

## COMPORTAMENTO DA PAREDE ARTERIAL DE RATOS NÃO SELECIONADOS, IDOSOS E JOVENS, FRENTE A FATORES DIETÉTICOS POTENCIALMENTE ATEROGÊNICOS

ÂNGELO MAGNAGHI, SÉRGIO DIOGO GIANNINI, IDÉRCIO LUIZ SINHORINI,  
JOSÉ LUIZ BERNARDINO MERUSSE  
São Paulo, SP

**Objetivo** Avaliar resposta da parede arterial de ratos idosos e jovens submetidos à ração com fatores aterogênicos (colesterol, ácido deidrocolico e vitamina D<sub>2</sub>).

**Casística e Métodos** 20 ratos machos albinos idosos (aproximadamente 1 ano de idade) agrupados em grupo 1 (controle), 5 animais; grupo 2, 5 animais recebendo ração com colesterol mais ácido deidrocolico; grupo 3, 10 ratos com a mesma ração complementada por vitamina D<sub>2</sub>. Grupos equivalentes, 4, 5, 6, com 2 meses de idade, foram comparados aos primeiros, submetidos às mesmas condições. Após 2 meses, procederam-se dosagens de colesterol (CT), triglicérides e HDL. A seguir, os ratos foram sacrificados para análise histopatológica da aorta, coração e pulmão através dos métodos da hematoxilina-eosina, Verhoeff e orceína acética.

**Resultados** A colesterolemia média foi de 52,4 mg/dl no grupo 1 e de 52,6 no grupo 4. Nos grupos 3 e 6 foi praticamente o dobro e nos 2 e 5 o triplo da dos controles. Não se observaram diferenças significativas entre as médias de CT de animais jovens e idosos. Verificou-se diferença significativa quando analisada a influência dos fatores aterogênicos: a administração simultânea de ácido deidrocolico e colesterol triplicou o valor de CT, no entanto, conjuntamente à administração de vitamina D<sub>2</sub>, elevou CT apenas para o dobro. Não foram obtidas lesões ateroscleróticas, mas exclusivamente lesões de mediosclerose de Monckberg (calcificação da camada média) nos animais que receberam vitamina D<sub>2</sub>.

**Conclusão** A parede arterial de ratos não selecionados idosos e jovens se comportou igual-

## ARTERIAL WALL BEHAVIOUR IN NON-SELECTED OLD AND YOUNG RATS SUBMITTED TO POTENTIALLY ATHEROGENIC DIETETIC FACTORS

**Purpose** To evaluate the arterial wall behaviour in old and young rats submitted to a ration containing atherogenic factors (cholesterol, dehydrocolic acid and vitamin D<sub>2</sub>).

**Material and Methods** 20 old male albino rats (approximately one year old) were grouped as follows: group 1, five control animals; group 2, five animals receiving a ration with cholesterol plus dehydrocolic acid; group 3, ten rats receiving an equivalent ration added to vitamin D<sub>2</sub>. Equivalent groups (4, 5 and 6), with an identical number, but younger animals (2 months old), were compared to the former. Groups 4, 5 and 6 were treated in the same way of groups 1, 2 and 3. After two months, all the groups were bled for cholesterol (CT), triglycerides and HDL dosage. After wards, they were sacrificed and the histopathological analysis of the aorta, heart, and lungs executed by the hematoxylin-eosin, Verhoeff and acetic orcein methods.

**Results** Serum cholesterol (average) was 52 mg/dl in group 1 and 56.6 in group 4. Groups 3 and 6 presented about two times the serum cholesterol level observed in control groups and groups 2 and 5 three times control groups. When the old and young animals CT averages were compared, no significant differences were observed. However, when the influences of the atherogenic factors were analyzed, significant differences appeared; the simultaneous administration of dehydrocolic acid and cholesterol tripled the value of CT, and the use of vitamin D<sub>2</sub>, applied with other factors, raised CT only to the double. No atherosclerotic lesions were obtained but only Monckberg atherosclerosis lesions, sclerosis type (calcification of the medium stratum) in those animals who received vitamin D<sub>2</sub>.

mente frente a ração contendo colesterol, ácido deidrocolico e vitamina D<sub>2</sub>, desenvolvendo lesões calcificadas da média (mediosclerose) mas não lesões de tipo aterosclerótico, apesar da manutenção prolongada de hipercolesterolemia.

