

## Aterosclerose Experimental em Coelho

### *Experimental Atherosclerosis in Rabbits*

Waleska C. Dornas<sup>1</sup>, Tânia T. de Oliveira<sup>2</sup>, Luis E. Franklin Augusto<sup>2</sup>, Tanus J. Nagem<sup>1</sup>

Universidade Federal de Ouro Preto<sup>1</sup>; Departamento de Bioquímica e Biologia Celular<sup>2</sup>; Universidade Federal de Viçosa<sup>3</sup>, Belo Horizonte, MG - Brasil

### Resumo

Numerosas pesquisas têm sido realizadas utilizando modelos experimentais para estudar o desenvolvimento da aterosclerose com dieta induzindo hiperlipidemia. Devido ao fato de que coelhos são muito sensíveis a dietas ricas em colesterol e acumulam grandes quantidades no plasma, a utilização destes animais como modelo experimental para avaliar o desenvolvimento de aterosclerose é de grande relevância, trazendo informação sobre fatores que contribuem para progressão e regressão aplicadas a situações humanas. Sendo assim, nessa revisão a função aterogênica do colesterol é mostrada em trabalhos que incluem o coelho como modelo experimental, uma vez que este animal tornou-se o mais popular modelo experimental de aterosclerose.

### Introdução

A importância de distúrbios de lipoproteínas plasmáticas e anormalidades no metabolismo lipídico caracterizadas por hiperlipidemia e/ou hipercolesterolemia como fator etiológico no desenvolvimento de doenças cardíacas coronarianas e aterosclerose potencial são, atualmente, cada vez mais apoiadas por considerável número de estudos populacionais e epidemiológicos<sup>1</sup>. Dieta induzindo hipercolesterolemia em coelhos tem sido largamente utilizada como modelo para estudar o desenvolvimento de aterosclerose humana.

A primeira investigação sobre indução experimental de aterosclerose ocorreu em 1908. Ignatowski, utilizando coelhos alimentados com leite, carne e ovo, observou espessamento da íntima em aortas. Em seguida, Lubarsch (1910, 1912) e Steimbiss (1913) foram capazes de desenvolver aterosclerose em aorta de coelhos com dietas que incluíam órgãos internos, como fígado, adrenal e músculo. Tais estudos, bem como outros, indicavam uma função causal de proteínas animais; entretanto, outros pesquisadores acreditavam que o fator que estabelecia aterosclerose como componente da dieta era o

colesterol e não as proteínas de tecido animal<sup>2</sup>.

Para avaliar a teoria da aterogênese a partir do colesterol, Clarkson e Newburgh (1926) alimentaram coelhos com dieta normal, aumentando para 25, 113, 253 ou 507 mg/dia de colesterol administrado em cápsula. Encontrou-se moderada aterosclerose em 71% dos coelhos alimentados com 507 mg/dia de colesterol por 47-87 dias. Meeker & Kesten (1940, 1941) dissolveram 60 ou 250 mg de colesterol em óleo vegetal e acrescentaram à dieta de coelhos por três meses. Os animais desenvolveram típicas lesões ateroscleróticas similares àquelas vistas em humanos, permanecendo, deste modo, a teoria de que o colesterol é o precursor para o desenvolvimento de doença vascular aterosclerótica<sup>3</sup>.

Para induzir hipercolesterolemia em animais, têm-se utilizado dietas contendo colesterol, as quais variam de rações comerciais suplementadas com níveis substancialmente diferentes de colesterol, assim como modificações nas porções de lipídio e carboidrato e nas diferentes fontes e conteúdos de gordura, contendo ou não ácido cólico<sup>4</sup>. Em nosso laboratório, temos produzido hipercolesterolemia em coelhos, com 1% de colesterol em rações comerciais em várias pesquisas, para investigarmos substâncias que podem ser viabilizadas, no futuro, como medicamentos no controle do metabolismo lipídico e no desenvolvimento de testes de potenciais terapias e diagnósticos entre diferentes procedimentos experimentais<sup>5-12</sup>.

Na presente revisão, o objetivo foi analisar criticamente o efeito hipercolesterolêmico de dieta rica em colesterol em estudos utilizando coelhos como modelo experimental a partir de investigações que possam levar a um melhor entendimento da biologia da aterosclerose para doença cardiovascular.

