frente

15 do imobilizador. A abertura da frente (fig. 1 e 9, letra c) serve para a exteriorização da cabeça do coelho de tal maneira que o impeça de ir para frente ou para trs sem sufocá-lo, isto ocorre, pois o orifício é pequeno o suficiente para o crneo do animal e grande o suficiente para o pescoço do mesmo. As laterais possuem, em sua porção superior interna, uma aresta que

20 serve de trilho (fig. 2,5,9, letra a) para uma tampa (fig. 4), caso queira imobilizar o animal para não ficar pulando com as patas traseiras. A porção interna de todo o imobilizador  dura, lisa e deslizante, impossibilitando que o coelho fixe suas unhas e obtenha apoio para realizar força.

5/5

O método com o uso do imobilizador para coelhos e roedores maiores oferece estabilidade e conforto, onde o animal poderá ficar imobilizado, podendo ser deslocado, ser submetido a procedimentos na cabeça ou orelhas com anestésico local, ou realizar

5 gavagem, ou ser deixado na bancada por alguns instantes sem que o pesquisador ou veterinário precise de outra pessoa para pegar algo, fazer uma medida de peso mais precisa sem que o animal esteja se mexendo, atrapalhando a leitura do seu peso. Os animais menores poder ser acomodados ao se colocar um emborrachado nas laterais, pela parte de dentro

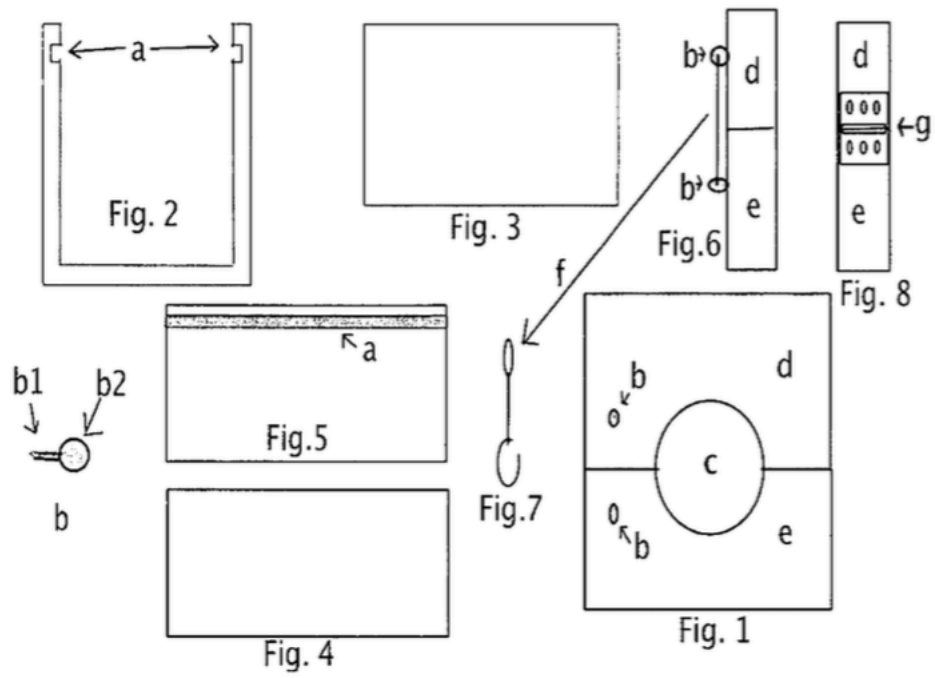
10 do imobilizador.

1/1

REINVIDICAÇÃO

1) **“Imobilizador para coelhos e roedores maiores”** compreendido por uma caixa sem uma das paredes na parte posterior, uma parte superior removível e
5 na parte anterior possuindo um orifício circular grande em seu centro e dividida em duas partes, sendo a superior dobrável; é feita por materiais comuns já existentes no comércio e caracterizado por possuir uma forma de paralelograma (fig. 9) sendo um dos lados do quadrado aberto (fig. 2 e 9) e o outro quadrado com abertura circular em seu centro e dividido em duas
10 metades (fig. 1,6,8 e 9), essas, unidas entre si por uma dobradiça (fig. 8 letra g) presa por meio de parafusos e fechada no lado esquerdo por um gancho (fig. 6 letra f, fig. 7 e fig. 9 letra f), esse, preso na porção superior (fig. 1, 6, 9 letra d) por um aro parafusado (fig. 1,6,9, letras b, b1 e b2) e que se encaixa com o outro aro parafusado (fig. 1,6,9, letras b,b1 e b2) na porção inferior não móvel
15 da parte da frente do imobilizador (fig. 1,6,8, 9, letra e) para fixar as metades da frente do imobilizador. A abertura da frente (fig. 1 e 9, letra c) serve para a exteriorização da cabeça do coelho de tal maneira que o impeça de ir para frente ou para trás sem sufocá-lo, isto ocorre, pois o orifício é pequeno o suficiente para o crânio do animal e grande o suficiente para o pescoço do
20 mesmo. As laterais possuem, em sua porção superior interna, uma aresta que serve de trilho (fig. 2,5,9, letra a) para uma tampa (fig. 4), caso queira imobilizar o animal para não ficar pulando com as patas traseiras. A porção interna de todo o imobilizador é dura, lisa e deslizante, impossibilitando que o coelho fixe suas unhas e obtenha apoio para realizar força.

1/2



2/2

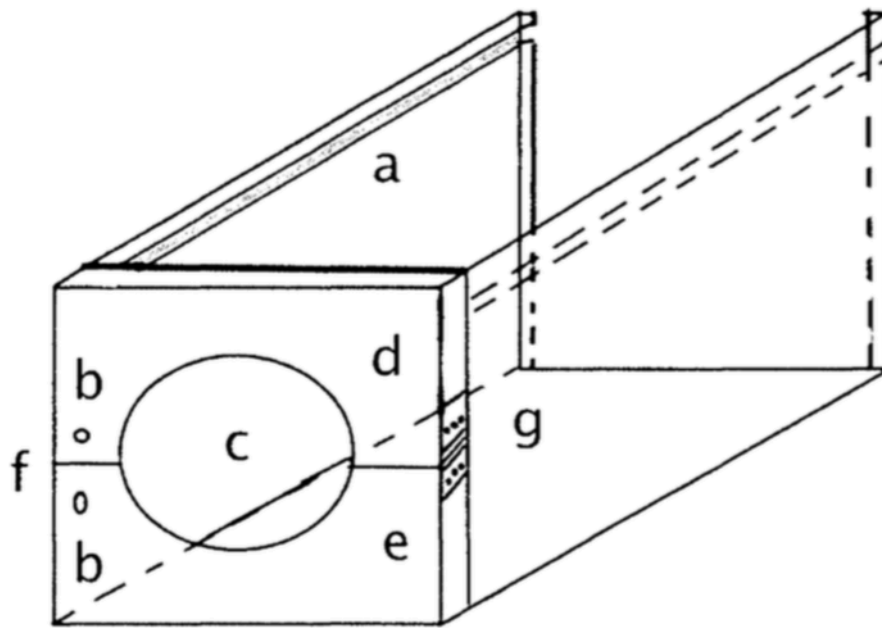


Fig. 9

1/1

RESUMO

5 “Imobilizador para coelhos e roedores maiores” compreendido por uma caixa sem uma das paredes na parte posterior, uma parte superior removível e na parte anterior possui um orifício circular grande em seu centro e dividida em duas partes, sendo a superior dobrável; é feita por materiais comuns já existentes no comércio e caracterizado por possuir uma forma de paralelograma (fig. 9) sendo um dos lados do quadrado aberto (fig. 2 e 9) e o outro quadrado com abertura circular em seu centro e dividido em duas 10 metades (fig. 1,6,8 e 9), essas, unidas entre si por uma dobradiça (fig. 8 letra g) presa por meio de parafusos e fechada no lado esquerdo por um gancho (fig. 6 letra f, fig. 7 e fig. 9 letra f), esse, preso na porção superior (fig. 1, 6, 9 letra d) por um aro parafusado (fig. 1,6,9, letras b, b1 e b2) e que se encaixa com o outro aro parafusado (fig. 1,6,9, letras b,b1 e b2) na porção inferior não móvel 15 da parte da frente do imobilizador (fig. 1,6,8, 9, letra e) para fixar as metades da frente do imobilizador. A abertura da frente (fig. 1 e 9, letra c) é pequena o suficiente para o crânio do animal e grande o suficiente para o pescoço do mesmo. As laterais possuem, em sua porção superior interna, uma aresta que serve de trilho (fig. 2,5,9, letra a) para uma tampa (fig. 4), para imobilizar mais, 20 o animal. A porção interna de todo o imobilizador é dura, lisa e deslizante.