Palavras chave: Aterosclerose, dieta aterogênica, ateroma.

*Conclusion* The arterial wall of non-selected old and young rats behaved equally when submitted to a ration containing cholesterol, dehydrocolic acid and vitamin D<sub>2</sub>. They developed calcified lesions of atherosclerotic type, in spite of a prolonged hypercholesterolemia.

Key words Atherosclerosis; atherogenic diet; atheroma.

## Arq Bras Cardiol 56/5: 385-388 Maio 1991

Diferentes pesquisas<sup>1,2</sup> indicam que a vitamina D<sub>2</sub> é fator de agressão à parede arterial. Estudos em ratos da raça Wistar, animais resistentes ao desenvolvimento experimental de aterosclerose, evidenciaram que a adição de vitamina D<sub>2</sub> à ração, juntamente com ácido deidrocolico e colesterol induz a alterações parietais com as características das lesões ateroscleróticas observadas no homem<sup>3</sup>. É de consenso, a partir de estudos histopatológicos em artérias humanas, que a extensão e a severidade da aterosclerose estão relacionadas à idade; saliente-se a raridade de estudos experimentais que tivessem a preocupação de analisar a influência do atributo idade nas investigações.

Avaliamos se ratos não selecionados teriam comportamento superponível aos Wistar e, ainda, se os animais idosos responderiam como os jovens a idênticas condições de experimentação, partindo da premissa que as artérias dos primeiros poderiam ficar mais vulneráveis que os últimos ao colesterol contido na ração a ser usada.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 40 ratos não selecionados, albinos, machos mantidos em gaiolas onde receberam água e ração balanceada durante 2 meses.

Constituíram-se 2 conjuntos: conjunto A, composto por 20 ratos idosos, com 1 ano de idade, pesando entre 350 e 400 g, subdividido em 3 grupos: grupo 1, com 5 animais que receberam ração convencional, servindo de controle do experimento; grupo 2, com 5 animais que receberam ração adicionada de colesterol e ácido deidrocolico na proporção de 0,5% para ambos; grupo 3, com 10 animais que tiveram ração com os mesmos componentes do grupo 2 (colesterol 0,5% e ácido deidrocolico 0,5% mas que, nos primeiros 4 dias da investigação, receberam vitamina D<sub>2</sub> administrada "per os" na dose de 350.000 u/kg de peso; conjunto B. composto por 20 ratos jo-

vens com 60 dias de idade, pesando entre 120 e 150 g, igualmente subdivididos entre os grupos 4, 5 e 6 receberam tratamento equivalente aos do conjunto A.

No final do período foram coletadas amostras de sangue para dosagens bioquímicas de colesterol (CT)<sup>6</sup>, triglicérides (TG) e HDL-colesterol (HDL-C)<sup>6</sup> e a seguir, os animais foram sacrificados, coletando-se amostras da aorta, coração e pulmão para estudo histopatológico.

Após a fixação no líquido de Bouin as amostras foram colocadas em parafina donde se obtiveram cortes com 5u de espessura que receberam coloração respectivamente pelos métodos da hematoxilina e eosina, Verhoeff e orceína acética. A análise histopatológica, bem como a respectiva documentação fotográfica, foi realizada com auxílio de fotomicroscópio Leitz Ortolux, utilizando-se filme ILFORD pan F 35 mm.

O estudo estatístico dos resultados bioquímicos foi realizado através de análise de variância. Diante dos resultados, os valores da colesterolemia dos ratos dos grupos de 3 e 6 foram comparados com os obtidos nos grupos 2 e 5 através do teste "t" de Student. Utilizou-se como significativa a probabilidade de 95% (p < 0,05).

### RESULTADOS

Os valores das médias e os respectivos desvios-padrão, para o colesterol total, estão na tabela II. Os grupos controle 1 e 4 foram confrontados com os 2 e 5 e 3 e 6 através da análise de variância, observando-se respectivamente valores de F = 5,08 (F crítico = 3,01) e F = 5,62 (F crítico = 3,63) para a variável colesterol total; para TG e HDL-C os valores de F não foram significativos.