### Aterosclerose experimental

Para melhor entendimento da relação entre distúrbios do metabolismo de colesterol e aterogênese, manipulação dietética e a utilização de animais naturalmente com erros metabólicos, como coelhos Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL) e St Thomas Hospital (STH) para produzir hipercolesterolemia familiar e hiperlipidemia combinada à hipercolesterolemia, respectivamente, tem sido o foco de muitos experimentos. Atualmente, a tecnologia de deleção de gens tem permitido pesquisas a fim de produzir uma variedade de modelos de animais transgênicos com distúrbios de lipoproteínas e, a despeito dessa revolucionária descoberta, muitos desses animais geneticamente modificados têm sido alimentados com colesterol para acelerar aterogênese<sup>2</sup>.

### Palavras-chave

Aterosclerose, colesterol, hipercolesterolemia, coelhos.

Correspondência: Tanus Jorge Nagem •

Rua Tulipa, 357 - Esplanada - 30280-200 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
E-mail: tanus@ufop.br

Artigo recebido em 27/11/08; revisado recebido em 29/06/09; aceito em 24/08/09.

## Exposição ao colesterol plasmático e disfunção endotelial

O termo “disfunção endotelial”, que tem importante implicação no cuidado da doença cardiovascular, é empregado para descrever situações em que o endotélio perde sua propriedade vasoprotetora, representando a etapa inicial de vários processos de lesão vascular, como dano mecânico, hipercolesterolemia, aterosclerose e hipertensão arterial sistêmica<sup>13</sup>. Além disso, ocorre diminuição do relaxamento endotelial vascular para acetilcolina, causando vasoconstrição e queda do fluxo sanguíneo, como demonstrado por Sun e cols.<sup>14</sup> em coelhos alimentados com colesterol, visto que essa menor vasodilatação pode ser ocasionada pela presença de placas de lipídios na aorta.

Coelhos com 1% de suplementação de colesterol na dieta por 8-10 semanas apresentam prejudicada vasodilatação do endotélio na artéria carótida<sup>15</sup> e anormalidades na síntese do óxido nítrico (NO), demonstradas em vasos ateroscleróticos<sup>16</sup>. Considerando hiperlipidemia e aterosclerose, segmentos aórticos de coelhos hipercolesterolêmicos mostram redução significativa de óxido nítrico sintase (NOS) endotelial em relação aos animais-controle<sup>17</sup>. Vasquez-Vivar e cols.<sup>18</sup> relataram que BH4, um cofator para síntese de NO em aortas de coelhos com dieta induzindo hipercolesterolemia, foi acentuadamente reduzido quando comparado a coelhos normocolesterolêmicos. Radicais livres de oxigênio, como o ânion superóxido, podem modular a atividade de NO endógeno em coelhos hipercolesterolêmicos<sup>19,20</sup>. Interessantemente, isso demonstra que a expressão de NOS relatada em músculo liso vascular de coelhos hipercolesterolêmicos<sup>21,22</sup> não é capaz de dominar os defeitos na função vascular endógena.

O aumento de óxido nítrico basal e de vasodilatadores derivados do endotélio é visto em maior quantidade em anéis aórticos do endotélio de coelhos do sexo feminino do que em machos e depende da concentração de estradiol circulante<sup>23</sup>; portanto, fêmeas são menos inclinadas à dieta para indução de lesões ateroscleróticas do que machos, mas dependem do estado do endotélio arterial, como observado por Holm e cols.<sup>24</sup>. Estradiol inibe a adesão de monócitos sobre células endoteliais com migração transendotelial, componentes de uma resposta inflamatória que ocorre continuamente através do processo aterogênico após

hipercolesterolemia induzida em coelhos<sup>25</sup>.

O desenvolvimento de intervenções para inibir aterosclerose a partir de colesterol e a disfunção vascular têm recebido muita atenção devido a essa intensa associação. A depleção de L-arginina (um substrato para NOS) em modelos animais de aterosclerose e hipercolesterolemia induz agregação plaquetária, proliferação celular e acumulação de monócito vascular, ao passo que coelhos hipercolesterolêmicos tratados com L-arginina melhoram a vasorreatividade do endotélio-dependente, atenuando os mecanismos de lesão vascular<sup>26</sup> e inibindo a neoproliferação intimal<sup>27</sup>, que podem ser avaliados por vários marcadores propostos de células endoteliais (Tabela 1).

O fator de Von Willebrand foi estudado recentemente em coelhos com dieta rica em colesterol por 30 dias. Após a interrupção do tratamento, observou-se que a hipercolesterolemia induz o aumento deste fator, diminuindo após descontinuação da dieta rica em colesterol. Isso demonstra uma correlação positiva com formação de camada de gordura em ambas as fases do estudo, enquanto há um decréscimo dos níveis de fator de crescimento endotelial vascular, após cessar a dieta hipercolesterolêmica, podendo ser um mecanismo reparativo na prévia aterosclerose, o que pode também indicar dano celular endotelial<sup>28</sup>.