ANEXO I

Protocolo HHF35 monoclonal



**Monoclonal Mouse
Anti-Human
Muscle Actin
Clone HHF35**

ENGLISH
Code M0635

Intended use
For In Vitro Diagnostic Use.

This antibody is intended for laboratory use to identify qualitatively by light microscopy an epitope present on muscle actin in normal and neoplastic tissues using immunohistochemical (IHC) test methods. Clone HHF35 has been demonstrated to be a reliable marker for soft tissue tumors with muscle differentiation, i.e. leiomyomas (LM), leiomyosarcomas (LMS), and rhabdomyosarcomas (RMS).² The clinical interpretation of any positive staining or its absence should be complemented by morphological and histological studies with proper controls. Evaluations should be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified individual.

Summary and explanation

Actin, a highly conserved, ubiquitous cytoskeletal protein of muscle and nonmuscle cells, exists in three isotypes (α , β , γ) that differ by their amino acid sequences and isoelectric points. The monoclonal mouse anti-human Muscle Actin, clone HHF35 was made by immunizing mice with a polypeptide fraction of human myocardium from a case of idiopathic hypertrophic subaortic stenosis.

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Reagent provided

Monoclonal Mouse antibody provided in liquid form as tissue culture supernatant in 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.2 and 0.015 mol/L sodium azide. This product contains stabilizing protein.

Clone: HHF35 Isotype: IgG₁, kappa
Mouse IgG concentration mg/L: See label on vial.

M0635 may be used at a dilution of 1:50 when performing IHC using the LSAB2 detection system. These are guidelines only. Optimal antibody concentrations may vary depending on specimen and preparation method, and should be determined by each individual laboratory.

Immunogen

SDS extracted protein fraction of human myocardium

Specificity

Actin does not react with the α -actin of non-muscle (endothelial cells) sources.¹ Gel electrophoresis and immunoblots show the specificity of HHF35 to be for the α - and γ -actin isotypes of skeletal, cardiac and smooth muscle.¹

Materials required, but not supplied

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* and/or the detection system instructions. Suggested diluent for IHC procedures: Dilution of this antibody in a buffer containing 0.08 mol/L EDTA is recommended to reduce nonspecific background staining.³ The following negative control is recommended for IHC procedures:

Mouse IgG₁ (code X0931).

Precautions

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, NaN₃ may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.^{4,5}
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
5. Unused reagents should be disposed of according to local, State, and Federal regulations.

Storage

Store at 2–8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

Specimen preparation*Paraffin Sections*

Anti-Muscle Actin, HHF35 can be used on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Pretreatment of tissue with proteolytic enzymes is not required.

Cryostat Sections and Cell Smears

Anti-Muscle Actin, HHF35 can be used for labelling acetone-fixed cryostat sections or fixed cell smears.

Staining procedure

Follow the procedure for the detection system selected.

Staining interpretation

The cellular staining pattern for anti-muscle actin is cytoplasmic.

Product specific limitations

- Schmidt, et al. and others found that the addition of EDTA to an HHF35 primary antibody diluent reduced nonspecific staining^{2,3} and also decreased the chances of false-positive staining of neuroblastomas, retinoblastomas, and Ewing Sarcomas while maintaining adequate sensitivity for myogenic tumors.³
- Miettinen found mild enzyme predigestion (pepsin, pronase, trypsin) to improve staining quality of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue,⁷ however, Dako does not recommend tissue pretreatment.
- Only rarely was immunoreactivity with HHF35 observed in isolated spindle cells of the liver, lymph nodes, kidney, pancreas, and the adrenal gland.⁸
- Neoplastic cells of some pleomorphic undifferentiated sarcomas (malignant fibrous histiocytomas, MFH) have been reported positive, localized only to the smooth muscle cells and pericytes of blood vessels.^{2,7}

Performance characteristics*Normal Tissues*

In normal tissue, HHF35 demonstrates cytoplasmic staining of striated fibers of skeletal muscles, the smooth muscles of arteries, veins and pericytes of smaller arteries, the tunica muscularis of the GI tract, the myometrium of the uterus, prostatic stroma, the capsule cells of several parenchymal organs, including liver, kidney, lymph nodes and spleen, and the myoepithelial layers of the mammary ducts and glands, and the eccrine sweat, bronchial and salivary glands.^{1,2,7-9} Other non-muscle cells are non-reactive, including vascular endothelial cells, epithelial cells, lymphoid cells, macrophages, connective tissue, and neural cells.^{1,2,8,9}

Abnormal Tissues

In pathological tissues, HHF35 was demonstrated to be a reliable marker for soft tissue tumors with muscle differentiation, i.e. leiomyomas (LM), leiomyosarcomas (LMS) and rhabdomyosarcomas (RMS), for which it displayed a higher degree of sensitivity than desmin antibodies.² This was confirmed by Schmidt, et al.³ who found 29/30 RMS, including embryonal, alveolar, botryoid and pleomorphic subtypes, regardless of the degree of differentiation, to be HHF35 positive. A study comprising 285 well characterized soft tissue tumors¹ found 17/17 RMS, 31/32 LMS, 23/23 LM and 3/5 pleomorphic liposarcomas to be immunoreactive with HHF35. The majority of glomus tumors also reacted with HHF35.^{7,10} Desmoid tumors showed occasional positive cells in 9/15 cases.⁷ Similar results were reported by others⁵ who found 34/35 RMS, 11/22 LMS, 5/6 LM and 4/4 rhabdomyomas to be HHF35 reactive. The myofibroblasts of some lesions, including reactive tissue, healing wounds and atherosclerotic plaques also stained with HHF35 in the majority of cases.^{1,2,8,11} HHF35 was also used successfully for the differentiation of noninvasive (consistently actin positive) from invasive breast tumors (actin negative).⁹ Non-muscle sarcomas and neoplastic cells of carcinomas, melanomas, and lymphomas are non-reactive.^{2,7}

FRANÇAIS
Code M0635**Utilisation prévue**

Pour utilisation diagnostique in vitro.

Cet anticorps est destiné à une utilisation en laboratoire permettant d'identifier qualitativement par microscopie optique un épitope présent sur l'actine musculaire dans les tissus normaux et néoplasiques à l'aide des méthodes d'analyse immunohistochimiques. Le Clone HHF35 s'est prouvé être un marqueur fiable des tumeurs des tissus mous avec différenciation musculaire, c'est à dire les léiomyomes, léiomyosarcomes et rhabdomyosarcomes.² L'interprétation clinique de tout marquage positif ou de toute absence doit être complétée par des études morphologiques et histologiques à l'aide de témoins appropriés. Les évaluations doivent être réalisées uniquement par un professionnel agréé dans le contexte de l'historique clinique du patient et d'autres examens.

Résumé et explication

L'actine, protéine ubiquitaire cytosquelettique hautement conservée des cellules musculaires et non-musculaires, existe en trois isotypes (α , β , γ) différenciés par leurs séquences d'acides aminés et leurs points isoélectriques. La monoclonale mouse anti-humain Muscle Actin, clone HHF35 a été fabriquée en immunisant des souris à l'aide d'une fraction polypeptidique de myocarde humain à partir d'un cas de sténose sous-aortique hypertrophique idiopathique.

