

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**MORFOLOGIA, MORFOMETRIA DO ARCO AÓRTICO E
PERFIL LIPÍDICO SÉRICO DE RATOS TRATADOS COM
SURFACTANTE**

Karina Ferreira de Castro

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

MORFOLOGIA, MORFOMETRIA DO ARCO AÓRTICO E
PERFIL LIPÍDICO SÉRICO DE RATOS TRATADOS COM
SURFACTANTE

Karina Ferreira de Castro

Orientadora: Profa. Dra. Maria Rita Pacheco

Co-orientadora: Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2010

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

KARINA FERREIRA DE CASTRO – Nascida em 13 de fevereiro de 1979, na cidade de Santos – SP; ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária do Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal (UNIPINHAL) – Espírito Santo do Pinhal/SP, em março de 1998, concluindo-o em dezembro de 2002. Realizou especialização (Residência Médica) em Clínica Médica de Pequenos Animais no Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB) – São João da Boa Vista/SP no período de 2003 a 2005. Concluiu o curso de Pós Graduação *Lato Sensu* em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais no Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB) – São João da Boa Vista/SP em 2006. Desde março de 2005 atua como docente e médica veterinária no Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP) – São José do Rio Preto/SP, lecionando nas áreas de Semiologia, Clínica Médica e Terapêutica de Pequenos Animais e Patologia Clínica. Foi coordenadora do curso de Pós Graduação *Lato Sensu* em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais da mesma instituição no período de 2007 a 2009. Ingressou no curso de Mestrado na área de Clínica Médica Veterinária em março de 2008, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da FCAV
– UNESP (protocolo nº 029042/09).**

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht

Aos meus pais preciosos, Ângela e José, e à minha iluminada vovó Helena, pelo carinho, apoio, incentivo e amor incondicional durante todos os momentos da minha vida, sem vocês nunca conseguiria chegar até aqui...

Aos meus irmãos tão queridos Raquel e Antônio Carlos, por todo o amor e companheirismo em todos esses anos de vida e que tornam minha vida mais do que especial...

Aos animais deste estudo e a todos aqueles que contribuem para o desenvolvimento científico...

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar e abençoar minha vida e por proporcionar uma família presente e amorosa, que me acompanha sempre, em todas as alegrias e tristezas durante a minha vida.

À minha família que tanto amo: José, Ângela, Helena, Antônio Carlos e Raquel e que sempre me auxiliam com tanta paciência e amor.

Ao meu namorado Neto por toda dedicação, carinho e amor na finalização deste trabalho.

À Profa. Dra. Rita Pacheco, pela oportunidade, orientação, paciência e amizade durante a realização do meu trabalho.

À Profa. Dra. Silvana Martinez B. Artoni pelo carisma, sabedoria e paciência durante a realização do meu estudo.

Às Profas. Dras. Mirella Tinucci Costa, Isabel Cristina Boleli, Paola Moraes Castro, Lúcia Helena Vasques pelo auxílio na correção desta dissertação, contribuindo imensamente para a finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Carlos Barbosa pelo auxílio e paciência durante a análise estatística.

Aos funcionários da UNESP que me auxiliaram com muita paciência e carinho, deixo meu abraço especialmente para o Sr. Orandir (Morfologia), Sr. Eugênio (Laboratório de Análises Clínicas), Sra. Marilda (Anatomia) e Sra. Renata (Laboratório de Clínica de Suínos).

À minha querida amiga Carla, por todos esses anos de amizade, carinho e apoio. Por, praticamente, ser parte da “minha família” desde a minha chegada a Rio Preto; por todas as conversas, desabafos e incentivos durante todo o processo de confecção

deste trabalho e, principalmente, por ser essa irmã no dia-a-dia. Você é e sempre será muito especial para mim.

Aos meus queridos amigos Ana Silvia, Lucas, Alfredo, Tatiana, Storti, Talita, Alexandre e Lilian pelo companheirismo diário durante todos esses anos de trabalho.

À minha querida amiga Manuela, por todo auxílio, apoio e amizade durante essa jornada de estudo; por todos os conselhos, risadas e baladas desde que nos conhecemos; você foi muito importante pra mim, “bunita”.

Às amigas de Jaboticabal Renata, Aline, Vanessa e Andréa por todo o carinho durante esse período.

À minha amiga Angélica por todo companheirismo e amizade no final dessa jornada. Muito obrigada por suportar meus momentos de estresse...

Às amigas queridas Cláudia Dorigan e Alessandra Carvalho pelo apoio e amizade, mesmo à distância...

Aos Professores Dr. Halim Atique Neto, Dr. Alan Peres Ferraz de Melo e MSc. Tábata Salum Calille Atique, por tornarem possível a realização do mestrado, aceitando minhas ausências durante esse período e por acreditarem no meu trabalho durante esses cinco anos.

Aos amigos Crasso Paulo e Estevan Guilherme por todo auxílio durante o experimento e pelo esclarecimento das inúmeras dúvidas em estatística.

Aos meus alunos Ciro Alexandre Cruvinel e Filipe Curti por toda ajuda durante o período de experimento.

Ao querido professor e amigo Ricardo Duarte que, mesmo distante, esteve sempre presente me auxiliando com sugestões e palavras de carinho desde a época da faculdade.

Aos meus alunos, residentes e estagiários que, dia após dia, me incentivam, ensinam e impulsionam a continuar na carreira acadêmica.

Às minhas companheiras de trabalho e amigas, Edna e Cleide, por todo o auxílio durante a realização do experimento e carinho diário.

À Profa. Dra. Paola Moraes Castro por toda força e conversas e pela amizade recente e especial.

À Profa. Dra. Patrícia Del Ré por todo carinho e ajuda durante a realização do experimento

À Coordenadora do Programa de Pós Graduação Profa. Dra. Rosângela Zacarias pela aquisição do kit bioquímico para complementação de minha dissertação.

Aos representantes da Labtest, Luciana e Abílio, por todo carinho e gentileza na aquisição dos kits e pelo auxílio desprendido durante as análises bioquímicas.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Indução das dislipidemias experimentais.....	4
2.2 Surfactante.....	5
2.2.1 Tyloxapol.....	6
2.3 Aterosclerose.....	8
2.4 Metabolismo das lipoproteínas.....	13
2.5 Aspectos histológicos normais das artérias.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Animais, alimentação e instalações.....	16
3.2 Procedimento experimental.....	16
3.3 Procedimentos morfológico e morfométrico.....	17
3.4 Avaliação do perfil lipídico sérico.....	17
3.5 Análise estatística.....	18
4 RESULTADOS.....	20
4.1 Morfológicos.....	20
4.1.1 Morfologia macroscópica do arco aórtico.....	20
4.1.2 Morfologia microscópica do arco aórtico.....	20
4.2 Morfométricos.....	24
4.3 Perfil lipídico sérico.....	27

5 DISCUSSÃO.....	31
6 CONCLUSÕES.....	37
7 REFERÊNCIAS.....	38
APÊNDICE.....	44

LISTA DE ABREVIATÖES

ANOVA: Análise de variância

AgroEstat: Sistema para Análises Estatísticas de Ensaaios Agronômicos

Apo: Apolipoproteínas ou Apoproteínas

CETP: Proteína de transferência de ésteres de colesterol

E: Endotélio

EE: Membrana limitante elástica externa

EI: Membrana limitante elástica interna

EPM: Erro padrão da média

FC: Fibras colágenas

FE: Fibras elásticas

HDL: Lipoproteínas de alta densidade

HMG-CoA: Enzima hidroximetilglutaril - CoA redutase

IDL: Lipoproteínas de densidade intermediária

LCAT: Enzima lecitina-colesterol-acil-transferase

LDL: Lipoproteínas de baixa densidade

LLP: Enzima lipase lipoprotéica

ML: Fibras musculares lisas

Qm: Quilomícrons

R-Qm: Remanescentes de quilomícrons

R-VLDL: Remanescentes de VLDL

SE: Subendotélio

TG: Triglicérides

VLDL: Lipoproteínas de densidade muito baixa

VV: *Vasa vasorum*

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Segmento do arco aórtico representado esquematicamente (seta azul) e em detalhes (seta preta) na fotografia, colhido para realização das análises histológicas, 3x (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).....	20
2. Fotomicrografia do segmento do arco aórtico de ratos Wistar, dos grupos I, II, III, IV representados pelas letras A, B, C e D, respectivamente. Observa-se a Túnica Íntima (▶), Média (—▶) e Adventícia (.....▶). Coloração: Tricrômico de Masson, 10x (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).....	21
3. Fotomicrografia do segmento do arco aórtico de ratos Wistar do grupo I evidenciando na túnica íntima o endotélio (E), o subendotélio (SE) e a membrana limitante elástica interna (EI); na túnica média as fibras musculares lisas (ML) entremeadas às fibras elásticas (FE) e a membrana limitante elástica externa (EE) e na túnica adventícia as fibras colágenas (FC), as fibras elásticas (FE) e a <i>vasa vasorum</i> (VV). Tricrômico de Masson, 40x (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).....	22
4. Fotomicrografia do segmento do arco aórtico de ratos Wistar do grupo II evidenciando na túnica íntima o endotélio (E), o subendotélio (SE) e a membrana limitante elástica interna (EI); na túnica média as fibras musculares lisas (ML) entremeadas às fibras elásticas (FE) e a membrana limitante elástica externa (EE) e na túnica adventícia as fibras colágenas (FC), as fibras elásticas (FE) e a <i>vasa vasorum</i> (VV). Tricrômico de Masson, 40x (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).....	22
5. Fotomicrografia do segmento do arco aórtico de ratos Wistar do grupo III evidenciando na túnica íntima o endotélio (E), o subendotélio (SE) e a membrana limitante elástica interna (EI); na túnica média as fibras musculares lisas (ML) entremeadas às fibras elásticas (FE) e a membrana limitante elástica externa (EE) e na túnica adventícia as fibras colágenas (FC), as fibras elásticas (FE) e a <i>vasa vasorum</i> (VV). Tricrômico de Masson, 40x (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).....	23
6. Fotomicrografia do segmento do arco aórtico de ratos Wistar do grupo IV evidenciando na túnica íntima o endotélio (E), o subendotélio (SE) e a membrana limitante elástica interna (EI); na túnica média as fibras musculares lisas (ML) entremeadas às fibras elásticas (FE) e a membrana limitante elástica externa (EE) e na túnica adventícia as fibras colágenas (FC), as fibras elásticas (FE) e a <i>vasa vasorum</i> (VV). Tricrômico de Masson, 40x (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).....	23

7. Valores médios \pm EPM da espessura, em μm , da Túnica Íntima do segmento do arco aórtico de ratos Wistar, dos grupos controle (Grupo I), tratados com tyloxapol por duas semanas (Grupo II), tratados com tyloxapol por três semanas (Grupo III) e tratados com tyloxapol por quatro semanas (Grupo IV). Letras diferentes denotam significância ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).....24
8. Valores médios \pm EPM da espessura, em μm , da Túnica Média do segmento do arco aórtico de ratos Wistar, dos grupos controle (Grupo I), tratados com tyloxapol por duas semanas (Grupo II), tratados com tyloxapol por três semanas (Grupo III) e tratados com tyloxapol por quatro semanas (Grupo IV). Letras diferentes denotam significância ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).....25
9. Valores médios \pm EPM da espessura, em μm , da Túnica Adventícia do segmento do arco aórtico de ratos Wistar, dos grupos controle (Grupo I), tratados com tyloxapol por duas semanas (Grupo II), tratados com tyloxapol por três semanas (Grupo III) e tratados com tyloxapol por quatro semanas (Grupo IV). Letras diferentes denotam significância ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).....26
10. Valores médios \pm EPM dos níveis séricos de Colesterol Total, em mg/dL, de ratos Wistar, dos grupos controle (Grupo I), tratados com tyloxapol por duas semanas (Grupo II), tratados com tyloxapol por três semanas (Grupo III) e tratados com tyloxapol por quatro semanas (Grupo IV). Letras diferentes denotam significância ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010)27
11. Valores médios \pm EPM dos níveis séricos de Triglicérides, em mg/dL, de ratos Wistar, dos grupos controle (Grupo I), tratados com tyloxapol por duas semanas (Grupo II), tratados com tyloxapol por três semanas (Grupo III) e tratados com tyloxapol por quatro semanas (Grupo IV). Letras diferentes denotam significância ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).....28
12. Valores médios \pm EPM dos níveis séricos de HDL, em mg/dL, de ratos Wistar, dos grupos controle (Grupo I), tratados com tyloxapol por duas semanas (Grupo II), tratados com tyloxapol por três semanas (Grupo III) e tratados com tyloxapol por quatro semanas (Grupo IV). Letras diferentes denotam significância ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).....29

13. Valores médios \pm EPM dos níveis séricos de LDL, em mg/dL, de ratos Wistar, dos grupos controle (Grupo I), tratados com tyloxapol por duas semanas (Grupo II), tratados com tyloxapol por três semanas (Grupo III) e tratados com tyloxapol por quatro semanas (Grupo IV). Letras diferentes denotam significância ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).....30