Avaliando os efeitos da hipercolesterolemia para identificar o risco de aterosclerose com proteína C-reativa (PCR), Sun e cols.<sup>29</sup> mostraram que PCR é frequentemente depositada em lesões ateroscleróticas em modelos com coelhos. Além disso, elevados níveis plasmáticos de PCR associam-se com a gravidade da hipercolesterolemia<sup>30</sup>.

O aumento na síntese de NO pode ser um mecanismo de defesa para compensar a inativação de NO e proteger contra fatores que representam dano ao organismo, com o nitrito como um potente metabólito correlacionado à formação de camadas de gordura, sendo examinado em curto e longo tempo em coelhos alimentados com colesterol<sup>31</sup>.

Paralelamente a essas aferições, constata-se que a função endotelial de segmentos vasculares é a alteração mais precoce na aterogênese. O comprometimento funcional da célula endotelial é demonstrado nas repercussões clínicas, como ocorrência de eventos subsequentes à progressão da formação de placa na íntima dos vasos (Figura 1).

**Tabela 1 - Alguns marcadores estruturais de disfunção endotelial**

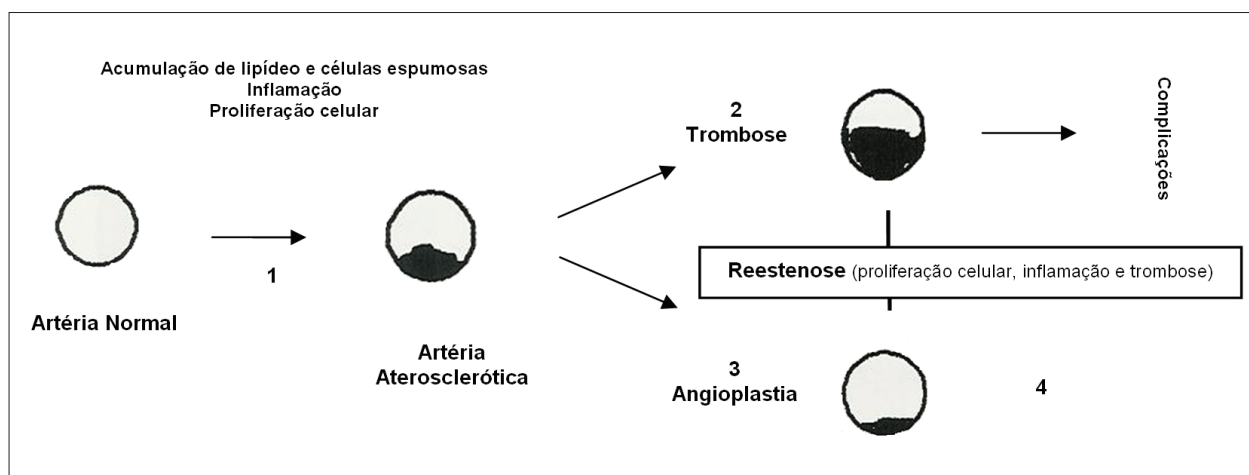
Óxido nítrico atua sobre vários processos implicados na patogênese da aterosclerose e trombose, como adesão plaquetária, formação de radicais livres, ativação de células polimorfonucleares, oxidação de lipoproteínas, mitogênese e proliferação de células de músculo liso vascular e da íntima, entre outros.

Fator de Von Willebrand é um componente existente na região subendotelial com função hemostática estimuladora da adesão plaquetária. Quando um vaso é rompido ocorre coagulação sanguínea em resposta à lesão endotelial e à adesão de plaquetas à superfície lesada do vaso, que ocorre através da ligação ao fator Von Willebrand.

Fator de crescimento vascular endotelial é um fator protetor vascular e funcional como regulador endógeno da integridade endotelial após lesão, sendo que seus receptores são regulados na inflamação e nas desordens proliferativas, como aterosclerose e reestenoses.

Proteína-C reativa é um marcador de inflamação sistêmica e sua elevação no plasma também está relacionada à presença e gravidade da aterosclerose arterial coronariana e ao aumento do risco de eventos agudos cardiovasculares. Corroborando essa ideia, a transição da angina estável para instável está associada ao aumento da atividade inflamatória, verificada pela elevação dos níveis plasmáticos de proteína C-reativa, citocinas e leucócitos.

Nitrito é um estável metabólito do óxido nítrico que tem sido relatado como bom marcador de produção endotelial de óxido nítrico, enquanto diminuída a bioatividade de NO. É conhecido como evento prévio em aterosclerose.