A simples observação das médias de CT nos grupos 2, 5, 3 e 6 na tabela II evidencia que as diferenças não são decorrentes do atributo "jovem" ou

TABELA I Médias e respectivos desvios padrão da colesterolemia total /mg/dl) nos diferentes grupos.		
Grupos	Média	Desvio-Padrão
1	52,4	8,0
4	52,6	6,6
2	162,2	105,7
5	168,2	61,4
3	119,2	61,6
6	106,3	24,2

“idoso” e sim dos componentes adicionados à ração. Reunindo os valores do grupo 2 aos do 5 e comparando-os, através do teste “t”, com os do grupo 3 reunidos aos do 6 encontrou-se diferença significativa ( $t = 2,12$ ,  $t$  crítico =  $2,06$ ; grau de liberdade 26).

A análise dos cortes histológicos dos animais dos diferentes grupos mostra que os controles e os grupos 2 e 5 não exibiram alterações estruturais, mantendo-se inalterada a parede, independente da condição idade e do tipo de ração administrada (fig. 1 e 2). Alterações acentuadas foram observadas nos animais dos grupos 3 e 6, caracterizados por placas que comprometiam a camada média mas não estando presentes células inflamatórias ou fagocitárias,

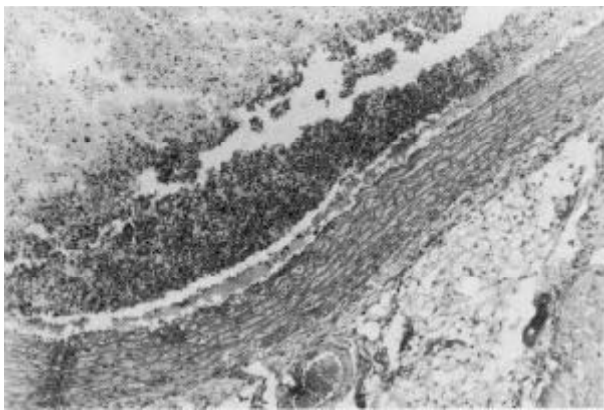


Fig. 1—Fotomicrografia de corte histológico de artéria de ratos controle. Notar a ausência de alterações significativas nos componentes constituintes da parede arterial. H.E. 125X.

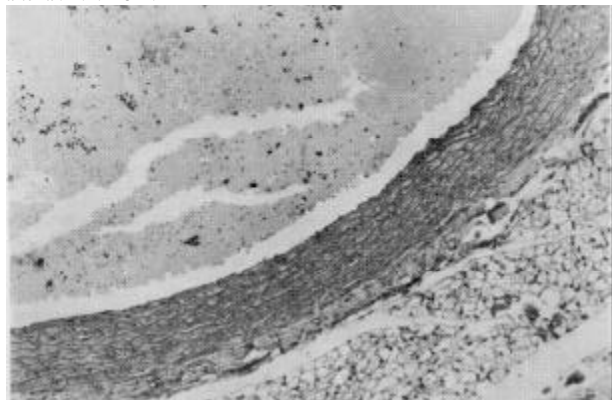


Fig. 2—Fotomicrografia de corte histológico de artéria de ratos que receberam colesterol + ácido dehidrocólico na ração alimentar. Notar a ausência de alterações significativas nos componentes da parede arterial. H.E. 125X.

respeitando a estrutura do endotélio (fig. 3). A coloração pelo Von Kossa demonstrou que essas placas eram formadas por depósito de cálcio (fig. 4) e, pela orceína, que a estrutura laminar das fibras elásticas se mantinha intacta (fig. 5).

## DISCUSSÃO

O comportamento da parede arterial frente a elevados níveis de colesterolemia é variável segundo a espécie animal. Em coelhos e em macacos há fácil aparecimento de lesões semelhantes às da aterosclerose humana<sup>4,6,8,9</sup>. Em ratos, a hipercolesterolemia isolada não é suficiente para determinar alterações parietais mas, quando simultaneamente administrava-se vitamina D<sub>2</sub>, surgem lesões cujas características lembram as observadas no homem. Aubert e col<sup>3</sup>, utilizando grande numero de ratos Wistar submetidos a ração rica em colesterol, ácido dehidrocólico e vitamina D<sub>2</sub>, obtiveram alterações do tipo aterosclerótico, o mesmo sendo observado