Se référer aux *Instructions générales de coloration immunohistochimique* de Dako ou aux instructions du système de détection concernant les procédures IHC pour : 1) Principe de procédure, 2) Matériaux requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

ANEXO J

Protocolo C4d policlonal

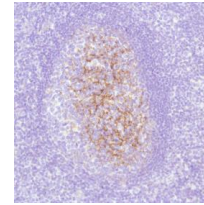
E1734RUO
Rev E
Page 1 of 1



Rabbit Anti-Human C4d Polyclonal Antibody

CATALOG #:

- E17340** 0.1 ml immunogen affinity purified rabbit polyclonal antibody in PBS/1% BSA buffer pH 7.6 with less than 0.1% sodium azide.
- E17342** 0.5 ml immunogen affinity purified rabbit polyclonal antibody in PBS/1% BSA buffer pH 7.6 with less than 0.1% sodium azide.
- E17344** 1.0 ml immunogen affinity purified rabbit polyclonal antibody in PBS/1% BSA buffer pH 7.6 with less than 0.1% sodium azide.
- E17341** 7.0 ml pre-diluted immunogen affinity purified rabbit polyclonal antibody in TBS/1% BSA buffer pH 7.6 with less than 0.1% sodium azide.



Human tonsil stained with anti-C4d antibody

INTENDED USE:

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

CLONE:

N/A

IMMUNOGEN:

Synthetic peptide derived from C-terminus of human C4d.

IG ISOTYPE:

Rabbit IgG

EPITOPE:

Not determined

MOLECULAR WEIGHT

84kDa

SPECIES REACTIVITY:

Human (tested), (See www.springbio.com for information on species reactivity predicted by sequence homology.)

DESCRIPTION:

C4 plays a central role in the activation of the classical pathway of the complement system. Prior to secretion, the single-chain precursor is enzymatically cleaved to yield the non-identical chains (alpha, beta and gamma). During activation, the alpha chain is cleaved by C1 into C4a and C4b, and C4b stays linked to the beta and gamma chains. Further degradation of C4b by C1 into the inactive fragments C4c and C4d blocks the generation of C3 convertase.

APPLICATIONS:

Immunohistochemistry (IHC)

IHC PROCEDURE:

Specimen Preparation: Formalin-fixed, paraffin-embedded tissues are suitable for use with this primary antibody.

Deparaffinization: Deparaffinize slides using xylene or xylene alternative and graded alcohols.

Antibody Dilution: If using the concentrate format of this product, dilute the antibody 1:100. The dilutions are estimates; actual results may differ because of variability in methods and protocols.

Antigen Retrieval: Boil tissue section in 10mM citrate buffer, pH 6.0 for 10 min followed by cooling at room temperature for 20 min.

Primary Antibody Incubation: Incubate for 30 minutes at room temperature.

Slide Washing: Slides must be washed in between steps. Rinse slides with PBS/0.05% Tween.

Visualization: Detect the antibody as instructed by the instructions provided with the visualization system.

POSITIVE CONTROL:

Tonsil

CELLULAR LOCALIZATION:

Secreted protein

STORAGE & STABILITY

Store at 2-8°C. Do not freeze. The user must validate any other storage conditions. When properly stored, the reagent is stable to the date indicated on the label. Do not use the reagent beyond the expiration date.

There are no definitive signs to indicate instability of this product; therefore, positive and negative controls should be tested simultaneously with unknown specimens.

If unexpected results are observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the reagent is suspected, contact Technical Support at spring.tech@ventana.roche.com.

WARNINGS & PRECAUTIONS:

1. Avoid contact of reagents with eyes and mucous membranes. If reagents come into contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.
2. This product is harmful if swallowed.
3. Consult local or state authorities with regard to recommended method of disposal.
4. Avoid microbial contamination of reagents.

4300 Hacienda Drive
Pleasanton, CA 94588
www.springbio.com

Tel: 1-925-474-8440
Toll Free: 1-800-787-6896
Fax: 1-925-474-8469

ANEXO K

Artigo original em Inglês

Original Article

Title: Garlic as an inhibitor of myointimal hyperplasia

Silva Lima, Paulo Roberto da - Master degree, Doctoral Student of Federal University of Alagoas (UFAL), Department RENORBIO; Vascular Surgery in the Angiology and Vascular Surgery Center (CEANGIO). – Author.

Vieira Bandeira, Francisco Chavier - Master degree, Professor of Federal University of Paraíba (UFPB), Department of surgery.

Rolim, Janio Cipriano - Master degree, Professor of Integrated College of Patos (FIP).

Nogueira, Manoel Ricardo Sena - Master degree, Professor of Federal University of Paraíba (UFPB), Department of surgery

Pordeus, Mizael Armando Abrantes - Vascular Surgery of Regional de Sousa Hospital

Oliveira, Andressa Feitosa Bezerra de - PhD degree, Professor of Federal University of Paraíba (UFPB).

Bezerra, Daniele Gonçalves - PhD degree, Professor of Federal University of Alagoas (UFAL)

Castro, Aldemar Araújo - Master degree, Professor of University of Health Sciences of Alagoas (UNCISAL)

Pitta, Guilherme Benjamin Brandão - PhD degree, Professor of University of Health Sciences of Alagoas (UNCISAL)

Contact information for the corresponding author:

Paulo Roberto da Silva Lima

300, Mato Grosso Ave, Apart 1101 City: João Pessoa

State: Paraíba (PB).

ZIP code: 58030-903 - Brazil – Phone: +55 (83) 91067504

e-mail: paulovascular@hotmail.com / paulovascular@gmail.com

Abstract

Intimal hyperplasia is associated with graft failure and vascular sutures in the first year after surgery and in postangioplasty restenosis. *Allium sativum* (common garlic) lowers cholesterol and has antioxidant effects; it also has antiplatelet and antitumor properties and, therefore, has great potential to reduce or inhibit intimal hyperplasia of the arteries.

Our objective is to determine if the garlic has an efficacy to inhibit myointimal hyperplasia.

Female New Zealand rabbits were divided into the following groups (n = 10 each) according to treatment: group A, Garlic, 800 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$, orally; group C, cilostazol, 50 $\text{mg}\cdot\text{day}^{-1}$, orally; group PS, 10 ml of 0.9% physiological saline solution, orally.

Our primary variable is the difference of the mean of myointimal hyperplasia.

Statistical analysis was performed by using ANOVA and Tukey tests, as well as the Chi-square test. We calculated the 95% confidence interval (CI) for each point estimate, and the P value was set as < 0.05 .

Group PS had a mean hyperplasia rate of 35.74% (95% CI, 31.76–39.71%); group C, 16.21% (95% CI, 13.36–19.05%); and group A, 21.12% (95% CI, 17.26–25.01%); $P < 0.0001$.

We conclude that garlic has an efficacy to inhibit myointimal hyperplasia.

Keywords: Hyperplasia myointimal. Rabbits. Garlic. *Allium sativum*. New Zealand

Introduction

Intimal hyperplasia is the universal response of vessels to a chronic structural change that occurs in denuded arteries, arterialized veins, and in the anastomoses of prostheses used as grafts for bypass; it is also defined as an abnormal migration and proliferation of smooth vascular muscle cells associated with the deposition of extracellular connective tissue matrix, which is then accompanied by remodeling of the new tissue (1).

Intimal hyperplasia has been recognized as a complication of arterial reconstructions since 1906 (2). The biology of intimal hyperplasia has many of the characteristic features of wounds, e.g., the inflammation process (3).

There is a great need for ways to prevent or reverse intimal hyperplasia. The myointimal hyperplasia is reported to be reversible only in the first and second weeks after vascular injury (4), and it depends on the degree and duration of the causative injury (2).

On the basis of the studies available in the literature (5-9), we found that *Allium sativum* has beneficial effects such as anti-inflammatory, antioxidant, hypocholesterolemic, antitumoral, and antiatherosclerotic actions, which prompted us to test its protective effect against myointimal hyperplasia. Our aim is to determine the mean difference of postangioplasty myointimal hyperplasia in the external iliac artery of rabbits with induced atherosclerosis and treated with *A. sativum* compared with those treated with cilostazol.

Methods

This study was approved by the research ethics committee of the State University of Health Sciences of Alagoas (UNCISAL), Maceió, AL, under number 63-A.