**Fig. 1** - Função da inflamação, proliferação de células musculares lisas e trombose em desenvolvimento de lesão aterosclerótica. Lesão endotelial e acumulação de lipídeo (LDL) podem iniciar processo aterogênico (1); Ativação de macrófagos e células espumosas produzem mitose que induzem migração de células musculares lisas na íntima e proliferação dessas células na íntima podem expor para eventos trombóticos (2); Artérias ocluídas podem ser abertas por balão de angioplastia (3); Esses vasos, podem ser re-ocluidos através de reestenose (4).

## Formação de placas ateroscleróticas

O modelo de coelho alimentado com colesterol é notável pelo rápido desenvolvimento de lesões aórticas e baixo custo para manutenção, sendo um regime típico para indução de aterosclerose envolvendo suplementação de 0,5% a 4% de colesterol por peso em aproximadamente 8 a 16 semanas. Nessas condições, coelhos tornam-se rapidamente hipercolesterolemicos (com colesterol plasmático > 1.000 mg/dl) e as lesões resultantes consistem primariamente de macrófagos derivados de células espumosas<sup>32</sup>. Contudo, a relação entre formação da lesão aterosclerótica e dieta induzindo hipercolesterolemia em coelhos é dependente de exposição cumulativa preferencialmente em nível de colesterol administrado, demonstrando em coelhos alimentados com 0,5% e 1,0% de colesterol graus similares de hipercolesterolemia induzida<sup>14</sup>. Alguns pesquisadores apoiam a sugestão de que a formação de lesões avançadas depende da idade do animal. Coelhos mais velhos, com 3-4,5 anos de idade, exibem placas fibróticas enquanto animais mais jovens (4 meses de idade) não apresentam lesões avançadas<sup>33</sup>.

Como coelhos têm sido utilizados vastamente para estudar o desenvolvimento de aterosclerose em humanos, o rápido desenvolvimento de lesões tem sido produzido com suplementação de colesterol na dieta (< 0,5%), alcançando hipercolesterolemia moderada com níveis de colesterol plasmáticos na faixa de 200 a 800 mg/dl<sup>34</sup>. Consequentemente, as lesões usualmente produzidas são topográfica e morfologicamente dissimilares àquelas vistas em humanos. Essa dissimilaridade é devida, em parte, ao fato de que humanos comumente não ingerem grandes quantidades de colesterol: em geral, têm níveis de colesterol plasmático que não excedem 800 mg/dl e processam e toleram o consumo de colesterol melhor do que coelhos. Somados a isso, experimentos de longo tempo em coelhos com dietas contendo grandes quantidades de colesterol são desencorajados devido à hepatotoxicidade e à falência do animal. Examinações revelam hepatomegalia com evidência

de estase biliar em nível de colesterol plasmático de  $3.257 \pm 266$  mg/dl<sup>32</sup>. Contudo, a despeito dessas restrições, grande número de pesquisas usa esse modelo para testar a eficiência de fármacos no desenvolvimento de camadas de gordura.

Lesões ateroscleróticas são compostas por três componentes maiores. O primeiro é o componente celular, que predominantemente compreende células musculares lisas e macrófagos. O segundo componente é o tecido conectivo matriz e lipídio extracelular. O terceiro componente é o lipídio intracelular, que se acumula dentro de macrófagos, convertendo-se, então, em células espumosas<sup>35</sup>. Em prévios eventos celulares, tem sido observada a presença de leucócitos aderidos ao arco aórtico torácico e abdominal de coelhos após três semanas de dieta enriquecida com 0,2% de colesterol. Por 3-5 semanas com a mesma dieta, numerosas células espumosas são encontradas no espaço subendotelial e constituem o desenvolvimento de camadas de gordura na mesma localização em que monócitos aderentes foram observados anteriormente<sup>36</sup>.

Em aorta, vários tipos de placas de camadas de gordura a lesões ateromatosas são observados em modelo experimental, dependendo do grau de consumo de colesterol. Dietas contendo < 0,15% de colesterol resultam em desenvolvimento de lesões de camada de gordura, enquanto placas ateromatosas são mais encontradas com alta quantidade de colesterol na dieta<sup>32</sup>.