MORFOLOGIA, MORFOMETRIA DO ARCO AÓRTICO E PERFIL LIPÍDICO SÉRICO DE RATOS TRATADOS COM SURFACTANTE

RESUMO - A aterosclerose é uma doença multifatorial, lenta e progressiva e a hiperlipidemia um dos fatores potenciais no desenvolvimento de doenças cardíacas ateroscleróticas. As vantagens da indução das dislipidemias experimentais são a produção de lesões ateromatosas em curto espaço de tempo; adequado controle dietético e fatores ambientais; a possibilidade de estudos sobre a reversibilidade de lesões ateroscleróticas e ensaios pré clínicos de substâncias hipolipidêmicas. Este estudo visou avaliar a capacidade do surfactante na indução aterogênica na região do arco aórtico de ratos por meio de estudos morfológico e morfométrico das túnicas íntima, média e adventícia da aorta, bem como analisar o perfil lipídico sérico. Foram utilizados 28 ratos Wistar, machos, albinos, adultos e hípidos. Estes foram distribuídos em quatro grupos experimentais formados por sete animais cada, a saber: Grupo I – (controle); Grupo II – tratado com tyloxapol, na dose de 500 mg/Kg de peso corporal, via intraperitoneal a cada 48 horas, durante duas semanas; Grupo III – tratado com tyloxapol na dose de 500 mg/Kg de peso corporal, via intraperitoneal a cada 48 horas, durante três semanas; Grupo IV – tratado com tyloxapol na dose de 500 mg/Kg de peso corporal, via intraperitoneal a cada 48 horas, durante quatro semanas. A análise morfológica do arco aórtico dos animais dos grupos II, III e IV evidenciou características histológicas semelhantes às do grupo I nas túnicas íntima, média e adventícia. No estudo morfométrico, os valores da espessura, em μm , da túnica íntima indicaram que o grupo III diferiu significativamente dos grupos I, II e IV. Os valores da espessura, em μm , encontrados para a túnica média e adventícia revelaram que não houve diferença significativa entre os grupos I, II, III e IV. Na avaliação do perfil lipídico os valores de colesterol total, triglicérides, HDL e LDL demonstraram que o grupo III diferiu significativamente do grupo I. Conclui-se que o surfactante tyloxapol foi efetivo na indução da hiperlipidemia, porém não causou lesões ateroscleróticas no arco aórtico.

Palavras-chave: arco aórtico, ateroma, morfometria, morfologia, rato, surfactante

MORPHOLOGY, MORPHOMETRY OF AORTIC ARCH AND SERUM LIPID LEVELS OF RATS TREATED WITH SURFACTANT

SUMMARY – Atherosclerosis is a multifactorial, progressive and slow disease, and hyperlipidaemia is one of the potential factors in the development of atherosclerotic cardiac diseases. The experimental dyslipidaemia carrying out advantages are the production of atheromatous lesions in a short period of time, an adequate dietetic control and environmental factors, the possibility of studies concerning reversibility of atherosclerotic lesions, and pre-clinic experiments with hypolipidaemic substances. This study aims at evaluating tyloxapol ability in atherogenic inducing, in the rats' aortic arch region, through morphologic morphometric studies, in intima, media and adventitia tunics of the aortic arch, as well as analyzing serum lipid levels. Twenty-eight healthy Wistar adults' albino male rats, weighing an average of 200 g were utilized. They were distributed into four experimental groups with seven animals each, as follows: Group I – (control); Group II – treated with tyloxapol at a dose of 500mg/Kg of body weight, through intraperitoneal via each 48 hours, for two weeks; Group III - treated with tyloxapol at a dose of 500mg/Kg of body weight, through intraperitoneal via each 48 hours, for three weeks; Group IV - treated with tyloxapol at a dose of 500mg/Kg of body weight, through intraperitoneal via each 48 hours, for four weeks. Morphological analysis of the aortic arch of the animals from groups II, III and IV, showed similar histological characteristics to group I at intima, media and adventitia tunics. The intima tunica values at the morphometric study indicated that group III has significant differed from groups I, II and IV. The media and adventitia tunics values revealed that there were no significant differences between groups I, II, III, and IV. As lipid profile evaluation is concerned, the values of total cholesterol, triglycerides and HDL have indicated that group III has significantly differed from group I. It was concluded that for the studied period the surfactant tyloxapol was effective to inducing hyperlipidaemia, though it did not cause atherosclerotic lesions in the aortic arch.

Key-words: aortic arch, atheroma, morphometry, morphology, rat, surfactant

1 INTRODUÇÃO

As doenças do sistema cardiovascular são consideradas as maiores causas de óbito nos países industrializados, perfazendo 41% de todas as mortes nos Estados Unidos em 1998 e, atualmente, está estabelecido que a hiperlipidemia representa um importante fator de risco para o desenvolvimento precoce de aterosclerose e complicações cardiovasculares (CHANDLER et al., 2003; HARNAFI et al., 2007).

Durante os últimos trinta anos houve um declínio razoável da mortalidade por causas cardiovasculares em países desenvolvidos, enquanto elevações relativamente rápidas e substanciais têm ocorrido em países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil. De acordo com as projeções da Organização Mundial de Saúde, esta tendência de elevação na doença cardiovascular tende a persistir, agravando ainda mais o quadro de morbidade e mortalidade elevadas nestes países, principalmente decorrente do tabagismo, hipertensão arterial, diabetes melito, obesidade e dislipidemias (SPOSITO et al., 2007)

A hiperlipidemia, um problema de países desenvolvidos e em desenvolvimento, é um dos fatores potenciais no desenvolvimento de doenças cardíacas ateroscleróticas. A ingestão contínua de altas concentrações de gordura parece estar diretamente relacionada à obesidade e a hiperlipidemia (PÉREZ et al., 1999; FAUTH et al., 2000; SPOSITO et al., 2007).

A aterosclerose é uma doença multifatorial, lenta e progressiva, resultante de uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas. O acúmulo de lípidos, células inflamatórias e elementos fibrosos, que se depositam na parede das artérias, são os responsáveis pela formação de placas ou estrias gordurosas, que geralmente ocasionam a obstrução das mesmas (GOTTLIEB et al., 2005; SPOSITO et al., 2007).

Nas sociedades ocidentais, a aterosclerose é a causa primária de 50% de todas as mortes relacionadas com infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. Contudo, países como a Groenlândia, Islândia e Japão apresentam baixa prevalência desta

condição, principalmente entre os esquimós, sugerindo uma forte relação com o estilo de vida, dieta e composição genética dos indivíduos (GOTTLIEB et al., 2005).

Como consequência da aterosclerose, as doenças coronarianas cardíacas são as causas mais comuns de morbidade e mortalidade com uma estimativa de 12 milhões de seres humanos acometidos somente nos Estados Unidos (CHANDLER et al., 2003).

Diante da elevada prevalência de aterosclerose mundialmente, o presente estudo objetivou avaliar a capacidade do surfactante na indução aterogênica na região do arco aórtico de ratos, por meio de estudos morfológico e morfométrico das túnica íntima, média e adventícia da aorta, bem como analisar o perfil lipídico sérico. Desta forma, a obtenção de um modelo experimental de hiperlipidemia e aterosclerose desenvolvida nesta pesquisa poderá ser útil não somente para a Medicina Humana, como também para a Medicina Veterinária, já que os pequenos animais (cães e gatos) apresentam uma incidência crescente de obesidade, principalmente através dos hábitos alimentares inadequados de seus proprietários, além de algumas raças de cães serem susceptíveis às dislipidemias primárias.

Com fundamento nas descrições de LEVINE & SALTZMAN (2007), ao relatarem que a injeção de 500 mg/kg do surfactante tyloxapol, via intravenosa, induziu hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia persistentes, quando este surfactante foi administrado três vezes por semana, a intervalos de 48 horas; julgou-se pertinente a investigação sobre a provável capacidade aterogênica deste fármaco quando administrado, também, a intervalos de 48 horas durante duas, três e quatro semanas, porém por via intraperitoneal, que segundo a literatura clássica, possui absorção semelhante à via intravenosa, com maior facilidade de administração e pelo fato de não requerer anestesia para tal procedimento. Imagina-se ainda, que esta pesquisa poderá padronizar o tempo necessário para a possível indução da aterogênese com o uso deste surfactante.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Estima-se que 101 milhões de adultos nos Estados Unidos apresentam hipercolesterolemia moderada e são candidatos ao controle dietético. Destes, 41 milhões são considerados de alto risco, apresentando níveis elevados de colesterol de forma acentuada, com recomendação de terapia utilizando-se fármacos hipocolesterolêmicos (CHANDLER et al., 2003).

O excesso de peso e as dislipidemias já estão estabelecidos, na literatura científica, como fatores determinantes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. No Brasil, estas doenças constituem a principal causa de morbimortalidade (CARVALHO et al., 2007).

De acordo com SPOSITO et al. (2007), um estudo conduzido em nove capitais brasileiras, envolvendo 8.045 indivíduos com idade mediana de 35 ± 10 anos, no ano de 1998, demonstrou que 38% dos homens e 42% das mulheres possuem níveis séricos de colesterol total acima dos valores da normalidade.

A natureza e a quantidade da gordura ingerida diariamente influenciam a concentração do colesterol plasmático e este, em níveis elevados, está relacionado com a incidência de doenças vasculares ateroscleróticas, especialmente doenças coronarianas (MORAIS et al., 2003).

Os principais processos envolvidos nas doenças cardíacas são ateroma, relacionado com efeito de longa duração; trombogênese, ligado a fatores dietéticos de curta duração, além de fatores que afetam o estilo de vida. Alta ingestão de gorduras saturadas, colesterol e calorias, que conduzem à obesidade, são fatores que afetam o metabolismo lipídico (MORAIS et al., 2003).

As desordens cardiovasculares têm conduzido a uma busca incessante de novos fármacos para diminuição ou prevenção dos danos causados por problemas genéticos ou por aqueles relacionados com níveis altos de lipídeos resultantes do consumo excessivo de dieta rica em gordura (OLIVEIRA et al., 2002b).

Dietas com baixo teor lipídico e medicamentos que favorecem a redução lipídica são estratégias para prevenção ou tratamento da aterosclerose e redução da incidência das doenças cardiovasculares (CHANDLER et al., 2003; HARNAFI et al., 2007).

2.1 Indução das dislipidemias experimentais

Atualmente, estudos dietéticos, metabólicos e toxicológicos são extensivamente realizados na tentativa de elucidar os fatores de risco para hipercolesterolemia e suas consequências patológicas, tais como lesões no sistema cardiovascular, cérebro entre outros (LEVINE & SALTZMAN, 2007).

As vantagens da indução das dislipidemias experimentais são a produção de lesões ateromatosas em curto espaço de tempo, adequado controle dietético associado a fatores ambientais, a possibilidade de estudos sobre a reversibilidade de lesões ateroscleróticas e ensaios pré-clínicos de substâncias hipolipidêmicas (PÉREZ et al., 1999).

Frequentemente, a hiperlipidemia é induzida experimentalmente em animais de laboratório para ser, posteriormente, comparada a estudos em seres humanos. Diversos autores descreveram diferentes formas de indução desta em animais (PÉREZ et al., 1999; LIMA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002b; MORAIS et al., 2003; HARNAFI et al., 2007; LEVINE & SALTZMAN, 2007).

Em vários estudos em seres humanos, o aparecimento de lesões ateromatosas está intimamente relacionado à disfunção do metabolismo do colesterol e, por esta razão, as tentativas de produção das dislipidemias em animais têm sido baseadas na ingestão de dietas ricas em colesterol, com o intuito de produzir uma hipercolesterolemia persistente (PÉREZ et al., 1999).

Em estudos experimentais, a hipercolesterolemia é geralmente induzida por dietas e/ou manipulações genéticas, contudo também pode ser obtida através da utilização de alguns detergentes sintéticos como forma de uma resposta tóxica (LEVINE & SALTZMAN, 2007).

2.2 Surfactante

Os surfactantes são definidos como moléculas capazes de reduzir a tensão superficial de soluções aquosas e compreendem uma importante classe dentro da indústria farmacêutica e cosmetológica. Eles são à base dos detergentes, além de serem fundamentais para a composição de emulsões, microesferas, suspensões e aerossóis (REBELLO et al., 2002).

O surfactante pulmonar é uma substância fundamental na mecânica pulmonar e está presente em todas as espécies que respiram através de pulmões. O surfactante se interpõe às moléculas de água na superfície alveolar, reduz a tensão superficial de maneira dinâmica, evitando-se assim a atelectasia (FREDDI et al., 2003).

Apresentam em sua estrutura molecular uma região hidrofóbica, constituída por uma longa cadeia de hidrocarbonetos e uma região hidrofílica, que é um grupo polar ou iônico. De acordo com a região hidrofílica, os surfactantes são classificados em catiônicos, aniônicos, anfóteros e não iônicos; ainda em naturais ou sintéticos. Atuam como moléculas que reduzem a tensão superficial na interface ar-líquido do interior do alvéolo, com isso permite evitar o colapamento alveolar no final da expiração (REBELLO et al., 2002; FREDDI et al., 2003)

Inicialmente seu uso era restrito à síndrome do desconforto respiratório das crianças prematuras, porém em anos mais recentes a pesquisa no campo da terapêutica com surfactante exógeno abrange a síndrome da aspiração meconial, pneumonias, síndrome do desconforto respiratório do tipo agudo, hérnia diafragmática congênita, entre outros (REBELLO et al., 2002).