This is a randomized clinical trial in experimental animals for 35 days, including 30 adult female New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*; > 4 months old, >2 kg body weight). The animals were equally divided into the PS group (physiological saline solution, negative control), group C (cilostazol, positive control), and group A (*A. sativum*, study drug).

The animals were subjected to experimental atherosclerosis and submitted to induction of myointimal hyperplasia in the right external iliac artery by angioplasty (10-15).

The exclusion criteria were as follows:

- Male rabbits,
- Older than 6 months,
- Body weight <2 kg,
- Previous illness,
- Anatomical changes of the studied structures.

The selected rabbits comprised a nonprobability sample of convenience. The animals were grouped by using simple randomization with the help of a free research randomizer program (<http://www.randomizer.org/form.htm>), by using three blocks containing 10 numbers each. Each block corresponded to the drug used, and the numbers generated corresponded to the animals. Thus, each animal was assigned a letter and a number corresponding to the group and animal identification (e.g., C1—animal 1, cilostazol group; A2—animal 2, *A. sativum* group). This identification was written with indelible blue ink on the inside face of the base of the right ear of the animals.

We opted for closed animal handling, and the trial was held in the animal house of origin, under a forced exhaust ventilation system, with periods of natural luminescence, mean temperature of 20°C, minimum noise, and humidity of around 50%. The animals were kept in appropriate cages with an area of 0.64 m²; they had no contact with their natural secretions. The diet consisted of water and granulated commercial diet (Purina® for rabbits—15% crude protein, 2.5% ethereal extract, 16% fiber material, 10% ash, 2.5% calcium, 0.42% phosphorus, 13% humidity, 31.58% carbohydrates) given *ad libitum* before and during the experiment.

The rabbits were weighed weekly for the assessment of their nutritional status.

The following laws were followed in this study:

- Law 6638, May 8, 1979—Standards for Educational and Scientific Practice of Animal Vivisection;
- Universal Declaration of Animal Rights, UNESCO, October 15, 1978;
- Law of environmental crimes (Law No. 9,605/1998);
- The guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes.
- The rules of the Brazilian College of Animal Experimentation—COBEA, 1991, on the Ethical Principles in Animal Experimentation.

All groups were offered 20 mL sifted gem of chicken egg daily, administered orally in the morning with the aid of a 20 mL syringe, for a period of 100 days (14). The diet was prepared daily, and proper hygiene was maintained to prevent contamination; the diet was given raw.

After 100 days of administration of the atherogenic diet, it was stopped and myointimal hyperplasia was induced by means of the following technique: rabbits were weighed and anesthetized with 10 mg.kg⁻¹ xylazine and 40 mg.kg⁻¹ ketamine, intramuscularly, on the proximal side to the right hindpaw, according to a technique described in the literature (10, 12, 13, 15). Anesthesia was verified by the

absence of painful reflection in the direct interdigital hold in the right ear. After anesthetic induction, trichotomy was performed in the lower abdomen and right inguinal region, followed by proper cleaning of the area, under aseptic conditions and antiseptics with polyvinyl pyrrolidone iodine degerming solution with 10% active iodine.

We collected 5 mL blood from the central ear vein with a syringe, to 6-mL tubes with a suitable preservative for biochemical analysis. After collection, the samples were sent for testing in the analysis laboratory of the Hospital University Luceano Wanderley at the UFPB, where they were centrifuged and the LDL, VLDL, triglycerides, HDL, and total cholesterol levels were analyzed. Subsequently, a 2–3-cm skin incision was made in the longitudinal direction in the inguinal fold with scalpel blade (#11) to expose the femoral artery, which was repaired with a 3-0 cotton thread. A small transverse arteriotomy was performed with a scalpel blade (#11) for the introduction of a 0.014-in metal guidewire and a semicompliant catheter balloon (2.5 mm diameter and 20 mm long; balloon/artery ratio, 2.5:1), which was inserted in the lumen of the femoral right artery in the cranial direction and its position in the right external iliac artery was determined through visualization of the proximal balloon shoulder to the dissected inguinal ligament. The balloon catheter was inflated for 1 min until the Rated Burst Pressure (RBP) of the angioplasty balloon (about 12 atm), leading to distension of the arterial wall. After balloon deflation and removal of all guidewire balloons, we performed ligation with a 3-0 cotton thread above and below the arteriotomy. Finally, the skin was sutured with a 4-0 nylon thread. Analgesics (10 mg.kg⁻¹ ibuprofen orally, diluted in drinking water for 2 days) and antibiotics (20 mg.kg⁻¹ ceftriaxone, intramuscular, single dose) were administered to all groups in the postoperative period, to prevent animal suffering. Twenty-four hours after surgery, the drug administration began in each group (10–13).

Group A (*A. sativum*) received 800 µg.kg⁻¹.day⁻¹ of *A. sativum* (5, 7) orally for 5 weeks, group PS (negative control) received 0.9% physiological saline solution orally, 10 mL.day⁻¹ for 5 weeks, and group C (cilostazol) received cilostazol (batch 20100201, manufacturing date 02/2010, and expiration date 02/2013; Chinese origin, manufacturer: ZHENJIANG HAISEN, internal batch 1086) at a dose of 50 mg.day⁻¹ (16) for 5 weeks through the oral route.

The drugs were administered during a 5-week period, ending when the animals were anesthetized by using the above-described technique, and new blood samples were collected for postdose drug lipid profile analysis. The animals were euthanized with a lethal dose of an anesthetic (150 mg.kg⁻¹ pentobarbital) (16, 17). The right external iliac artery, which received balloon injury due to the surgical procedure, was collected transabdominally.

Arterial blocks were fixed in 10% formalin for at least 24 h and then prepared for routine light microscopy, as follows: gradual and increasing dehydration with 70% alcohol until absolute alcohol concentration was reached; diaphonization in xylene and liquid paraffin embedding at 60°C; and preparation of paraffin blocks. The paraffin blocks were cut with a microtome in a thickness of 3 µm, and the sections were mounted on extrafine glass slides (76 × 25 mm). Next, they were stained with hematoxylin-eosin for general morphology study (15); Verhoeff's stain for the evaluation of elastic fibers; and Masson's trichrome stain for general morphological study and characterization of elastic fibers, collagen, and muscle. Then, they were mounted with coverslips and natural resin. Also, immunohistochemistry assays were performed with the monoclonal HHF35 antibody (12, 15, 18) for determining the invasive reactions in the artery layers (smooth muscle), and C4d(19, 20) to study the immune response in the vascular endothelium; in both immunohistochemistry tests, peroxidase was used as a developer. The slides were prepared and examined under magnifications of 2.5×, 10×, and 40× by a duly accredited pathologist.

For morphometry, a Bioval[®] optical microscope was used, with the program ToupTekView[®] version ×86 3.7.2270 (copyright 2003–2013; <http://www.touptek.com>) and the Opticam[®] 14 MP digital camera. The percentage of myointimal area was calculated by using the ImageJ 64 program, where the image of the vessel was formatted as follows:

- The adventitia area of the vessel was eliminated.
- The remaining image was transformed into 8-bit.

- The rest of the image formed by the lumen of the vessel and myointimal layer was transformed into a mask, and the area in pixels was measured; this area was called the total area.
- Then, only the area of the vessel lumen was measured.
- The area of myointimal layer was calculated in pixels by subtracting the light area from the total area (area of the mean-intima layer with light).
- The percentage was then calculated by dividing the area of the myointimal layer by the total area.

For stereoscopy of the immunohistochemical results (monoclonal antibody HHF35 and C4d), we took three random field photos by using a 40× objective, and with each histological slide of each animal in each group. Then, the 36-point test(21) was used, in which the area of immunomarkers was calculated by using the formula

$$A = Vv/2Qa \mu\text{m}^2$$

where

Vv (volume density of the immunomarker) was estimated by counting the points (36-point test);

$$Vv = Pp/Pt$$

where Pp is the number of points that touch the immunomarkers, and Pt is the total number of points in the test area of 200 μm^2 , which in our case was 36 points.