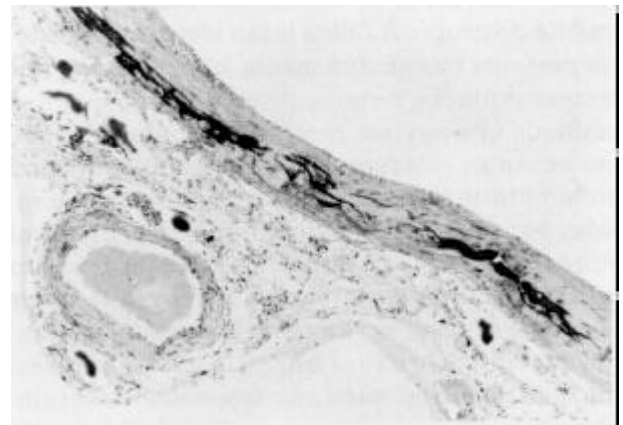


Fig. 3—Fotomicrografia de corte histológico de artéria de ratos tratados com ácido dehidrocólico + colesterol + vitamina D<sub>2</sub>. Notar a presença de placas comprometendo a camada média do vaso, bem como a ausência de células inflamatórias ou fagocitárias no local. H.E. 125X.

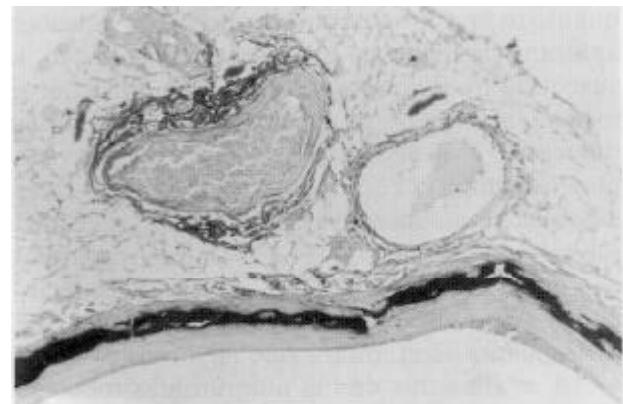


Fig. 4—Fotomicrografia de corte histológico do mesmo segmento de artéria da figura 3 submetido à coloração de Von Kossa. Notar a presença de grande quantidade de cálcio presente na camada média. Von Kossa. 125X.

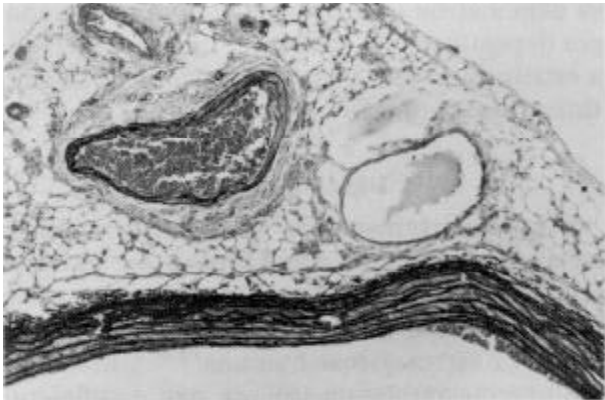


Fig. 5—Fotomicrografia de corte histológico do segmento da artéria da figura 3 submetido a Colorado daorceína acética. Notar a integridade das fibras elásticas. O.P. 125X.

por Giannini e col<sup>5</sup>.

É interessante notar que, na presente investigação do ponto de vista morfológico, com mesmo método, os resultados não foram os referidos por aqueles pesquisadores.

De fato, a simples avaliação pelo método da hematoxilina-eosina não identificou modificações estruturais do endotélio, independentemente do grupo. A única lesão identificada esteve presente na camada média, caracterizada por extensas placas, fortemente coradas, apenas nos animais que haviam recebido vitamina D<sub>2</sub> sem, no entanto, estarem presentes células do tipo inflamatório ou fagocitário. A análise por colorações especiais permitiu definir que o material era formado por sais de cálcio e que seu depósito se fazia mantendo intacta a estrutura laminar das fibras elásticas. Ficou evidenciado, portanto, que o modelo não se produziu em nossa investigação que usou ratos não selecionados surgindo, ao invés de lesões ateroscleróticas, modificações comparáveis às observadas na doença de Monckberg (mediosclerose) humana.