2.2.1 Tyloxapol

O surfactante tyloxapol, um detergente não iônico, através da sua habilidade em inibir a lipase lipoprotéica (LLP), induz ao aumento do colesterol e triglicérides séricos, além de favorecer o aumento da atividade da enzima hidroximetilglutaril - CoA redutase (HMG-CoA), que é a enzima-chave intracelular para síntese do colesterol hepático (TAKAHASHI et al., 2003; WANG et al., 2006; ABE et al., 2007; LEVINE & SALTZMAN, 2007; SPOSITO et al., 2007). Tem sido amplamente utilizado para bloquear a depuração das lipoproteínas ricas em triglicérides e, assim, induzir a hiperlipidemia aguda em diversos animais (HARNAFI et al., 2007).

Este fármaco é valioso como ferramenta para indução de hiperlipidemia em estudos do metabolismo do colesterol e triglicérides e em ensaios de medicamentos hipocolesterolêmicos em ratos (LEVINE & SALTZMAN, 2007).

O modelo experimental de indução de hiperlipidemia com o uso do surfactante é amplamente utilizado para diversos objetivos, tais como avaliar a eficácia de substâncias naturais ou sintéticas com efeitos hipolipidêmicos, assim como, estudar afecções patológicas que possam ser induzidas pelas dislipidemias, tais como a pancreatite (LIMA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002b; WANG et al., 2006; HARNAFI et al., 2007).

LEVINE & SALTZMAN (2007), afirmaram que as elevações dos níveis de colesterol e triglicérides utilizando-se o surfactante como agente indutor são muito mais acentuadas comparadas às obtidas quando da utilização de dietas suplementadas com óleos ou colesterol.

De acordo com LIMA et al. (1999), a administração intraperitoneal do surfactante na dose de 300 mg/kg de peso corporal em ratos foi eficaz na indução da hipercolesterolemia observando-se um aumento de 108% nos níveis de triacilgliceróis.

Foi demonstrado que a administração parenteral do surfactante em ratos adultos induziu a hiperlipidemia e os níveis máximos de triglicérides e colesterol total plasmáticos foram alcançados em 20 horas após sua aplicação, seguido por um declínio aos valores normais (SCHURR et al., 1972 apud PÉREZ et al., 1999).

Resultados similares foram, posteriormente, obtidos por diversos autores (PÉREZ et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2002a; HARNAFI et al., 2007).

Outro estudo utilizando uma única injeção do surfactante na dose de 500 mg/kg de massa corpórea pela via intravenosa causou lipemia com níveis séricos elevados de colesterol, triglicérides e HDL em ratos necropsiados um ou dois dias após a aplicação e os níveis lipídicos retornavam aos valores de normalidade no terceiro dia após uma única injeção (LEVINE & SALTZMAN, 2007).

Informações semelhantes foram obtidas por OBARA et al. (1992), quando da aplicação de 250 mg/kg de peso corporal por via intravenosa do mesmo surfactante e realizada mensuração dos níveis de colesterol e triglicérides antes e um, dois e quatro dias após a administração do surfactante. Obtiveram-se níveis elevados tanto de colesterol, como de triglicérides, um e dois dias após a injeção do surfactante e os valores retornaram ao normal no quarto dia após a utilização desta substância.

LEVINE & SALTZMAN (2007), comprovaram que, para a obtenção de uma hiperlipidemia persistente foram necessárias mais do que duas aplicações de surfactante por semana, pela via intravenosa, com um intervalo sem tratamento de um ou dois dias entre as injeções.

Raramente estudos com o surfactante são conduzidos de forma crônica, pelo fato de que os valores de triglicérides e colesterol retornam à faixa de normalidade rapidamente após sua administração. Entretanto, LEVINE & SALTZMAN (2007), obtiveram níveis elevados e persistentes de forma ininterrupta dessas substâncias quando o surfactante fora administrado três vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras) na dose de 500 mg/kg por via intravenosa em ratos, persistindo até três dias após a última injeção. Os níveis de colesterol obtidos neste estudo foram 10 a 20 vezes maiores do que os níveis dos animais controle (normais).

A obtenção de níveis elevados de colesterol e triglicérides de forma contínua pode ser especialmente importante em estudos histopatológicos para avaliação de depósito de placas de ateromas. Contudo, se houver intervalos de tempo com níveis lipídicos normais, a regeneração ou regressão das lesões ateromatosas serão permissíveis (LEVINE & SALTZMAN, 2007).

Um dos poucos estudos com a utilização crônica do surfactante associado ao exame histopatológico, na dose de 250 mg/kg de peso corporal administrado por via intravenosa a cada quatro dias durante dois meses em ratos, sugere que este pode induzir a glomeruloesclerose focal, talvez pelo efeito tóxico direto do tyloxapol nas células glomerulares ou alternativamente, secundário às anormalidades lipídicas induzidas pelo surfactante (OBARA et al., 1992).

As doses do surfactante descritas para indução de hiperlipidemia em ratos variam de acordo com os estudos e estão em intervalos de 100 a 600 mg/kg a partir de uma solução previamente diluída com solução fisiológica a 10% (OBARA et al., 1992; LIMA et al., 1999; PÉREZ et al., 1999; FAUTH et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2002a; TAKAHASHI et al., 2003; WANG et al., 2006; ABE et al., 2007; HARNAFI et al., 2007; LEVINE & SALTZMAN, 2007; OLIVA et al., 2008).

A administração experimental do surfactante em ratos é descrita pelas vias intravenosa e intraperitoneal. A aplicação pela via intravenosa é um procedimento mais trabalhoso e requer a utilização de anestesia geral para a execução. Porém, a via intraperitoneal, apesar de proporcionar maior facilidade e praticidade na administração e apresentar índices reduzidos de falhas (5%) (MILLAR et al., 2005), pode induzir lesões inflamatórias no local da aplicação (peritonite) (HARNAFI et al., 2007; LEVINE & SALTZMAN, 2007).

2.3 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (SPOSITO et al., 2007).

A aterosclerose caracteriza-se por lesões da túnica íntima, denominadas ateromas ou placas fibrogordurosas, que fazem protrusão na luz do vaso e enfraquecem a túnica média levando a uma série de complicações (DUQUE, 1998).

Em humanos, as artérias sofrem mudanças progressivas e graduais do nascimento à morte, sendo difícil estabelecer onde os processos normais do

envelhecimento terminam e onde os processos patológicos iniciam, pois cada artéria exibe seu padrão de envelhecimento. Acredita-se que o espessamento uniforme da íntima é um fenômeno normal do envelhecimento (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular devida a diversos fatores de risco como elevação de lipoproteínas aterogênicas, hipertensão arterial ou tabagismo. Como consequência, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da túnica íntima às lipoproteínas plasmáticas favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial. Retidas, as partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) sofrem oxidação, causando a exposição de diversos neo-epítomos, tornando-as imunogênicas. O depósito de lipoproteínas na parede arterial, processo-chave no início da aterogênese, ocorre de maneira proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma (SIQUEIRA et al., 2006; SPOSITO et al., 2007).

Além do aumento da permeabilidade às lipoproteínas, outra manifestação da disfunção endotelial é o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial, processo estimulado pela presença de LDL oxidada. Essas moléculas de adesão são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a parede arterial. Induzidos por proteínas quimiotáticas, os monócitos migram para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, que por sua vez captam as LDL oxidadas. Os macrófagos repletos de lípidos são chamados células espumosas, o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (SPOSITO et al., 2007).

Alguns mediadores da inflamação estimulam a migração e proliferação das células musculares lisas da camada média arterial para a camada íntima, que passam a produzir não só citocinas e fatores de crescimento, como também matriz extracelular que formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica (STARY et al., 1994; SPOSITO et al., 2007).

A placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico. Estes elementos formam na placa aterosclerótica, o núcleo lipídico, rico em colesterol e a capa fibrosa,

rica em colágeno. As placas estáveis caracterizam-se por predomínio de colágeno, organizado em capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico de proporções menores. As instáveis apresentam atividade inflamatória intensa, especialmente nas suas bordas laterais, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico proeminente e capa fibrótica tênue. A ruptura desta capa expõe material lipídico altamente trombogênico, levando à formação de um trombo sobrejacente. Este processo, também conhecido por aterotrombose, é um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose (SPOSITO et al., 2007).

As placas ateroscleróticas possuem três componentes principais: (1) células, incluindo células musculares lisas, macrófagos e leucócitos; (2) matriz extracelular do tecido conjuntivo, incluindo colágeno, fibras elásticas e proteoglicanas e (3) depósitos lipídicos intracelulares e extracelulares. Os ateromas típicos contêm uma quantidade relativamente abundante de lipídeos. Entretanto, muitas das denominadas placas fibrosas são compostas principalmente de células musculares lisas e tecido fibroso (COTRAN & SCHOEN, 2000).

As lesões ateroscleróticas são classificadas histologicamente de acordo com a sequência de progressão de I a VI. A lesão tipo I (inicial) contém quantidades suficientes de LDL para provocar um aumento no número de macrófagos. A lesão do tipo II contém camadas de macrófagos espumosos e células musculares lisas com lipídeos no seu interior, classificadas também como “estria gordurosa”. A lesão do tipo III é um estágio intermediário entre o tipo II e IV e caracteriza-se pela quantidade de gotas lipídicas que causam disrupção das células musculares lisas da íntima. Estes lipídeos extracelulares são os precursores para a formação do “núcleo lipídico” maior que caracteriza a lesão do tipo IV (STARY et al., 1994).

Em diversos estudos na espécie humana, o aparecimento das lesões ateromatosas está intimamente relacionado à disfunção do metabolismo do colesterol propiciado por uma hipercolesterolemia persistente (PÉREZ et al., 1999).

A placa de ateroma tem sua formação desencadeada por fatores de risco que agem sobre o endotélio vascular, onde aumenta a produção de substâncias pró-coagulantes, moléculas vasoativas, citocinas e fatores de crescimento, com elevação

da permeabilidade vascular e adesão de leucócitos e plaquetas. Esta fase pode ser definida como estado inflamatório (SIQUEIRA et al., 2006).

Posteriormente, há liberação de monócitos e linfócitos T, com proliferação de células musculares lisas induzindo à chamada lesão intermediária. Ocorrerá espessamento da parede arterial com conseqüente processo de remodelação, liberação de mais macrófagos e linfócitos e posterior aparecimento de enzimas hidrolíticas e fatores de crescimento. Este fenômeno entrará em ciclos repetitivos com reestruturação da lesão, a qual apresentará cápsula fibrosa com núcleo de tecidos necrosados e lipídeos, levando assim à lesão avançada ou complicada (SIQUEIRA et al., 2006).

Múltiplas interações entre plaquetas, linfócitos T, macrófagos, células do músculo liso, moléculas de adesão e componentes genéticos têm sido documentadas e provavelmente promovam o ambiente de inflamação e crescimento necessários para provocar injúria endotelial. Este processo é continuado pelo aumento de transporte por transcitose da LDL para a camada íntima, verificando-se o acúmulo dessas lipoproteínas, tanto na forma nativa quanto na oxidada, iniciando a formação da placa de ateroma. Conseqüentemente, sob a persistência da interação destes fatores, a inflamação crônica persiste, levando a uma cicatrização inadequada da lesão. Finalmente pode ocorrer a formação de trombo com a oclusão do lúmen vascular (GOTTLIEB et al., 2005).

Embora qualquer artéria possa ser afetada, os principais alvos da doença são as artérias aorta, coronárias e cerebrais, tendo como principais conseqüências infarto do miocárdio, isquemia cerebral e aneurisma aórtico (GOTTLIEB et al., 2005; ARGENTA & PEREIRA, 2009). Os vasos mais afetados, em ordem decrescente, são: aorta abdominal, artérias coronárias, artérias poplíteas, aorta torácica, carótidas internas e os vasos do polígono de Willis (COTRAN & SCHOEN, 2000).

Na patogenia da doença aterosclerótica, um conjunto de fatores de risco clássicos e emergentes tem sido correlacionado, contudo, as lipoproteínas, principalmente as LDL, têm ocupado um papel de destaque na etiologia desta afecção, ainda que, muitos indivíduos desenvolvam doença cardiovascular na ausência de anormalidades do perfil das lipoproteínas (GOTTLIEB et al., 2005).

A aterosclerose é considerada uma doença imune-inflamatória, na qual células imunocompetentes, tais como monócitos, macrófagos e linfócitos T, estão presentes em todos os estágios da lesão. A disfunção endotelial, considerada como passo inicial na aterogênese, caracteriza-se por uma resposta inflamatória da parede vascular à injúria, ou seja, um conjunto de reações celulares e moleculares a diversos agressores, dentre eles o aumento da concentração de LDL e LDL modificada. Esta lipoproteína atua no endotélio induzindo a expressão gênica do fator estimulador de colônia de macrófagos e da proteína quimiotática para monócitos 1, estimulando a replicação de macrófagos no espaço sub-endotelial e recrutando mais células inflamatórias para a lesão em formação. Os macrófagos estimulam a proliferação de linfócitos T *helper*, seguindo, desta forma, uma interação entre estas duas populações de células, cada qual produzindo citocinas específicas, implementando o processo inflamatório crônico característico da doença (SIQUEIRA et al., 2006).