Qa (number density of nuclei area) was calculated by the formula

$$Qa = N/At$$

where N is the number of nuclei counted in the test area and At is our test area, which was 200 μm^2 .

Masking for microscopy was performed by changing the letter and the initial marking number with another letter and number known only to the principal investigator. The new description was stored in an opaque and sealed envelope, which was only opened at the time of data analysis. The pathologists did not know which method was being used in the target vessel.

The sample size was arbitrated within thirty rabbits, 10 (ten) for each group studied; since in the literature there are studies that prove acceptable statistical results with fewer animals in the experiment with similar animal model (5, 12, 14, 17).

We also sample size calculation using the online calculator LEE (Epidemiology and Statistics Laboratory), the free website: http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/di_1_pro_tes.html, which resulted in n = 9 (nine) for each group. To calculate the hypothesis test for a proportion the following parameters were used:

- Proportion of the population: 0.5% as suggested by the calculator
- Proportion suggested in the survey: 30%, a value arbitrary.
- Significance level: 5%

- Test power: 95%
- Hypothesis testing: two-tailed

Data were collected in a standardized form and stored in a spreadsheet (Microsoft Excel® 2011 for Mac, USA). Data entries were made independently.

Descriptive analysis was performed by calculating the 95% CI for each estimated point. Calculations were performed with the aid of statistical program Prism 6 for Mac OS X version 6.0b (October 3, 2012). Our hypotheses were as follows:

–H₀: M_A = M_C = M_S (the frequency difference of the mean myointimal hyperplasia is the same among the studied drugs).

– H₁: M_A ≠ M_C ≠ M_S (the frequency difference of the mean myointimal hyperplasia is different between groups.)

ANOVA tests were used (one-way and two-way) (17) with confirmatory testing: Tukey (multicomparative) for quantitative data and the Chi-square test for qualitative data, both with two-tailed hypothesis. Where the two-way analysis of variance test was used for continuous temporal variables and the one-way test was used for transverse continuous variables. Furthermore, the Tukey test was used for quantitative data (continuous variables) because there was more than one group with different drugs (17), whereas the χ^2 test was used for qualitative data (nominal categorical variables).

We use a value of alpha (α) < 0.05 in the statistical test to reject the null hypothesis.

Results

For the primary variable, the following results were obtained (Figures 1 and 2):

Cilostazol x *A. sativum*: mean -4,92 95% CI (-10.50 to 0.07) P = 0.0928

PS 0,9% x *A. Sativum*: mean 14.61 95% CI (9.03 to 20.20) P < 0.0001

PS 0,9% x Cilostazol: mean 19.53 95% (13.94 to 25.12) P < 0.0001

Considering the area of intrusion or modification of myointimal cells in the muscle layer, characterized by the immunohistochemical marker HHF35 monoclonal antibody (Figure 4), we obtained the following results:

- Negative control group, PS: mean, 8.35 μm^2 ; 95% CI, 5.74–10.96 μm^2 ,
- Positive control group, cilostazol: mean, 14.47 μm^2 ; 95% CI, 8.06–20.88 μm^2 ,
- Treated group, *A. sativum*: mean, 11.52 μm^2 ; 95% CI, 7.09–15.96 μm^2 ,

with P = 0.1387 and not significant in the Tukey test.

Considering the inflammatory area by complement and characterized in this study by the immunohistochemical marker C4d (Figure 5), we obtained the following results:

- Negative control group, PS: mean, 3.50 μm^2 ; 95% CI, varying from 2.11 to 4.89 μm^2 ,
- Positive control group, cilostazol: mean, 3.98 μm^2 ; 95% CI, varying from 2.83 to 5.14 μm^2 ,

- Treated group, *A. sativum*: mean, 4.16 μm^2 ; 95% CI, varying from 1.66 to 6.67 μm^2 ,

with $P = 0.8295$ and not significant in the Tukey test.

From the morphological results, we observed that there was no standardization of myointimal hyperplasia, as in some animals, hyperplasia occurred only in the intima layer characterized by its elevation with invasion to the vessel lumen and the presence of foam cells without muscle invasion and other animals with muscle invasion (Figure 3 - Left). Some animals showed changes only in the muscle layer (middle), and the arterial intima layer was spared; these changes were characterized by calcium deposition at different levels (Figure 3 - Right).

Considering the immunohistochemical analysis with the HHF35 monoclonal antibody for the muscle cells, there was also no myointimal hyperplasia pattern, because we observed that the animals had hyperplasia with muscle invasion or muscle metaplasia in the intima vascular network (Figure 4 - Left), as well as no muscle change (Figure 4 - Right).

By observing the immunohistochemical marker C4d (Figure 5), it was determined that there was no inflammatory standardization in the intima layer, considering that some animals had intimal hyperplasia without inflammatory reaction by the complement system and others with inflammation.

Concerning the mean difference of total cholesterol (Table 1) between the *A. sativum* and the 0.9% PS groups, we obtained 32.150 mg/dL with 95% CI varying from -41.384 to 105.684 mg/dL. The mean difference between the cilostazol and 0.9% PS groups was -26.750 mg/dL, with 95% CI varying from -100.284 to 46.784 mg/dL. However, between the cilostazol and *A. sativum* groups, the mean difference was -58.900 mg/dL with 95% CI from -132.434 to 14.634 mg/dL. From two-way ANOVA, we obtained $P = 0.0165$; however, the results were not significant in the Tukey test. Thus, there was no difference between groups in total cholesterol.

The difference of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol mean between *A. sativum* and 0.9% PS was 4.325 mg/dL with 95% CI varying from -6.667 to 15.317 mg/dL. The mean difference between the cilostazol and 0.9% PS groups was 0.570 mg/dL, with 95% CI of -10.422 to 11.562 mg/dL. On the other hand, between the cilostazol and *A. sativum* groups, the mean difference was -3.755 mg/dL with 95% CI of 7.237 to -14.747 mg/dL. From two-way ANOVA, we obtained $P = 0.0199$; however, in the Tukey test, there was no significant difference between the groups.

For very low-density lipoprotein (VLDL), the mean differences between the *A. sativum* and 0.9% PS, cilostazol and 0.9% PS, and cilostazol and *A. sativum* groups were infinitely in two-way ANOVA ($P = 0.8107$); thus, there was no difference between groups concerning VLDL cholesterol. The Tukey test was not done, given that the ANOVA result was not significant.

Nevertheless, the mean difference in triglycerides between the *A. sativum* and 0.9% PS groups was 21.600 mg/dL, with 95% CI varying from -58.974 to 102.174 mg/dL. Between the cilostazol and 0.9% PS groups, the mean difference was -34.950 mg/dL, with 95% CI varying from -115.524 to 45.624 mg/dL. Between the cilostazol and *A. sativum* groups, the mean difference was -56.550 mg/dL with 95% CI of -137.124 to 24.024 mg/dL. The calculation with two-way ANOVA obtained $P = 0.2013$, and the Tukey test was not significant; thus, there was no difference between groups.

Concerning the effect on the liver of the tested substances, $P = 0.5853$ was obtained for the presence of steatosis in all groups, with a mean of five animals for the 0.9% PS group, with 95% CI of -58.53 to 68.53; a mean of five rabbits for the cilostazol group, with 95% CI varying from -45.82 to 55.82; and a mean of five rabbits for the *A. sativum* group, with 95% CI of -45.82% to 55.82.

Cholangitis of the liver occurred in a mean of five animals for the 0.9% PS group, with 95% CI of -7.70 to 17.71; a mean of five animals for the cilostazol group, with 95% CI of 5; and a mean of five rabbits for the *A. sativum* group, with 95% CI varying from -20.41 to 30.41 ($P = 0.6592$).

Portal infiltration of the liver was found in a mean five animals for the 0.9% PS group, with 95% CI of 3.59 to 6.41; a mean of five animals for the cilostazol group, with 95% CI of 0.76 to 9.24; and a mean

of five rabbits for the *A. sativum* group, with 95% CI varying from 2.18 to 7.82 ($P = 0.6211$).