A idade dos ratos não influenciou a resposta aos fatores lesivos utilizados. Tanto os idosos quanto os jovens exibiram mesmos tipos de lesões anátomo-patológicas. Em nossa investigação, a suscetibilidade da parede arterial parece ser a mesma, ainda que se considerem faixas etárias diferentes. Este achado é diferente do observado por Nakamura e col<sup>10</sup> que concluíram que ratos idosos são mais suscetíveis por apresentarem alterações intrínsecas da íntima. Como os ratos usados em nossa investigação não foram selecionados e tinham a mesma idade é possível que as respostas não tenham sido as mesmas.

A análise dos dados bioquímicos mostrou que os níveis sanguíneos de colesterol total, TG e HDL-C não foram significativamente diferentes quando se

comparam animais idosos com jovens. Portanto, não foram observadas diferenças metabólicas em função da idade, o mesmo ocorrendo ainda que a ração contivesse ácido deidrocolico e vitamina D<sub>2</sub>. Contudo os animais que receberam apenas ácido deidrocolico tiveram níveis médios da colesterolemia significativamente mais elevados que os submetidos à ação associada da vitamina D<sub>2</sub>. É possível que a administração da vitamina tenha interferido na absorção do colesterol ou que determine maior metabolização do esteróide.

Nota-se que apesar dos níveis três vezes mais elevados da colesterolemia nos grupos 2 e 5 (ração hipercolesterólica + ácido deidrocolico), não foram observadas alterações sugestivas de aterosclerose, reafirmando a alta resistência da espécie ao desenvolvimento dessa afecção.

Em síntese: 1) a idade dos ratos não foi atribuído capaz de alterar a resposta metabólica, frente a modificações dietéticas sabidamente aterogênicas; 2) a vitamina D<sub>2</sub> parece interferir no metabolismo do colesterol sanguíneo; 3) ratos não selecionados tornados hipercolesterolêmicos, não desenvolveram aterosclerose, mas apenas acentuada mediosclerose se submetidos à ação da vitamina D<sub>2</sub>.

Nestas condições, os componentes usados (vitamina D<sub>2</sub>, ácido deidrocolico e colesterol) para obter aterosclerose em ratos não selecionados não atingiram os objetivos, apenas sendo obtido um modelo que reproduz a doença semelhante à mediosclerose de Monckberg.

## REFERÊNCIAS

1. Gillman R, Grant RA, Hathorn M—Histochemical and chemical studies of cal-ciferol induced vascular injuries Br J Exp Pathol, 1960; 41:1 18.
2. Mrhova O, Shimamoto T, Numano F—Metabolic effect of pyridinolcarbamato on the vascular wall of rats vvith hypervitaminosis D, Atherosclerosis, 1972; 16: 1-8.
3. Aubert D, Ferrand JC, Lacase B, Petin O, Pana KE, Podesta M—Atherogênese expérimetale chez le rat Wistar. Atherosclerosis, 1974; 20: 263-80.
4. McGill HC—Persistent problems in the pathogenesis of atherosclerosis. Arteriosclerosis, 1984; 4: 443-51.
5. Giannini SD, Sanchia FS, Ciry CGC—Aterosclerose experimental em ratos Wistar submetidos a dieta hipoproteica. Arq Bras Cardiol, 1980; 35: 47-51.
6. Wahlefeld R, Bergemeyer HV—Methoden er enzymatischen analyse. Weinheim: Verlag-chemie, 1974;1980.
7. Warnick GR, Albers JJ—A comprehensive evaluation of heparin manganese precipitation procedure for estimating high density lipoprotein cholesterol. J Lipid Res, 1978;19: 65-76.
8. Constantinides P—Experimental production of atherosclerosis through injury. In: Constantinides P. ed. Experimental Atherosclerosis. Amsterdam, Elsevier, 1965; 49-59.
9. Worshof—Animal models of atherosclerosis. In: Schettker G, Weisel A. eds. Atherosclerosis II, Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, 1974; 289.
10. Nakamura H, Izumiama N, Nakamura K, Ohtsubo K—Age— associated ultrastructural changes in the aortic intima of rats with diet-induced hypercholesterolemia. Atherosclerosis, 1989; 79: 101-11.