Pesquisas realizadas apontam para a possibilidade de que, *in vivo*, uma pequena quantidade de LDL eletronegativa desencadeie resposta inflamatória no endotélio, e que este efeito é mais pronunciado em indivíduos hipercolesterolêmicos, nos quais a proporção de LDL eletronegativa no plasma chega a ser oito vezes maior que nos indivíduos normolipêmicos (SIQUEIRA et al., 2006).

Esta idéia a respeito da patogênese da aterosclerose levanta questionamentos e oportunidades na prevenção e terapia desta doença. Portanto, o entendimento da biologia básica da inflamação na aterosclerose proporcionará um melhor suporte clínico que poderá alterar o caminho da prática da medicina preventiva e propiciar benefícios para a saúde pública (GOTTLIEB et al., 2005).

Por esta razão torna-se necessária a padronização de um modelo experimental de hiperlipidemia persistente e ininterrupta, em animais de laboratório, com a utilização do surfactante e a avaliação da possível capacidade aterogênica desta substância em duas, três e quatro semanas, para futuros estudos histopatológicos, a longo prazo, do sistema cardiovascular.

2.4 Metabolismo das lipoproteínas

Os lipídeos, por serem parcialmente insolúveis no meio aquoso, são transportados no organismo sob a forma de partículas denominadas lipoproteínas, que são formadas por uma capa hidrofílica constituída por fosfolipídeos, colesterol livre e proteínas, envolvendo um núcleo hidrofóbico que contém triglicérides (TG) e colesterol esterificado. As proteínas são denominadas apolipoproteínas ou apoproteínas (apo). Estas, além de sua função estrutural, interagem como receptores de membrana celular e/ou atuam como co-fatores enzimáticos (SOUZA et al., 1996; SIQUEIRA et al., 2006; SPOSITO et al., 2007).

Existem quatro grandes classes de lipoproteínas separadas em dois grupos: (1) as ricas em TG, maiores e menos densas, representadas pelos quilomícrons (Qm), de origem intestinal, e pelas lipoproteínas de densidade muito baixa ou “very low density lipoprotein” (VLDL), de origem hepática; e (2) as ricas em colesterol de densidade baixa ou “low density lipoprotein” (LDL) e de densidade alta ou “high density lipoprotein” (HDL). Existe ainda uma classe de lipoproteínas de densidade intermediária ou “intermediary density lipoprotein” (IDL) (SPOSITO et al., 2007).

As fontes de lipídeos no organismo são originárias da síntese endógena ou exógena (alimentação) (SIQUEIRA et al., 2006). O ciclo exógeno se inicia com a absorção do material lipídico proveniente da alimentação e sua incorporação nos Qm sintetizados pelas células intestinais. Caracterizam-se por transportar o colesterol da dieta e ser rico em TG, tendo como apo fundamental a B-48. Os Qm entram na circulação linfática e alcançam a corrente sanguínea pelo ducto torácico, podendo receber diferentes apos (A, C e E) de outras lipoproteínas. Nos capilares, os Qm entram em contato com a LLP que, ativada pela apo C-II, hidrolisa os TG, retira os ácidos graxos e torna-os partículas de menor tamanho - remanescentes de quilomícrons (R-Qm). Os R-Qm são removidos da circulação pelos receptores localizados nas células hepáticas, sendo então metabolizados. A enzima LLP é, particularmente, ativa no endotélio capilar (SOUZA et al., 1996; SIQUEIRA et al., 2006).

O ciclo endógeno tem início com a síntese hepática das VLDL, as quais contêm principalmente TG e as apo B-100, E e C. Na circulação capilar, as VLDL entram em contato com a LLP, dando origem aos remanescentes de VLDL (R-VLDL) ou IDL. Estas partículas seguem dois caminhos: cerca de dois terços das IDL podem ser captados pelo fígado, pelos receptores de apo B/E e degradados em seus componentes. O terço restante sofre ação da lipase hepática, principalmente no fígado, formando as LDL. Tanto as LDL como as IDL são retiradas da circulação pelos receptores celulares B/E, existentes principalmente no fígado. Vale salientar que as LDL são as principais carreadoras de colesterol para os tecidos periféricos em humanos, entretanto em cães e gatos a maior parte do colesterol é transportado pelas HDL, motivo este que faz com que a hiperlipidemia seja uma situação pouco frequente nestas espécies (CASTRO, 2008a). Uma vez no interior das células, as LDL são fragmentadas, liberando colesterol e aminoácidos (SPOSITO et al., 2007).

Parte do material liberado pela ação da LLP sobre os Qm e as VLDL são utilizados na formação de outra lipoproteína: HDL. As partículas de HDL, sintetizadas no intestino e no fígado, têm como principais componentes a apo A-I (adquirida principalmente no fígado) e os fosfolípidos. As HDL têm grande importância no transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado (transporte reverso de colesterol). As HDL captam colesterol não esterificado dos tecidos periféricos pela ação da enzima lecitina-colesterol-acil-transferase (LCAT) e então levam o colesterol para o fígado diretamente e transferem os ésteres de colesterol para outras lipoproteínas, principalmente as VLDL, pela ação de uma proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP). O cão não apresenta esta proteína explicando, assim, o motivo pelo qual o colesterol permanece ligado à lipoproteína HDL. Provavelmente nesta espécie, o transporte reverso de colesterol seja efetuado por um receptor hepático para HDL. Uma vez no fígado, o colesterol proveniente dos tecidos pode ser reaproveitado, participando de outras vias metabólicas, ou excretado na bile, principal via de eliminação, com reabsorção de cerca de dois terços do mesmo, através do ciclo entero-hepático (SOUZA et al., 1996; SIQUEIRA et al., 2006; SPOSITO et al., 2007).

2.5 Aspectos histológicos normais das artérias

As artérias são normalmente compostas de três túnicas ou camadas, nomeadas túnica íntima, média e adventícia (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A túnica íntima, camada mais interna, apresenta uma camada de células endoteliais apoiada em uma camada de tecido conjuntivo frouxo, camada subendotelial, a qual pode conter, ocasionalmente, células musculares lisas. Ela está separada da média por uma lâmina elástica interna, componente mais externo da íntima. Esta lâmina, composta principalmente de elastina, possui fenestras que permitem a difusão de substâncias para nutrir células situadas mais profundamente na parede do vaso. Como resultado da ausência de pressão sanguínea e da contração do vaso por ocasião da morte, a lâmina elástica interna das artérias geralmente apresenta um aspecto ondulado nos cortes histológicos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A túnica média é constituída principalmente por camadas concêntricas de células musculares lisas organizadas helicoidalmente. Interpostas entre as células musculares lisas existem quantidades variáveis de fibras e lamelas elásticas, fibras reticulares (colágeno do tipo III), proteoglicanas e glicoproteínas. As células musculares lisas são as responsáveis pela produção destas moléculas da matriz extracelular. Nas artérias, a túnica média possui uma lâmina elástica externa mais delgada que separa esta da túnica adventícia (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A túnica adventícia consiste principalmente em colágeno do tipo I e fibras elásticas. A camada adventícia torna-se gradualmente contínua com o tecido conjuntivo do órgão pelo qual o vaso sanguíneo está passando. Também são encontrados, nesta túnica, capilares linfáticos, *vasa vasorum* (vasos dos vasos), e nervos, podendo estas estruturas penetrar até a porção mais externa da média (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais, alimentação e instalações

Para este estudo foram utilizados 28 ratos Wistar, machos, albinos, adultos com peso médio de 200 g e hígidos, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Botucatu/SP. Estes animais foram adaptados em gaiolas no Biotério do Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique” do Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP), São José do Rio Preto - SP, com temperatura controlada e ciclo de claro-escuro de 12 horas e receberam água e ração¹ para manutenção *ad libitum*, durante 30 dias consecutivos.

3.2 Procedimento experimental

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais formados por sete animais cada, a saber: Grupo I – (controle), recebeu 1,5 mL de solução fisiológica via intraperitoneal a cada 48 horas, durante quatro semanas consecutivas; Grupo II – tratado com surfactante², na dose de 500 mg/kg de peso corporal, via intraperitoneal a cada 48 horas, durante duas semanas consecutivas; Grupo III – tratado com surfactante² na dose de 500 mg/kg de peso corporal, via intraperitoneal a cada 48 horas, durante três semanas consecutivas; Grupo IV – tratado com surfactante² na dose de 500 mg/kg de peso corporal, via intraperitoneal a cada 48 horas, durante quatro semanas consecutivas.

Após 48 horas do término dos tempos descritos para cada grupo experimental, os animais foram submetidos a jejum alimentar de 16 horas e, em seguida, foram anestesiados com éter etílico, via inalatória, para a colheita de sangue por punção cardíaca, visando o estudo bioquímico dos níveis séricos de colesterol total, triglicérides

¹ Labina® - Purina

² Tyloxapol - Triton WR 1339® Sigma-Aldrich Biotechnology LP

HDL e LDL. Após a colheita de sangue sem anticoagulante, este foi acondicionado em tubos e centrifugado a 1500 G, durante 10 minutos. A amostra de soro obtida foi congelada a -20°C até o momento do processamento. A seguir, os animais foram eutanasiados, mediante o aprofundamento anestésico com o mesmo fármaco, para a colheita da região do arco aórtico, com o intuito de investigar, valendo-se de análises morfológica e morfométrica, a possível formação de ateroma no arco aórtico, induzido pelo uso do surfactante mencionado.

3.3 Procedimentos morfológico e morfométrico

Após a eutanásia dos animais, a região do arco aórtico foi colhida e lavada cuidadosamente em solução salina e fixada em solução de Bouin durante 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, foi processada rotineiramente para inclusão em histosec visando a obtenção de cortes histológicos, realizando-se microtomias semi-seriadas à espessura de $5\ \mu\text{m}$, com intervalos de $100\ \mu\text{m}$, os quais foram corados pelas técnicas do tricrômico de Masson (TOLOSA et al., 2003). Mediante o sistema analisador de imagens³ acoplado a um microscópio binocular⁴, as lâminas foram observadas e fotomicrografadas para os estudos morfológico e morfométrico. Neste último foram avaliadas, em micrômetros, as espessuras das túnicas íntima, média e adventícia. Para cada animal foram confeccionadas cinco lâminas, coradas com as colorações supracitadas, com cinco cortes histológicos cada, perfazendo-se 25 cortes por animal e 175 por grupo experimental.

3.4 Avaliação do perfil lipídico sérico

Após descongelamento, as amostras de soro foram utilizadas para as determinações dos níveis séricos de colesterol total, triglicérides, HDL e LDL pelos

³ Image Pro-plus

⁴ Olympus

métodos enzimáticos⁵ no Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV, Câmpus de Jaboticabal, UNESP. Todas as análises foram feitas em duplicatas.

O perfil lipídico pode ser obtido através de determinações bioquímicas do colesterol total, colesterol ligado à HDL ou HDL, colesterol ligado à LDL ou LDL e triglicérides, após jejum de 12 a 14 horas. O LDL também pode ser calculado pela equação de *Friedewald* (JOHNSON et al., 1997; SOUZA et al., 2003), que corresponde a LDL: colesterol total - HDL - TG/5, onde TG/5 representa o VLDL. Contudo, em pacientes com hipertrigliceridemia intensa (TG maior que 400 mg/dL) esta equação é imprecisa (CORDOVA et al., 2004; SPOSITO et al., 2007). No presente estudo, como houve elevação nos níveis de triglicérides séricos (> 400 mg/dL) após indução pelo surfactante, a obtenção dos valores de LDL foi realizada por dosagem bioquímica direta.

Também através da equação de *Friedewald*, os valores de VLDL podem ser obtidos através de uma fórmula, que corresponde a VLDL: TG/5, entretanto da mesma forma que a dosagem de LDL, diante de valores de triglicérides acima de 400 mg/dL, este cálculo não é considerado confiável. Assim, como não há kit comercialmente disponível para tal mensuração, a obtenção dos valores de VLDL não foi realizada.

3.5 Análise estatística

Foi realizado delineamento inteiramente casualizado, com quatro grupos amostrais de animais machos com peso homogêneo. Os pesos dos animais de cada grupo apresentaram distribuição gaussiana pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (P ajustado em 0,05) e não foi detectada diferença entre os grupos pelo teste de análise de variância (ANOVA) não-pareado seguido pelo teste de Tukey.

⁵LABTEST

O procedimento estatístico foi realizado mediante ANOVA para verificar a diferença entre os tratamentos dos grupos I, II, III e IV. No caso das diferenças significativas observadas entre os tratamentos foi utilizado o teste *a posteriori* de Tukey para determinar entre quais tratamentos as diferenças ocorreram (comparação das médias). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo e as análises foram realizadas no programa estatístico AgroEstat (Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agrônomico) versão 1.0, 2009.

4 RESULTADOS

4.1 Morfológicos

4.1.1 Morfologia macroscópica do arco aórtico

A morfologia macroscópica do segmento do arco aórtico está ilustrada na Figura 1, região esta utilizada para as análises histológica e morfométrica.