Discussion

We partially accepted hypothesis H1 because the results obtained in the experimental group (*A. sativum*) were similar to those obtained in the positive control (cilostazol), but differed from those obtained in the negative control (0.9% physiological saline solution). However, the tested drug had no effect on the inhibition of myointimal hyperplasia, since the result obtained was the same as the positive control.

A. sativum was chosen as the target drug in the study to inhibit myointimal hyperplasia because, according to Efendy et al (5), Campbell et al (7) and Yamaji et al (9), it has an anti-atherosclerotic effect. Moreover, according to Lau et al (8) and Kwon et al, *A. sativum* has a hypocholesterolemic effect; furthermore, Borek (6) reported that it has antitumor, anti-inflammatory, and antioxidant effects. Hence, there was a great possibility that *A. sativum* would act favorably in the inhibition of myointimal hyperplasia. The dose of $800 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ was chosen as the test dose in the present study, as Efendy et al (5) reported that $800 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ of crude extract of garlic can inhibit the development of fat layers and the accumulation of cholesterol in the vessel walls, thus protecting them against the development of atherosclerosis. The use of *A. sativum* in its original form as based on the study by Borek (6), who found that allicin—a component of *A. sativum*—is unstable in solution, as it is a *lipid-soluble, volatile organosulfur* compound. Thus, it is essential that the maximum possible amount of the active substances of *A. sativum* is retained.

Rabbits were chosen for the study because, according to research performed by Ferrer et al (22), the rabbit is a valid atherogenic vascular injury model. Takagi et al (13) proved that the hyperplasia occurring in rabbits is similar to that occurring in human coronary arteries, besides Ylä-Herttua et al (23) demonstrated that both rabbits and humans have a common pattern of inflammatory reactions in the complement system.

In particular, female rabbits were chosen because according to the literature, there is no difference in the use of female and male rabbits for this type of study (17, 22, 24).

Egg yolk was chosen to induce atherosclerosis in female rabbits because Srilatha et al and Santos (14) have demonstrated that this is a cheap and effective method.

The balloon diameter used was safe and effective, according to Ferrer (22), Gellman (10), and other researchers (11).

The immunohistochemical study of specimens was conducted with monoclonal HHF35 (12, 15, 18) and polyclonal C4d (19, 20) in an attempt to establish the mechanism of action of the drugs, given that the former is a marker for muscle cells and the C4d is a marker for the inflammatory process mediated by the complement system. Ylä-Herttua et al (23) demonstrated the action of the complement system in atherosclerotic lesions and Tsai et al (16) identified the inhibitory activity of p38 by using cilostazol. Since the inhibition of p38 has been associated with possible therapeutic effects on autoimmune diseases and inflammatory processes (25), we chose to assess the effect of *A. sativum* on inflammation through the complement system; then we used the marker C4d. However, in all animals, no statistical difference was observed with regard to muscle invasion in the intima as well as the inflammatory process mediated by the complement system in the myointimal wall. Therefore, the study was not able to characterize the manner in which the inhibition or decrease of myointimal hyperplasia occurred, given that there was no statistically significant inhibition of muscle invasion or reduction of the inflammatory process, with the use of *A. sativum* or cilostazol.

In the morphometric analysis, there was no pattern of hyperplasia among the groups because some animals had hyperplasia of the muscle layer with breakdown of muscle cells and calcium deposition; others only had a change of intima such as stratification of the intimal layer and muscle invasion; and others showed change in two layers, suggesting that there are various mechanisms underlying the development of myointimal hyperplasia, even though there were only two induction mechanisms —

the hypercholesterolemic diet and endothelial injury (balloon). However, these findings are in contrast with those from the literature, which states that the distribution of hyperplasia may be intimal, diffuse, focal, or within the body vessel. Furthermore, Van Craeyveld et al (24) found that the main changes of atherosclerosis and hyperplasia actually occurs in the deep layers of the vessel (muscle) and not in the intima. The staining method of Verhoeff, which is used for elastic fibers, was carried out to try to define the intima and the muscle of vessel to calculate only the intimal hyperplasia; however, it was not effective in this delimitation. Therefore, we studied the myointimal layer.

A. sativum and cilostazol were able to inhibit myointimal hyperplasia in 40.9% and 54.64% of animals, respectively, as compared to the negative control (0.9% physiological saline solution), demonstrating the effectiveness of both substances. Although the proportion of animals exhibiting myointimal hyperplasia inhibition was 13.74% higher with cilostazol than with *A. sativum*, the fact that cilostazol is a drug that is already the active ingredient should be considered. Thus, even though a plant in its original form was used, without isolation of the active principle, a statistically similar result was obtained.

A. sativum and cilostazol were not able to reduce the lipid levels, thus our results are consistent with the current findings (5, 7, 26) did not observe a difference in the lipid levels following in the dose of $800 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ in rabbits. Others studies (27, 28) indicated that the hypolipidemic action of garlic was observed only after 2 to 6 months of continuous administration of *A. sativum*, thus suggesting that the time used to conduct this study (35 days) was not sufficient to observe such a hypolipidemic effect, which was also reported by Ried et al (29).

With regard to the safety of *A. sativum*, the use of this drug in animals for the inhibition of myointimal hyperplasia was successful, without any difference in the presence of steatosis, cholangitis, and portal infiltration between groups. *A. sativum* has a LD50 of $3034 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and maximum dosage without side effects of $2200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (30); moreover, it is not contraindicated in pregnant animals (26).

The research carried out in this study paves the way for a new drug against myointimal hyperplasia, which is the main cause of failure of both coronary as well as peripheral angioplasties that lead to reinfarctions and failure of vascular grafts, and consequently to the need for amputations in many people, particularly diabetic patients.

This research forms the basis for further research, and allows for:

- Another study to be performed using higher doses of *A. sativum*, as this study used only the plant and not even an extract, and still matched the protective effect of an expensive drug, which can be useful in the third world population.
- Further research to be conducted with crude extract, followed by fractionation of this extract to obtain its active ingredient.

In conclusion: *Allium sativum* had the same efficacy in inhibiting myointimal hyperplasia when compared to the positive control, Cilostazol.

Acknowledgments

The authors did not receive financial support for this research. But we would like to thank the LTF/UFPB for providing us a space in their laboratory.

Conflict of Interest: non disclosures.

Funding: This work was supported entirely by the researchers

References

1. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;83(2):456s-60s.
2. Pereira AH, Pereira AA, Costa LFMd. Hiperplasia intimal. In: Brito CJd, editor. *Cirurgia Vascul. 1. 2a ed.* Rio de Janeiro: Revinter; 2008. p. 165-75.
3. Sterpetti AV, Cucina A, Lepidi S, Randone B, Stipa F, Aromatario C, et al. Progression and regression of myointimal hyperplasia in experimental vein grafts depends on platelet-derived growth factor and basic fibroblastic growth factor production. *Journal of vascular surgery*. 1996;23(4):568-75.
4. Li J, Brooks G. Cell cycle regulatory molecules (cyclins, cyclin-dependent kinases and cyclin dependent kinase inhibitors) and the cardiovascular system. - Potential targets for therapy? *European Heart Journal*. 1999;20:406-20.
5. Efendy JL, Simmons DL, Campbell GR, Campbell JH. The effect of the aged garlic extract, 'Kyolic', on the development of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1997;132(1):37-42.
6. Borek C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *The Journal of Nutrition*. 2001;131(3s):1010S-5S.
7. Campbell JH, Efendy JL, Smith NJ, Campbell GR. Molecular basis by which garlic suppresses atherosclerosis. *The Journal of Nutrition*. 2001;131(3s):1006S-9S.
8. Lau BH. Suppression of LDL oxidation by garlic. *The Journal of Nutrition*. 2001;131(3s):985S-8S.
9. Yamaji K, Sarker KP, Abeyama K, Maruyama I. Anti-atherogenic effects of an egg yolk-enriched garlic supplement. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2004;55(1):61-6.
10. Gellman J, Ezekowitz MD, Sarembock IJ, Azrin MA, Nochomowitz LE, Lerner E, et al. Effect of lovastatin on intimal hyperplasia after balloon angioplasty: a study in an atherosclerotic hypercholesterolemic rabbit. *Journal of the American College of Cardiology*. 1991;17(1):251-9.
11. Knopfholz J, Précoma DB, Brofman PRS, Bier GE, Silva RFKcd, Silva APK, et al. Efeito da L-arginina na Neoproliferação Intimal e no Remodelamento Arterial após Lesão por Balão, em Ilíacas de Coelhos hipercolesterolêmicos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2006;87:520-4.
12. Stadius ML, Gown AM, Kernoff R, Collins CL. Cell proliferation after balloon injury of iliac arteries in the cholesterol-fed New Zealand White rabbit. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 1994;14(5):727-33.
13. Takagi M, Ueda M, Becker AE, Takeuchi K, Takeda T. The Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit is a suitable experimental model to study differences in tissue response between intimal and medial injury after balloon angioplasty. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1997;17(12):3611-9.
14. Santos JABd. Estudo da aterosclerose induzida por diferentes tipos de dieta hiperlipídica em coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*). Macéio: Universidade Federal de Alagoas; 2008.
15. Asada Y, Kisanuki A, Tsuneyoshi A, Marutsuka K, Hatakeyama K, Sumiyoshi A. Effects of inflation pressure of balloon catheter on vascular injuries and subsequent development of intimal hyperplasia in rabbit aorta. *Atherosclerosis*. 1996;121(1):45-53.
16. Tsai CS, Lin FY, Chen YH, Yang TL, Wang HJ, Huang GS, et al. Cilostazol attenuates MCP-1 and MMP-9 expression in vivo in LPS-administrated balloon-