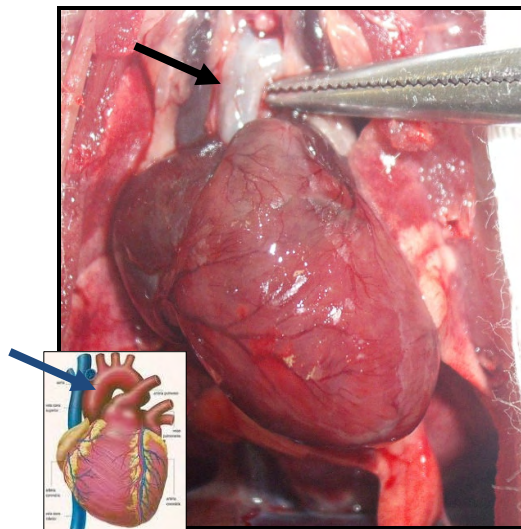


Figura 1. Segmento do arco aórtico representado esquematicamente (seta azul) e em detalhes (seta preta) na fotografia, colhido para realização das análises histológicas, 3x (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).

4.1.2 Morfologia microscópica do arco aórtico

Os resultados histológicos obtidos, neste estudo, sobre a morfologia do arco aórtico de ratos Wistar dos grupos controle (Grupo I), tratados com tyloxapol por duas semanas (Grupo II), tratados com tyloxapol por três semanas (Grupo III) e tratados com tyloxapol por quatro semanas (Grupo IV) estão ilustrados na Figura 2.

A análise do segmento do arco aórtico dos animais do grupo I evidenciou aspecto histológico normal para as túnicas íntima, média e adventícia nesta porção

arterial (Figura 3). Na túnica íntima, verificou-se endotélio constituído por tecido epitelial simples pavimentoso, sustentado por tecido conjuntivo frouxo (subendotélio), seguido pela membrana limitante elástica interna. Na túnica média observou-se fibras musculares lisas entre fibras elásticas em abundância. Notou-se ainda a presença da membrana limitante elástica externa, que delimita esta túnica da túnica adventícia. A túnica adventícia consistiu principalmente em fibras colágenas e elásticas e *vasa vasorum*.

A análise do segmento do arco aórtico dos animais dos grupos II (Figura 4), III (Figura 5) e IV (Figura 6) revelou características histológicas semelhantes às do grupo I (Figura 3), em todas as estruturas mencionadas, em relação ao aspecto e localização e não houve formação de placa de ateroma.

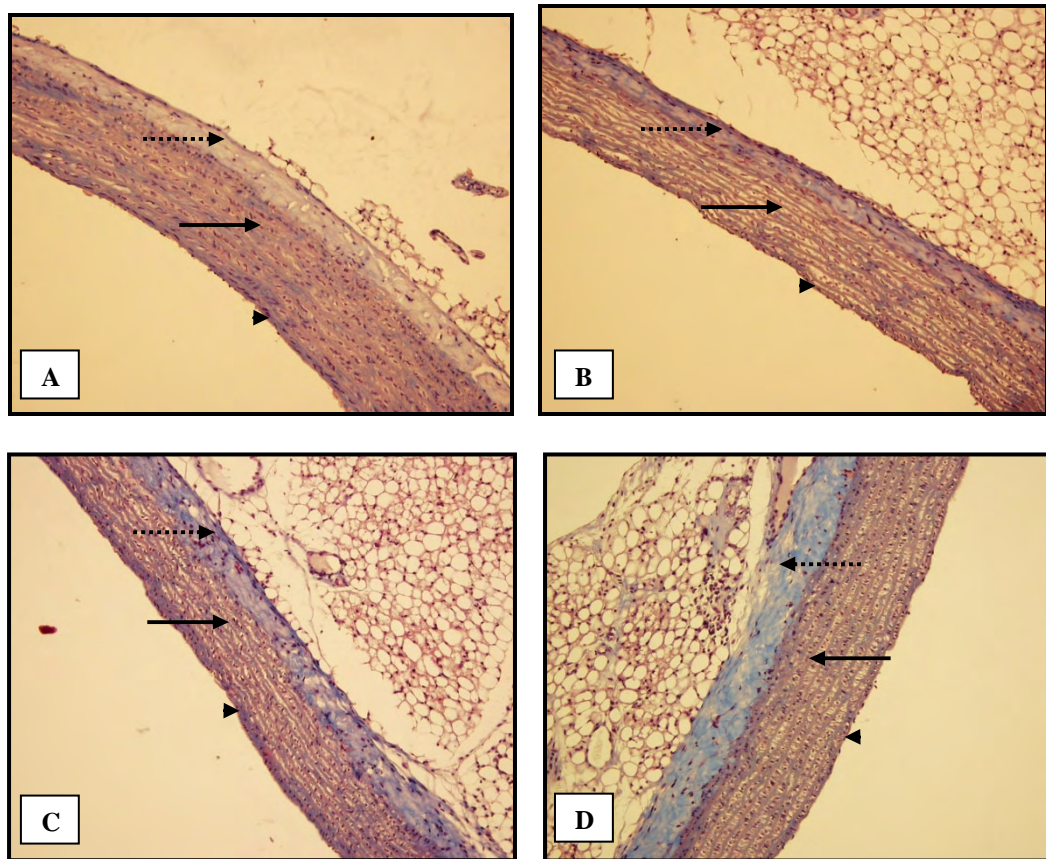


Figura 2. Fotomicrografia do segmento do arco aórtico de ratos Wistar, dos grupos I, II, III, IV representados pelas letras A, B, C e D, respectivamente. Observa-se a Túnica Íntima (▶), Média (→) e Adventícia (·····▶). Coloração: Tricrômico de Masson, 10x (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).

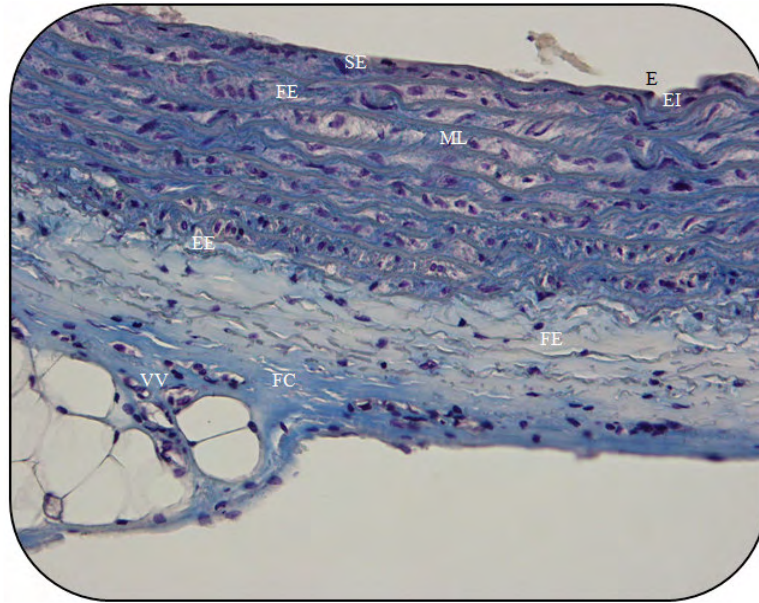


Figura 3. Fotomicrografia do segmento do arco aórtico de ratos Wistar do grupo I evidenciando na túnica íntima o endotélio (E), o subendotélio (SE) e a membrana limitante elástica interna (EI); na túnica média as fibras musculares lisas (ML) entremeadas às fibras elásticas (FE) e a membrana limitante elástica externa (EE) e na túnica adventícia as fibras colágenas (FC), as fibras elásticas (FE) e a *vasa vasorum* (VV). Tricrômico de Masson, 40x (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).

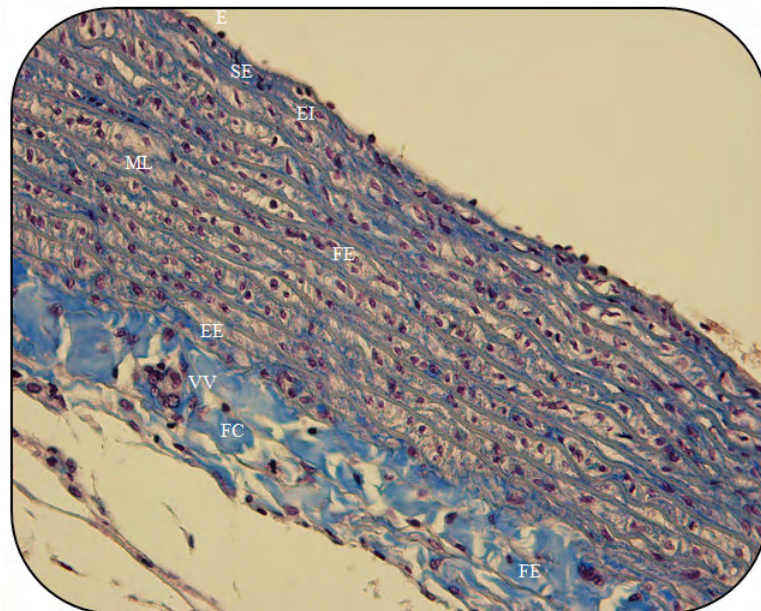


Figura 4. Fotomicrografia do segmento do arco aórtico de ratos Wistar do grupo II evidenciando na túnica íntima o endotélio (E), o subendotélio (SE) e a membrana limitante elástica interna (EI); na túnica média as fibras musculares lisas (ML) entremeadas às fibras elásticas (FE) e a membrana limitante elástica externa (EE) e na túnica adventícia as fibras colágenas (FC), as fibras elásticas (FE) e a *vasa vasorum* (VV). Tricrômico de Masson, 40x (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).

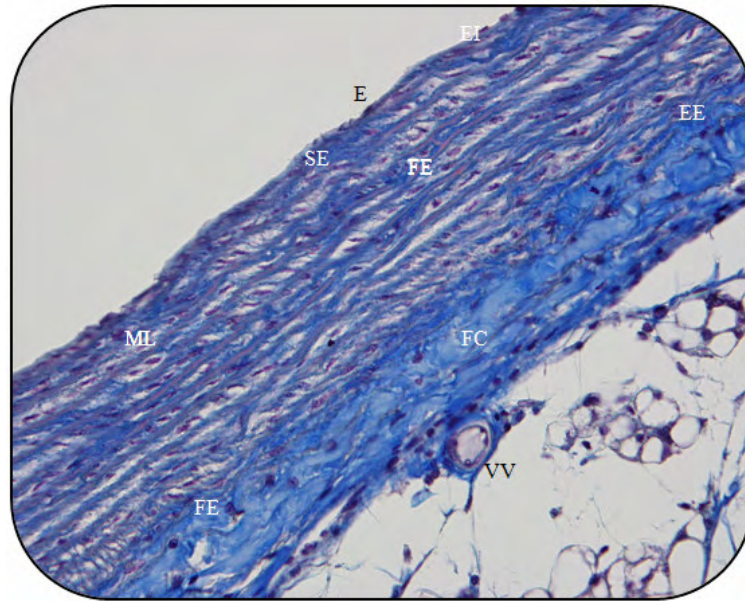


Figura 5. Fotomicrografia do segmento do arco aórtico de ratos Wistar do grupo III evidenciando na túnica íntima o endotélio (E), o subendotélio (SE) e a membrana limitante elástica interna (EI); na túnica média as fibras musculares lisas (ML) entremeadas às fibras elásticas (FE) e a membrana limitante elástica externa (EE) e na túnica adventícia as fibras colágenas (FC), as fibras elásticas (FE) e a *vasa vasorum* (VV). Tricrômico de Masson, 40x (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).

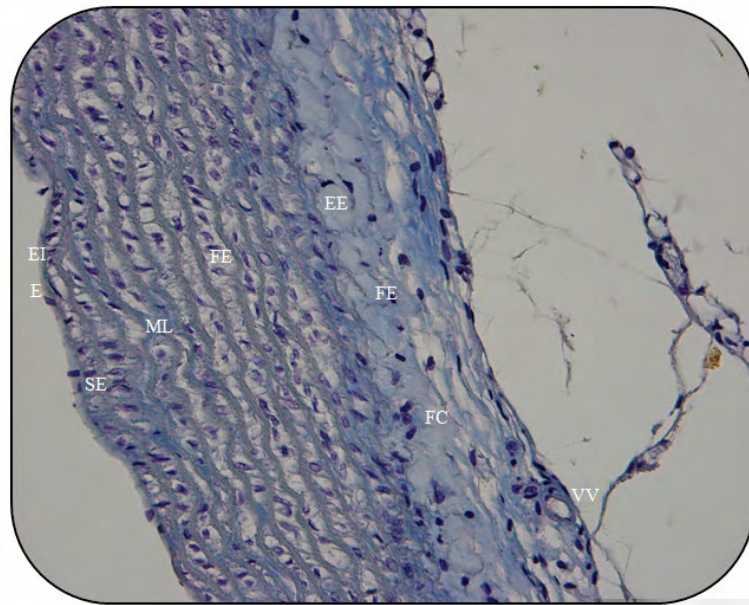


Figura 6. Fotomicrografia do segmento do arco aórtico de ratos Wistar do grupo IV evidenciando na túnica íntima o endotélio (E), o subendotélio (SE) e a membrana limitante elástica interna (EI); na túnica média as fibras musculares lisas (ML) entremeadas às fibras elásticas (FE) e a membrana limitante elástica externa (EE) e na túnica adventícia as fibras colágenas (FC), as fibras elásticas (FE) e a *vasa vasorum* (VV). Tricrômico de Masson, 40x (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).

4.2 Morfométricos

A análise estatística dos resultados referentes aos valores médios \pm erro padrão da média (EPM) da espessura das túnicas íntima, média e adventícia do segmento do arco aórtico, obtidos neste estudo, estão expostos nas Figuras de 7 a 9.

Os valores da espessura da túnica íntima, em μm , indicaram que o grupo III diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) dos grupos I, II e IV, os quais não diferiram entre si ($p \geq 0,05$) (Figura 7).

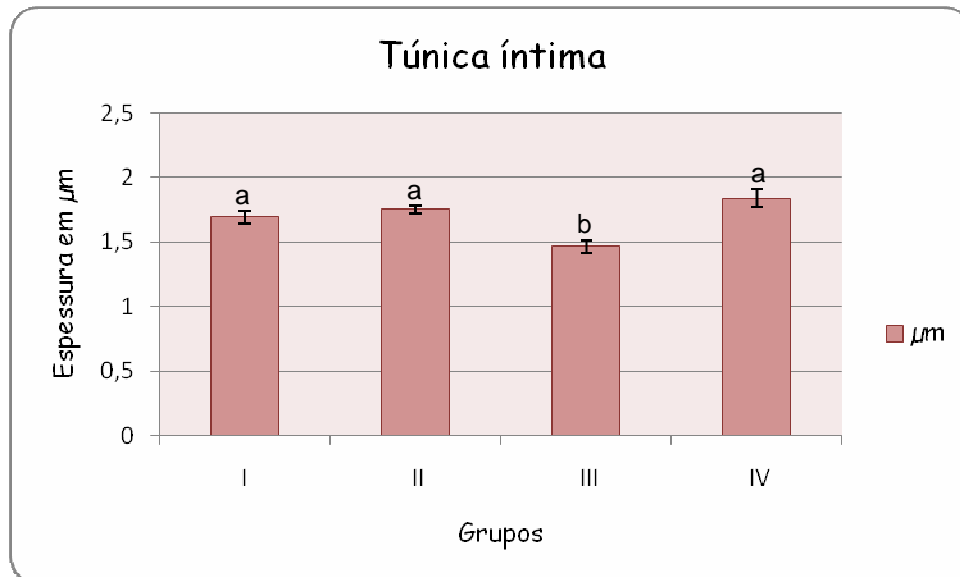


Figura 7. Valores médios \pm EPM da espessura, em μm , da Túnica Íntima do segmento do arco aórtico de ratos Wistar, dos grupos controle (Grupo I), tratados com tyloxapol por duas semanas (Grupo II), tratados com tyloxapol por três semanas (Grupo III) e tratados com tyloxapol por quatro semanas (Grupo IV). Letras diferentes denotam significância ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).

Os valores da espessura da túnica média, em μm , evidenciaram que não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre os grupos I, II, III e IV (Figura 8).

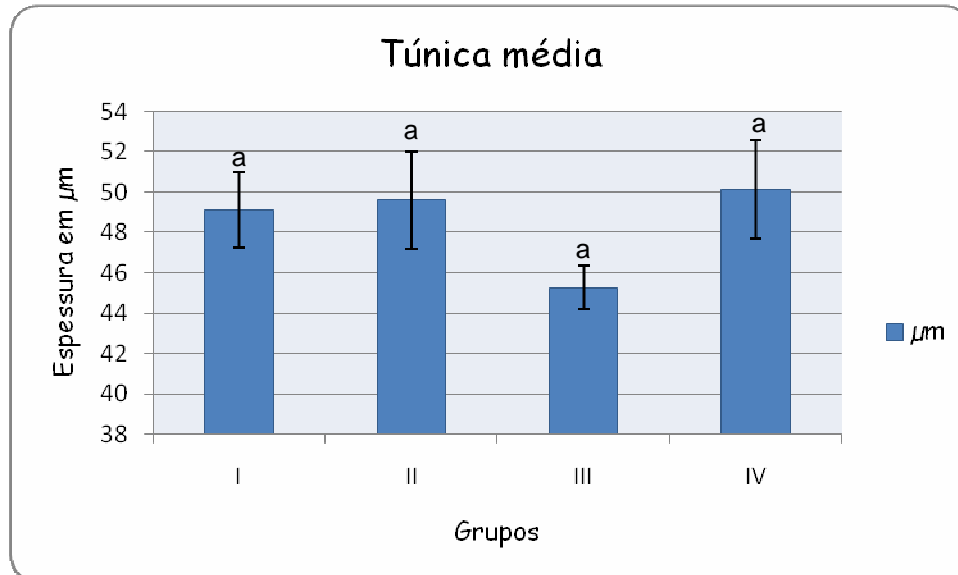


Figura 8. Valores médios \pm EPM da espessura, em μm , da Túnica Média do segmento do arco aórtico de ratos Wistar, dos grupos controle (Grupo I), tratados com tyloxapol por duas semanas (Grupo II), tratados com tyloxapol por três semanas (Grupo III) e tratados com tyloxapol por quatro semanas (Grupo IV). Letras diferentes denotam significância ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).

Os valores da espessura da túnica adventícia, em μm , revelaram que não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre os grupos I, II, III e IV (Figura 9).

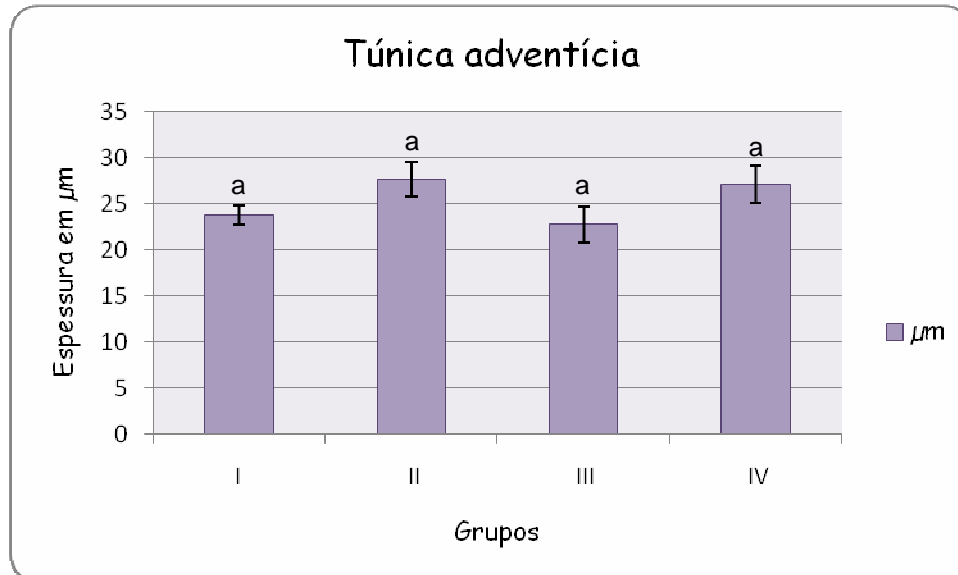


Figura 9. Valores médios \pm EPM da espessura, em μm , da Túnica Adventícia do segmento do arco aórtico de ratos Wistar, dos grupos controle (Grupo I), tratados com tyloxapol por duas semanas (Grupo II), tratados com tyloxapol por três semanas (Grupo III) e tratados com tyloxapol por quatro semanas (Grupo IV). Letras diferentes denotam significância ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).

4.3 Perfil lipídico sérico

A análise estatística dos resultados referentes aos valores médios \pm EPM do perfil lipídico sérico, obtidos neste estudo estão expressos nas Figuras de 10 a 13.

Os valores de colesterol total, em mg/dL, revelaram que o grupo III diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) do grupo I, porém não diferiu ($p \geq 0,05$) dos grupos II e IV. Não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre os grupos I, II e IV (Figura 10).

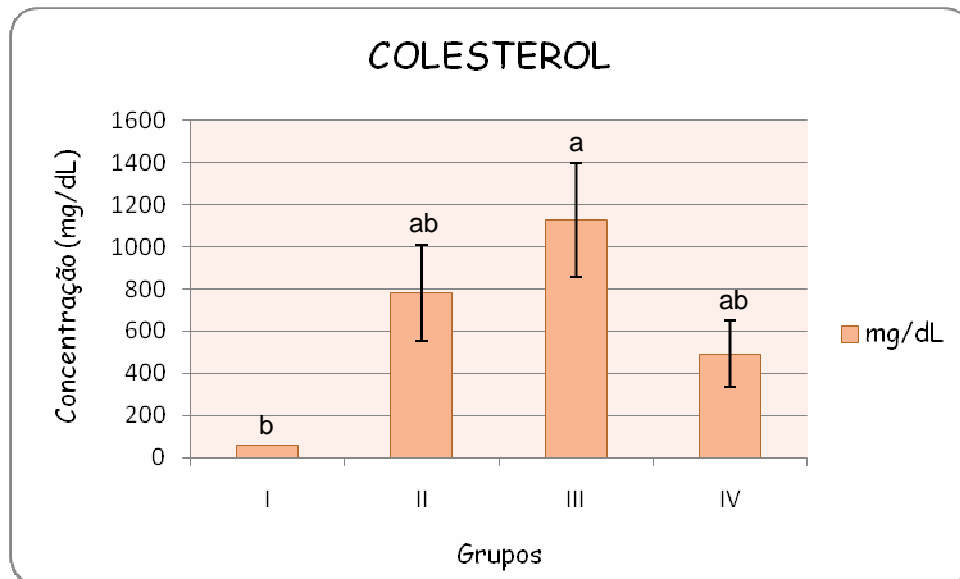


Figura 10. Valores médios \pm EPM dos níveis séricos de Colesterol Total, em mg/dL, de ratos Wistar, dos grupos controle (Grupo I), tratados com tyloxapol por duas semanas (Grupo II), tratados com tyloxapol por três semanas (Grupo III) e tratados com tyloxapol por quatro semanas (Grupo IV). Letras diferentes denotam significância ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).

Os valores de Triglicérides, em mg/dL, evidenciaram que o grupo I diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) do grupo III, porém não diferiu ($p \geq 0,05$) dos grupos II e IV. Os grupos II, III e IV não apresentaram diferenças estatísticas entre si ($p \geq 0,05$) (Figura 11).

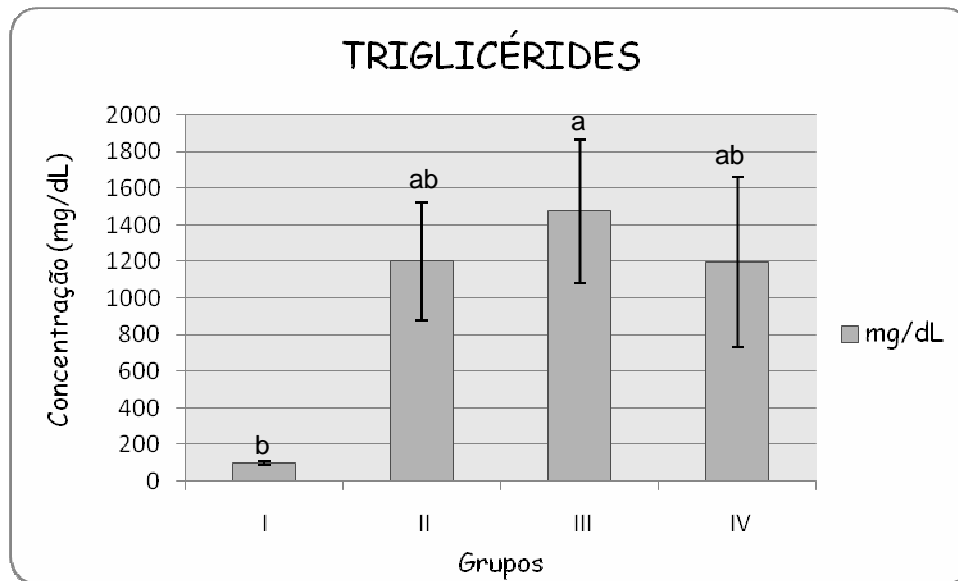


Figura 11. Valores médios \pm EPM dos níveis séricos de Triglicérides, em mg/dL, de ratos Wistar, dos grupos controle (Grupo I), tratados com tyloxapol por duas semanas (Grupo II), tratados com tyloxapol por três semanas (Grupo III) e tratados com tyloxapol por quatro semanas (Grupo IV). Letras diferentes denotam significância ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).

Os valores de HDL, em mg/dL, indicaram que o grupo I diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) do grupo III, porém não diferiu ($p \geq 0,05$) dos grupos II e IV. Os grupos II, III e IV não apresentaram diferenças estatísticas entre si ($p \geq 0,05$) (Figura 12).