injured rabbit aorta and in vitro in LPS-treated monocytic THP-1 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2008;103(1):54-66.

17. Guzeloglu M, Reel B, Atmaca S, Bagriyanik a, Hazan E. The effects of PPAR γ agonist rosiglitazone on neointimal hyperplasia in rabbit carotid anastomosis model. *Journal of Cardiothoracic Surgery*. 2012;7:1-8.

18. Tsukada T, Tippens D, Gordon D, Ross R, Gown AM. HHF35, a muscle-actin-specific monoclonal antibody. I. Immunocytochemical and biochemical characterization. *The American journal of pathology*. 1987;126(1):51-60.

19. de Serre NP, Canioni D, Lacaille F, Talbotec C, Dion D, Brousse N, et al. Evaluation of c4d deposition and circulating antibody in small bowel transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008;8(6):1290-6.

20. Cohen D, Colvin RB, Daha MR, Drachenberg CB, Haas M, Nickleit V, et al. Pros and cons for C4d as a biomarker. *Kidney international*. 2012;81(7):628-39.

21. Mandarin-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2003;75(4):469-86.

22. Ferrer MD, Esteban E, Liste F, Carrillo JM, Ramos JJ, Balastegui MT, et al. [The rabbit as an experimental model: technique for the induction of vascular lesions and incidents]. *Radiologia*. 2010;52(1):45-50.

23. Ylä-Herttua S, Palinski W, Butler SW, Picard S, Steinberg D, Witztum JL. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 1994;14(1):32-40.

24. Van Craeyveld E, Gordts SC, Singh N, Jacobs F, De Geest B. A critical reassessment of murine and rabbit models of atherosclerosis: focus on lesion progression and remodelling. *Acta cardiologica*. 2012;67(1):11-21.

25. Goldstein DM, Gabriel T. Pathway to the clinic: inhibition of P38 MAP kinase. A review of ten chemotypes selected for development. *Current topics in medicinal chemistry*. 2005;5(10):1017-29.

26. El-Sayyad HI, Abou-El-Naga AM, Gadallah AA, Bakr IH. Protective effects of *Allium sativum* against defects of hypercholesterolemia on pregnant rats and their offspring. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2010;3(2):152-63.

27. Bordia A, Verma SK, Khabia BL, Vyas A, Rathore AS, Bhu N, et al. The effective of active principle of garlic and onion on blood lipids and experimental atherosclerosis in rabbits and their comparison with clofibrate. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 1977;25(8):509-16.

28. Steiner M, Khan AH, Holbert D, Lin RI. A double-blind crossover study in moderately hypercholesterolemic men that compared the effect of aged garlic extract and placebo administration on blood lipids. *Am J Clin Nutr*. 1996;64(6):866-70.

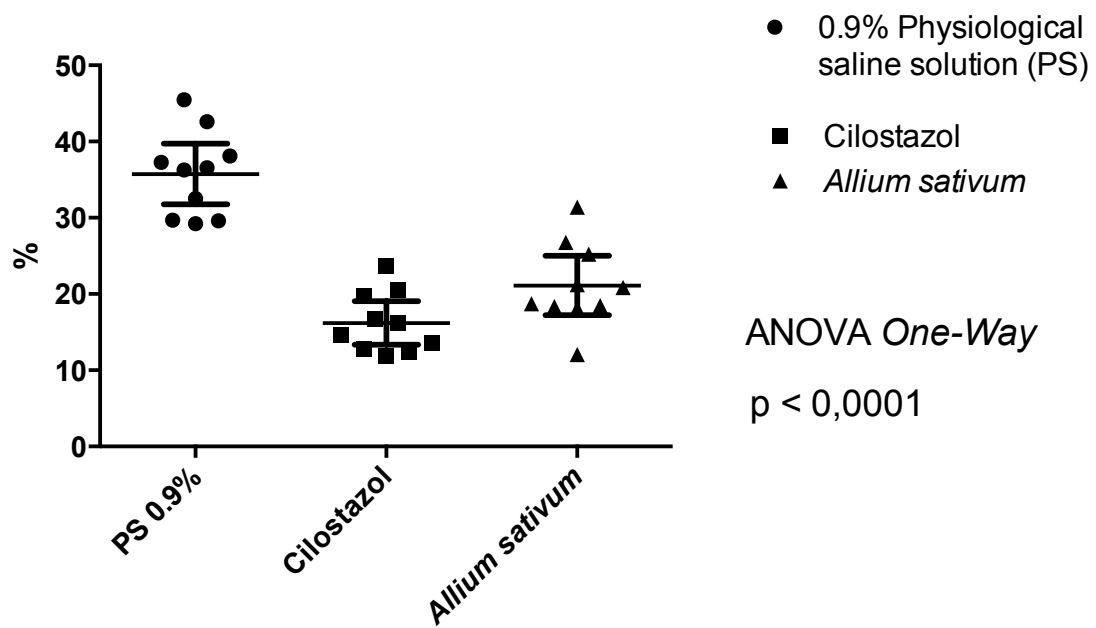
29. Ried K, Toben C, Fakler P. Effect of garlic on serum lipids: an updated meta-analysis. *Nutrition reviews*. 2013;71(5):282-99.

30. Mikail HG. Phytochemical screening, elemental analysis and acute toxicity of aqueous extract of *Allium sativum L.* bulbs in experimental rabbits. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010;4(4):322-6.

Figure and table legends

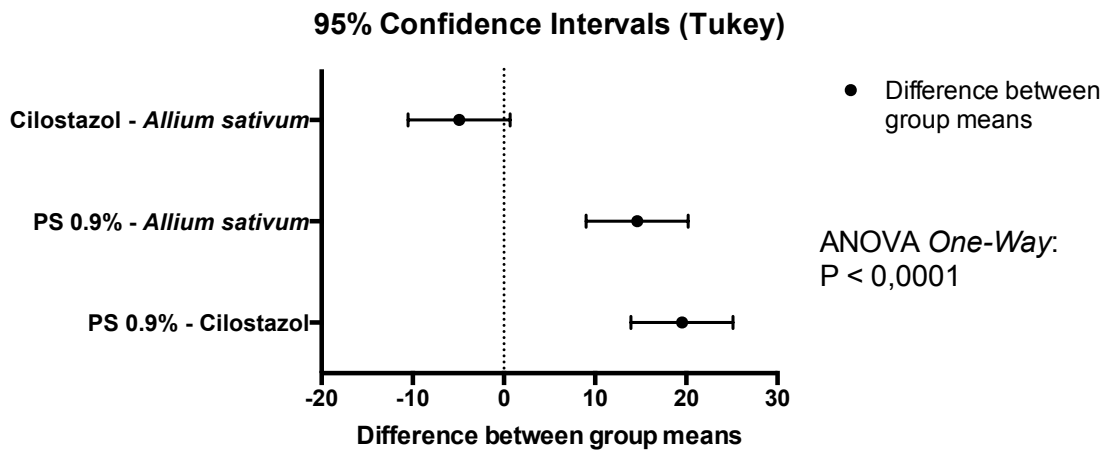
Table 1: Absolute values of total cholesterol (mg/dL)

	<u>Cilostazol</u>		<u>Allium sativum</u>		<u>0.9% PS</u>	
	<u>Initial</u>	<u>Final</u>	<u>Initial</u>	<u>Final</u>	<u>Initial</u>	<u>Final</u>
	46	30	48	36	48	50
	32	34	36	49	35	59
	31	29	23	36	194	97
	44	34	80	43	37	39
	37	33	39	39	35	38
	39	50	30	29	45	41
	37	46	44	28	28	28
	42	26	20	82	25	34
	24	29	897	228	40	31
	40	28	62	40	302	40
<u>Mean</u>	<u>35.55 (95%CI 31.72 a 39.38)</u>		<u>94.45 (95%CI -23.41 a 212.3)</u>		<u>62.30 (95% CI 25.55 a 99.05)</u>	



PS 0,9% : mean 35.74% 95% CI 31.76% to 39.71%
Cilostazol : mean 16.21% 95% CI 13.36% to 19.05%
A. sativum: mean 21.12% 95% CI 17.23% to 25.01%

Figure 1 – Mean rate of myointimal hyperplasia



Cilostazol - *Allium sativum*: mean -4.92 95% CI (-10,50 to 0.07) P = 0.0928
 PS 0,9% - *A. sativum* : mean 14.61 95% CI (9.03 to 20.20) P < 0.0001
 PS 0,9% - Cilostazol : mean 19.53 95% CI (13.94 to 25.12) P < 0.0001

Figure 2 – The difference between the means of groups (myointimal hyperplasia)

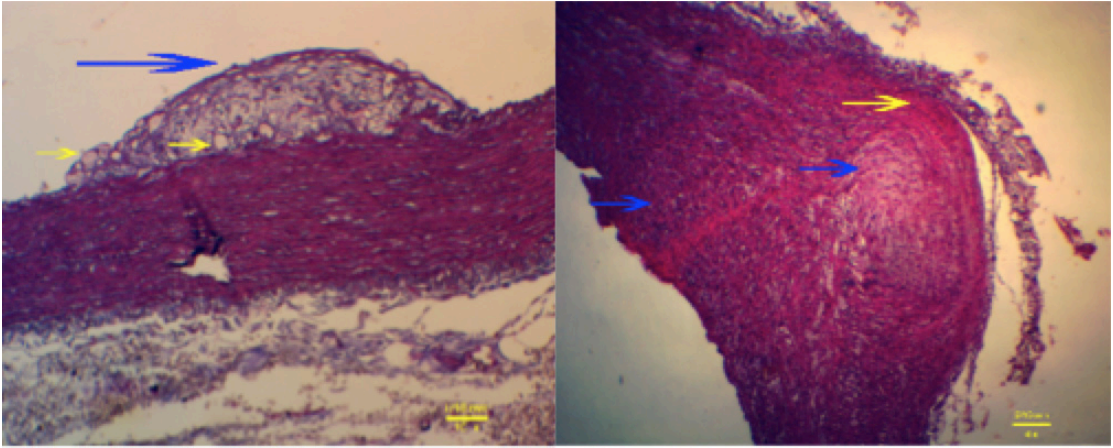


Figure 3. LEFT - Isolated intimal hyperplasia. The blue arrow indicates hyperplasia. Yellow arrows indicate the foam cells. Masson, 10 \times ; scale, 1/10 mm. RIGHT - Calcifications in the middle layer (externally). The blue arrows indicate the calcifications. Yellow arrow indicates the normal muscle. Masson, 4 \times ; scale, 2/10 mm

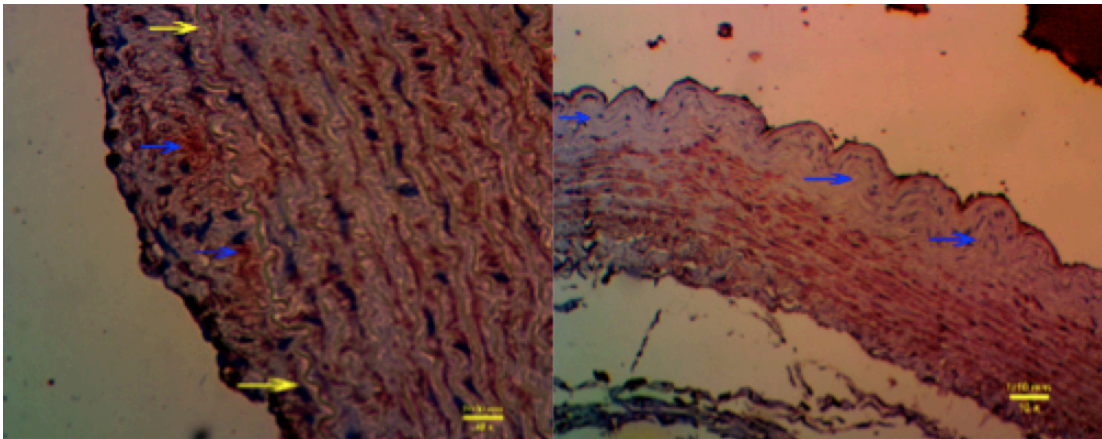


Figure 4. LEFT - Hyperplasia with muscle invasion in the intima. Yellow arrows show the internal elastic limiting membrane, and blue arrows show positivity to HHF 35 polyclonal antibody in the intimal hyperplasia. HHF 35 monoclonal, 40 \times ; scale, 2/100 mm. RIGHT- Hyperplasia without muscle invasion in the intima. Blue arrows indicate hyperplasia without muscle invasion. HHF 35 monoclonal, 10 \times ; scale, 1/10 mm.

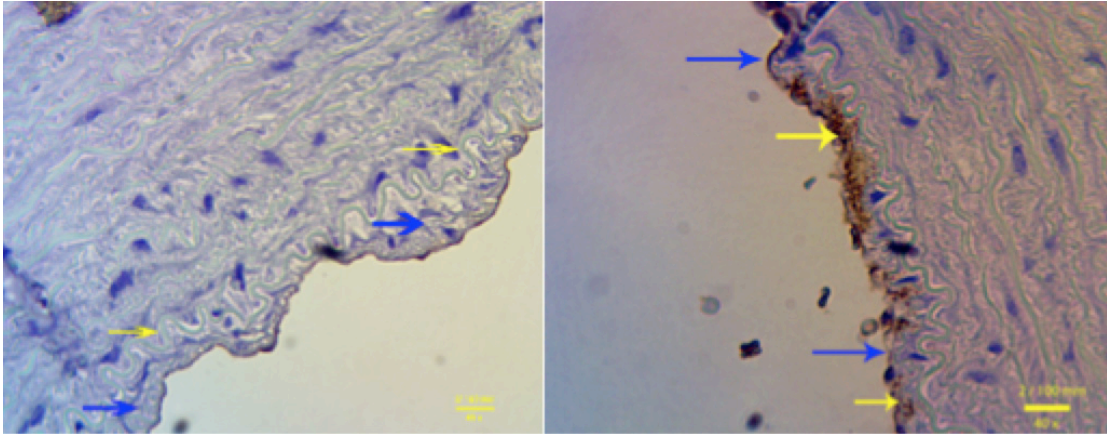


Figure 5. LEFT - Hyperplasia without active inflammation in the intima. Yellow arrows point to the internal elastic limiting membrane, and the blue arrows indicate a hyperplasia. C4d, 40 \times ; scale, 2/100 mm. RIGHT - Hyperplasia with active inflammation in the intima. Yellow arrows indicate C4d positivity (brown grain), and blue arrows indicate the hyperplasia. C4d, 40 \times ; scale, 2/100 mm.