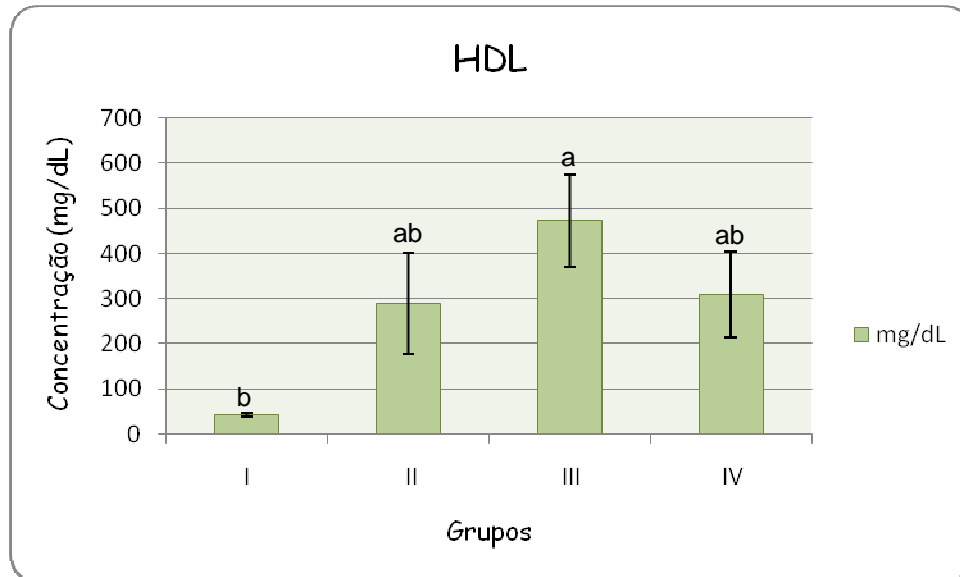


Figura 12. Valores médios \pm EPM dos níveis séricos de HDL, em mg/dL, de ratos Wistar, dos grupos controle (Grupo I), tratados com tyloxapol por duas semanas (Grupo II), tratados com tyloxapol por três semanas (Grupo III) e tratados com tyloxapol por quatro semanas (Grupo IV). Letras diferentes denotam significância ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).

Os valores de LDL, em mg/dL, indicaram que o grupo I diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) do grupo III, porém não diferiu ($p \geq 0,05$) dos grupos II e IV. Os grupos II, III e IV não apresentaram diferenças estatísticas entre si ($p \geq 0,05$) (Figura 13).

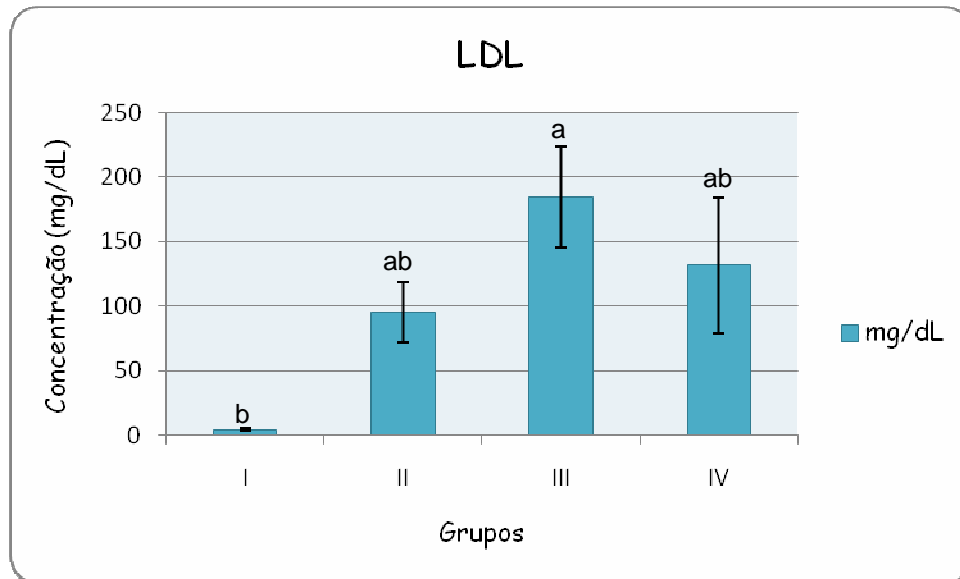


Figura 13. Valores médios \pm EPM dos níveis séricos de LDL, em mg/dL, de ratos Wistar, dos grupos controle (Grupo I), tratados com tyloxapol por duas semanas (Grupo II), tratados com tyloxapol por três semanas (Grupo III) e tratados com tyloxapol por quatro semanas (Grupo IV). Letras diferentes denotam significância ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey (FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, 2010).

5 DISCUSSÃO

De acordo com LEVINE & SALTZMAN (2007), estudos preliminares demonstraram que a administração do surfactante pelas vias subcutânea e intraperitoneal induziu inflamação no subcutâneo e no peritônio, respectivamente, o que seria inadequado, especialmente em animais de experimento. Entretanto MILLAR et al. (2005), constataram que a via intraperitoneal apresentou vantagens em relação à intravenosa por proporcionar maior facilidade e praticidade na administração sem a necessidade da utilização de anestesia geral, ausência de inflamação no local da aplicação (OLIVEIRA et al., 2002b; TAKAHASHI et al., 2003) e por apresentar índices reduzidos de falhas (5%). Corroborando com os achados de MILLAR et al. (2005), a aplicação do surfactante através da via intraperitoneal foi bem tolerada, de fácil contenção e manuseio dos animais experimentais e não foi observado nenhum tipo de reação adversa durante todo o período experimental. A forma de administração por meio de aplicação intraperitoneal foi extremamente eficiente, pois não houve desperdício do princípio ativo, além de fácil a contenção e manuseio por uma única pessoa. Os animais experimentais não apresentaram nenhuma evidência de inflamação no local da aplicação, através da inspeção macroscópica do peritônio durante a necropsia, conforme os dados de OLIVEIRA et al. (2002b); TAKAHASHI et al. (2003), além de não ter havido perda de animais durante todo o período experimental.

A dose do surfactante utilizada (500 mg/kg de peso corporal) foi eficiente em elevar o perfil lipídico sérico e induzir lipemia intensa nos ratos estudados, o que reflete os achados de estudos prévios em que as doses de tyloxapol descritas para a mesma função estão em intervalos de 100 a 600 mg/kg de peso corporal a partir de uma solução previamente diluída com solução fisiológica a 10% (OBARA et al., 1992; LIMA et al., 1999; PÉREZ et al., 1999; FAUTH et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2002a; TAKAHASHI et al., 2003; WANG et al., 2006; ABE et al., 2007; HARNAFI et al., 2007; LEVINE & SALTZMAN, 2007; OLIVA et al., 2008).

Houve certa dificuldade na diluição prévia do surfactante em solução fisiológica para obtenção de uma solução a 10%, já que o surfactante é extremamente oleoso.

Desta forma este procedimento teve que ser feito lentamente com homogeneização constante, o que não foi relatado em estudos anteriores.

Houve elevação acentuada das concentrações de colesterol, triglicérides, LDL e HDL induzidos pelo surfactante neste experimento. Dietas suplementadas com óleos ou acrescidas de colesterol têm sido comumente utilizadas para indução da hiperlipidemia em ratos, entretanto as concentrações obtidas nesse caso são menores comparadas às encontradas com a utilização do surfactante. De acordo com MORAIS et al. (2003), após 56 dias de suplementação dietética com óleos de soja, canola, azeite de oliva e gordura suína em níveis de 7% e 14%, houve aumento nos valores de colesterol total, HDL e LDL+VLDL séricos quando a fonte foi gordura suína a 14%, porém em níveis reduzidos comparados aos encontrados quando da utilização do surfactante nos animais aqui estudados.

Entretanto, a hipercolesterolemia induzida por LIMA et al. (2001), em coelhos utilizando-se ração acrescida de colesterol a 1% e ácido cólico 0,1% durante 28 dias correspondeu a 1.590,40 mg/dl \pm 136,75 e foi considerada proporcional aos valores obtidos nesse estudo com a utilização do surfactante.

LEVINE & SALTZMAN (2007), descreveram que uma única injeção intraperitoneal do surfactante na dose de 500 mg/kg de peso corporal causou lipemia e induziu níveis elevados de colesterol, triglicérides e HDL em ratos um e dois dias após a aplicação; e esses valores eram dez vezes ou mais elevados comparados ao grupo controle. Informações semelhantes foram obtidas por OBARA et al. (1992), utilizando a dose de 250 mg/kg de peso corporal por via intravenosa do mesmo surfactante. Os valores obtidos foram elevados tanto de colesterol, como de triglicérides, um e dois dias após a injeção do surfactante e estes retornaram ao normal no quarto dia após a utilização desta substância. Concordando com OBARA et al. (1992) e LEVINE & SALTZMAN (2007), OLIVEIRA et al. (2002a), constataram elevação dos níveis de colesterol, HDL e triacilgliceróis em ratos após 43 horas da administração do surfactante na dose de 300 mg/kg de peso corporal pela via intraperitoneal. Corroborando com OBARA et al. (1992); OLIVEIRA et al. (2002a); LEVINE & SALTZMAN (2007), no presente estudo, após 48 horas da última administração do

surfactante foi evidenciada lipemia, mesmo após jejum alimentar de 16 horas, e elevação das concentrações de colesterol, triglicérides, HDL e LDL 10 vezes mais intensa comparadas aos valores do grupo controle.

LEVINE & SALTZMAN (2007), demonstraram que, para obtenção de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia ininterruptas e persistentes (uma, duas e três semanas), foram necessárias três injeções do surfactante por semana com intervalo de um ou dois dias entre elas. Assim, a hiperlipidemia foi mantida até três dias após a última injeção e a concentração de colesterol, nesse caso, eram 10 a 20 vezes maiores comparadas aos valores normais. No presente estudo, corroborando com os achados dos autores supracitados, as concentrações de colesterol evidenciadas 48 horas após a última injeção do surfactante foram 18 vezes mais elevadas que àquelas encontradas no grupo controle.

HARNAFI et al. (2007), descreveram que após 7 e 24 horas da administração do surfactante na dose de 200 mg/kg de peso corporal pela via intraperitoneal houve marcante aumento dos valores de colesterol e triglicérides, comparados ao grupo controle. Os valores séricos de colesterol total aumentaram 109% e 270%, respectivamente, comparados ao grupo controle e os valores de triglicérides aumentaram mais que 20 e 12 vezes, respectivamente. No presente estudo, os valores de colesterol total, obtidos 48 horas após a última administração do surfactante na dose de 500 mg/kg de peso corporal realizada em dias alternados durante três semanas, aumentaram de forma significativa correspondendo a mais de 18 vezes (1745%) comparados ao grupo controle. Quanto aos triglicérides, os valores alcançados foram 14 vezes mais elevados comparados ao grupo controle.

Em relação ao HDL e LDL, HARNAFI et al. (2007), perceberam que 7 e 24 horas após a injeção do surfactante os valores de HDL não alteraram e os valores de LDL aumentaram 328% e 653%, comparados ao grupo controle. No presente estudo, 48 horas após a aplicação do surfactante os valores de HDL elevaram-se 1006%, diferindo então dos achados de HARNAFI et al. (2007), e os valores de LDL elevaram 4236%, comparados ao grupo controle.

OLIVEIRA et al. (2002b), ao utilizarem o surfactante na dose de 300 mg/kg de peso corporal, por via intraperitoneal diluído em solução salina, perceberam a eficiência do mesmo na indução hiperlipidêmica nos animais estudados, com valores de 152,7% nos teores de colesterol total, 49,7% de HDL e 108% nos de triacilgliceróis 48 horas após a aplicação, comparados ao grupo controle. Concordando com o atual estudo que obteve uma elevação de 1745% e 1006% nos níveis de colesterol total e HDL, respectivamente, comparados ao grupo controle.

De acordo com TAKAHASHI et al. (2003), o mesmo surfactante foi utilizado na dose de 400 mg/kg de peso corporal de ratos pela via intraperitoneal em uma solução previamente diluída a 10% e foi efetivo na indução de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, além de induzir lipemia intensa. Tais resultados refletem os obtidos nesse estudo, porém na dose de 500 mg/kg de peso corporal.

Houve diferença estatisticamente significativa, nas concentrações de colesterol total, triglicérides, HDL e LDL somente entre o grupo I (controle) e o grupo III (tratados por 3 semanas), talvez pelo fato de duas semanas de tratamento não terem sido suficientes para elevar de forma expressiva os níveis lipídicos séricos e com quatro semanas de tratamento (Grupo IV) imagina-se que os animais já estavam adaptados para metabolizar o surfactante exógeno.

Os resultados morfológicos evidenciaram semelhança e normalidade entre os grupos experimentais, ora aqui estudados, quanto às estruturas pertinentes às túnicas íntima, média e adventícia, bem como a ausência de ateroma na túnica íntima. Provavelmente, a histologia deste segmento arterial não foi alterada pelo curto período de administração do surfactante, que desta forma não desencadeou o início da cascata de eventos aterogênicos, na região endotelial. Esta suposição se respalda em GOTTLIEB et al. (2005), ao descreverem que a aterogênese é um processo lento e progressivo; pois segundo SPOSITO et al. (2007), a gênese do ateroma aumenta a permeabilidade da túnica íntima às lipoproteínas plasmáticas, favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial. Assim, esta suposição fundamenta-se em OBARA et al. (1992), que ao utilizarem o mesmo surfactante na dose de 250 mg/kg de peso corporal em ratos, a cada 4 dias durante 2 meses, comprovaram que, em relação

à avaliação histológica, houve um aumento significativo na porcentagem de glomérulos com esclerose segmentar e células espumosas. Desta forma, em consequência, a túnica média também manteve-se normal, uma vez que somente em lesões progressivas, segundo MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al. (2001), fatores quimiotáticos das células musculares lisas da túnica média, ativados por citocinas e fatores de crescimento liberados nas lesões da túnica íntima, induzem a proliferação daquela túnica, contribuindo assim para a evolução das lesões. Neste mesmo sentido, a túnica adventícia também se apresentou normal, corroborando com STARY et al. (1994), ao mencionarem que somente em estágios avançados de lesões ateroscleróticas ocorre deformidade na túnica adventícia.

Quanto aos resultados morfométricos verificou-se que, somente na espessura da túnica íntima, houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre o grupo III e os demais grupos experimentais, os quais não diferiram entre si. Este grupo apresentou os menores valores médios, fato este que permite aventar a hipótese de que esta diferença tenha sido casual, considerando-se que o grupo II, que recebeu tratamento por duas semanas, não diferiu do grupo controle e do grupo IV, que recebeu tratamento por quatro semanas. Possivelmente a túnica íntima, em todos os grupos experimentais, revelou aspecto histológico normal, ou seja, não apresentou aterosclerose em consequência ao curto período de administração do surfactante, o que se respalda em GOTTLIEB et al. (2005); SPOSITO et al. (2007) ao relatarem que, a aterosclerose é uma doença multifatorial, lenta e progressiva, resultante de uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas. O acúmulo de lipídeos, células inflamatórias e elementos fibrosos, que se depositam na parede das artérias, são os responsáveis pela formação de placas ou estrias gordurosas, que geralmente ocasionam a obstrução das mesmas.

STARY et al. (1994), descreveram que em lesões avançadas, onde ocorre grande acúmulo de lipídeos na íntima levando a ruptura e deformação desta túnica, estes mesmos depósitos podem modificar a média (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008) e a adventícia subjacentes, o que concorda com os achados encontrados nesse estudo,

onde não observou-se alterações histológicas em nenhuma das túnicas supracitadas, talvez em consequência do curto período de tempo experimental.

A realização da avaliação histológica do arco aórtico através da microscopia eletrônica de varredura, talvez pudesse revelar lesões iniciais na camada subendotelial, as quais não foram permissíveis a visualização por meio da microscopia óptica.

Desta forma, baseado nos resultados encontrados nesse trabalho sugere-se que o surfactante possa ser um agente indutor de hiperlipidemia, porém julgam-se necessários novos estudos com sua utilização a partir de quatro semanas e com o advento da microscopia eletrônica de varredura para verificar se há desenvolvimento de lesão aterosclerótica em arco aórtico a longo prazo, tornando, desta forma, a utilização do surfactante em ratos um padrão de modelo experimental para estudo da doença aterogênica.

6 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos neste estudo, concluiu-se que a administração intraperitoneal do surfactante tyloxapol, na dose de 500 mg/kg de peso corporal a cada 48 horas a ratos Wistar, durante um período de duas, três e quatro semanas:

- ✓ Não foi suficiente para o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas no segmento do arco aórtico estudado.
- ✓ Na análise morfométrica a espessura da túnica íntima foi menor no grupo III comparada aos grupos I, II e IV e as túnicas média e adventícia não apresentaram diferenças entre os grupos experimentais.
- ✓ Induziu elevação das concentrações de colesterol total, triglicérides, HDL e LDL, entretanto só foi considerada estatisticamente significativa na comparação entre o grupo controle e o grupo III.

7 REFERÊNCIAS⁴

ABE, C.; IKEDA, S.; UCHIDA, T.; YAMASHITA, K.; ICHIKAWA, T. Triton WR1339, na inhiitor of lipoprotein lipase, decrease vitamin E concentration in some tissues of rats by inhibiting its transport to liver. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 137, p. 345-350, 2007.

ARGENTA, R.; PEREIRA, A. H. Modelos animais de aneurisma de aorta. **Jornal Vascular Brasileiro**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 2, p. 148-153, 2009.

CARVALHO, D. F.; PAIVA, A. A.; MELO, A. S. O.; RAMOS, A. T.; MEDEIROS, J. S.; MEDEIROS, C. C. M.; CARDOSO, M. A. A. Perfil lipídico e estado nutricional de adolescentes. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 491-498, 2007.

CASTRO, M. Aterosclerose em cães: Uma Revisão. **Revista Divisa**, Itapiranga, v. 5, n. 1, p. 279-286, 2008 (a).

CASTRO, M. **Morfologia e morfometria do arco aórtico de coelhos com ateroma induzido tratados com resveratrol como modelo experimental na prevenção da aterosclerose. I. Perfil lipídico sérico**. 2008. 58 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – área Patologia Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal (b).

⁴Associação Brasileira de Normas Técnicas NRB 6023

CHANDLER, C. E.; WILDER, D. E.; PETTINI, J. L.; SAVOY, Y. E.; PETRAS, S. F.; CHANG, G.; VINCENT, J.; HARWOOD, J. CP-346086: an MTP inhibitor that lowers plasma cholesterol and triglycerides in experimental animals and in humans. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 44, p. 1887-1901, 2003.

CORDOVA, C. M. M.; SCHNEIDER, C. R.; JUTTEL, I. D.; CORDOVA, M. M. Avaliação da dosagem direta do colesterol – LDL em amostras de sangue de 10.664 pacientes em comparação com o uso da fórmula de Friedewald. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 83, p. 476-481, 2004.

COTRAN, R. S.; SCHOEN, F. Vasos sanguíneos. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**, 6 ed. São Paulo, Guanabara Koogan, 2000, p. 441-460.

DUQUE, F. L. V. Aterosclerose: aterogênese e fatores de risco. Rio de Janeiro. Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vasculiar Regional. Disponível: <[HTTP://www.ateriosclerose.med.br/revistas/sbacvrj/1998/3/Atualizacaop/03.htm](http://www.ateriosclerose.med.br/revistas/sbacvrj/1998/3/Atualizacaop/03.htm)>. Acessado em: 10 out. 2009

FAUTH, S.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Atividade hipolipidêmica da trans-desidrocrotonina (T-DCTN), um diterpeno 19 nor-clerodano do *croton cajucara benth* (sacaca). **Pesquisa Médica**, Fortaleza, v. 3, n. 1-4, p. 15-21, 2000.

FREDDI, N. A.; FILHO, J. O. P.; FIORI, H. H. Terapia com surfactante pulmonar exógeno em pediatria. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 79, p. 205-212, 2003.

GOTTLIEB, M. G. V., BONARDI, G., MORIGUCHI, E. H. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 15, n. 3, p. 2003-2007, 2005

HARNAFI, H.; BOUANANI, N. H.; AZIZ, M.; CAID, H. S.; GHALIM, N.; AMRANI, S. The hypolipidaemic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers extract in Triton WR – 1339 induced hyperlipidaemic rats: A comparison with fenofibrate. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 109, p. 156-160, 2007.

JOHNSON, R.; McNUTT, P.; MaCMAHON, S.; ROBSON, R. Use of the Friedewald formula to estimate LDL-cholesterol in patients with chronic renal failure on dialysis. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 43, p. 2183-2210, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524 p.

LEVINE, S.; SALTZMAN, A. A procedure for inducing sustained hyperlipemia in rats by administration of a surfactant. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v. 55, p. 224-226, 2007.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; OLIVEIRA, M. G. A.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; GOMES, S. M.; SEIXAS FILHO, J. T. Determinação da atividade de lipase na presença de morina, naringenina, naringina e rutina. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 626-631, 1999.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; STRINGHETA, P. C.; TINOCO, A. L. A.; SILVA, J. F. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 196-200, 2001.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J.; LLORENTE-CORTÉS, V.; BADIMON, L. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas. **Revista Española de Cardiología**, Barcelona, v. 54, p. 218-231, 2001.

MILLAR, J. S.; CROMLEY, D. A.; McGOY, M. G.; RADER, D. J.; BILLHEIMER, J. T. Determining hepatic triglyceride production in mice: comparison of poloxamer 407 and triton WR-1339. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 46, p. 2023-2028, 2005.

MORAIS, C. S. N.; BARCELOS, M. F. P.; SOUSA, R. V.; LIMA, H. M.; LIMA, A. L. Efeitos das fontes e níveis de lipídios nas dietas de ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) sobre frações lipídicas do sangue. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1082-1088, 2003.

OBARA, K.; SAITO, T.; SHOJI, Y.; CHIBA, S.; SOMA, J.; SATO, H.; YOSHINAGA. Administration of Triton WR 1339 aggravates chronic aminonucleoside nephrosis. **Nephron**, Basel, v. 60, p. 119-120, 1992.

OLIVA, M. E.; CHICCO, A. G.; FORTINO, M. A.; LOMBARDO, Y. B. Efectos de la sustitución de caseína por proteína de soja aislada como fuente proteica en dislipemia experimental. **Revista FABICIB**, Santa Fe, v. 12, p. 57-67, 2008.

OLIVEIRA, T. T.; PEREIRA, W. L.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; SANTOS, C. A. Efeito regulatório de flavonóides e de carmin nos níveis de lipídeos em ratos Wistar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 1, 2002a.

OLIVEIRA, T. T.; GOMES, S. M.; NAGEM, T. J.; COSTA, N. M. B.; SECOM, P. R. Efeitos de diferentes doses de flavonóides em ratos hiperlipidêmicos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 45-51, 2002b.

PÉREZ, C.; CANAL, J. R.; ROMERO, A.; TORRES, M. D. Experimental hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia in rats. **Acta Physiologica Hungarica**, Budapest, v. 86, n. 1, p. 57-68, 1999.

REBELLO, C. M.; PROENÇA, R. S. M.; TROSTER, E. J.; JOBE, A. H. Terapia com surfactante exógeno pulmonar – o que é estabelecido e o que necessitamos determinar. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 78, p. 215-226, 2002.

SIQUEIRA, A. F. A.; ABDALLA, D. S. P.; FERREIRA, S. R.G. LDL: da síndrome metabólica à instabilização da placa aterosclerótica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 334-343, 2006.

SOUZA et al. Consenso brasileiro sobre dislipidemias: Detecção, avaliação e tratamento. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 67, n. 2, p. 113-128, 1996.

SOUZA, L. J.; CHALITA, F. E. B.; REIS, A. F. F.; TEIXEIRA, C. L.; NETO, C. G.; BASTOS, D. A.; FILHO, J. T. D. S.; SOUZA, T. F.; CÔRTEZ, V. A. Prevalência de diabetes mellitus e fatores de risco em Campos dos Goytacazes, RJ. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, São Paulo, v. 47, p. 69-74, 2003.

SPOSITO, A. C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F. A. H.; BERTOLAMI, M. C. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 88, p. 01-19, 2007.

STARY, H. C.; CHAIR, A.; CHANDLER, B.; GLAGOV, S.; GUYTON, J. R.; INSULL, W.; ROSENFELD, M. E.; SCHAFFER, S. A.; SCHWARTZ, C. J.; WAGNER, W. D. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Philadelphia, v. 14, n. 5, p. 840-856, 1994.

TAKAHASHI, Y.; INABA, N.; KUWAHARA, S.; KUKI, W. CP-346086: an MTP inhibitor that lowers plasma cholesterol and triglycerides in experimental animals and in humans. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 67, n. 11, p. 2448-2450, 2003.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; NETO, A. G. F. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. 331 p.

WANG, Y. J.; SUN, J. B.; LI, F.; ZHANG, S. W. Hyperlipidemia intensifies cerulean-induced acute pancreatitis associated with activation of protein kinase C in rats. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 12, n. 18, p. 2908-2913, 2006

APÊNDICE

Apêndice A. Valores médios da espessura, em μm , das Túnicas Íntima, Média e Adventícia do segmento do arco aórtico de ratos Wistar, dos grupos controle (Grupo I), tratados com tyloxapol por duas semanas (Grupo II), tratados com tyloxapol por três semanas (Grupo III) e tratados com tyloxapol por quatro semanas (Grupo IV).

Grupos	Íntima	Média	Adventícia
I	1,6942857	49,084286	23,735714
II	1,7514286	49,590000	27,622857
III	1,4642857	45,258571	22,710000
IV	1,8385714	50,140000	27,088571

Apêndice B. Valores médios dos níveis séricos de Colesterol Total, Triglicérides, LDL e HDL, em mg/dL, de ratos Wistar, dos grupos controle (Grupo I), tratados com tyloxapol por duas semanas (Grupo II), tratados com tyloxapol por três semanas (Grupo III) e tratados com tyloxapol por quatro semanas (Grupo IV).

Grupos	Colesterol Total	Triglicérides	LDL	HDL
I	61,112857	99,857143	4,2557143	42,714286
II	782,60143	1202,1429	95,200000	289,14714
III	1128,0857	1473,1429	184,54857	472,49000
IV	491,08000	1196,8571	131,70714	308,22000