O grau de aterosclerose em coelhos tende a ser maior na aorta abdominal do que na torácica, o que pode ser explicado devido ao efeito hemodinâmico ou pelo fato de que a aorta abdominal de coelhos diminui gradualmente abaixo na bifurcação aórtica. Dessa forma, a aorta mais distal pode ter mais lesão em relação à aorta proximal<sup>37</sup>. Mudanças ateromatosas com 8 semanas em coelhos alimentados com colesterol são formadas na aorta torácica e, então, estendem para a aorta abdominal, artéria coronária e outros vasos, predominando lesões concêntricas na aorta torácica e na porção proximal da artéria coronária em contraste com

aterosclerose branda produzida nas artérias renal, carótida e femoral na 15ª semana da dieta<sup>38</sup>. Não fica claro, todavia, neste estudo, o quanto a exposição com colesterol influenciou o tipo de lesão.

A extensão da aterosclerose em aorta de coelhos pode ser quantificada pela superfície de lesões sudanofílicas<sup>39</sup> e por análise imuno-histoquímica<sup>40</sup>. Recentemente, ressonância magnética de imagem (RMI) não invasiva tem sido usada no estudo de lesões vasculares. Quantificação em RMI e mudanças na composição de placas ateroscleróticas podem ser usadas com RMI para monitorar a progressão e regressão da aterosclerose *in vivo*. O método é vantajoso devido ao fato de que estudos em série podem ser realizados em resposta para terapias intervencionais<sup>41</sup>.

Já a avaliação histológica pela taxa de estenose é um importante método para avaliar a gravidade da aterosclerose coronariana, pois a taxa de estenose é diretamente considerada reflexo da condição clínica. Por outro lado, o método de avaliação através da observação macroscópica em coronárias ateroscleróticas em coelhos tem algumas vantagens em relação a métodos histológicos, uma vez que a análise da área da lesão pode ser concluída dentro de um curto tempo, enquanto toda a imagem da distribuição da aterosclerose pode ser facilmente entendida. Quando seções de tecidos de lesões ateroscleróticas coronarianas são necessárias, pode-se retirar somente a parte da placa aterosclerótica, observada macroscopicamente sobre a superfície luminal da artéria coronária<sup>42</sup>.

A lesão vascular tem participação importante nos desordens cardiovasculares, embora a participação da hipercolesterolemia em eventos tromboembólicos seja ainda pouco entendida, necessitando ser melhor conhecida.

## Ruptura de placa e trombose

A ruptura da placa aterosclerótica é reconhecida como a maior causa de trombose e subsequentes manifestações clínicas de aterosclerose como angina instável, infarto miocárdial e derrame além de, também, consistir um alvo para intervenção clínica<sup>43-45</sup>. Entretanto, é ainda difícil prever quando a ruptura de placa ocorrerá já que o estímulo fisiológico adicional requerido para causar o evento é desconhecido. Os mecanismos de ruptura de placa posterior e formação de subsequentes trombos oclusivos não são ainda muito claros. Ademais, também não é evidente se a placa sem acompanhamento de trombo pode causar ou não eventos cardíacos<sup>44</sup>. Duas hipóteses principais têm sido propostas como causas para ruptura de placa (Tabela 2).

**Tabela 2 - Causas para ruptura de placa aterosclerótica**

A primeira é que a ruptura é o resultado da perda de células musculares lisas, podendo ser este o principal produtor de colágeno estabilizador de cápsula causado por apoptose, que pode ser mediado pela interação entre células de músculo liso e monócitos/macrófagos. A segunda hipótese é que a ruptura de placa é o resultado de um desequilíbrio entre a produção de colágeno estabilizador de placa por um lado e a ação de enzimas corrosivas por outro. Essas enzimas estão presentes em forma de metaloproteinasas, as quais são derivadas principalmente de macrófagos e catepsinas, que rompem a cobertura da placa, rica em colágeno. Além disso, inflamação também participa da ruptura de placa através da elaboração de proteínas pró-coagulantes.

Há vários modelos animais de ruptura de placa que têm sido relatados nos últimos anos. Comumente em coelhos alimentados com colesterol, usa-se induzir a lesão a partir de um balão injetado parenteralmente com veneno de víbora Russell e histamina, procedimento este que resultará em ruptura de placa e trombose<sup>37</sup>. Outro modelo é o de coelhos alimentados com colesterol, com implantação de cateter com balão em aorta torácica. O balão é inflado após a lesão aterosclerótica formar-se ao redor deste, ocasionando ruptura de lesão e trombose<sup>46</sup>. Entretanto, ambos os modelos conduzem para casos agudos provocados mecanicamente em pesquisas. Assim, o valor desses modelos para estudo sobre apoptose celular, inflamação, aumento de lipídios e degradação de cápsula fibrosa é limitado devido a acentuadas e diferentes características das placas formadas nesses modelos comparados às placas encontradas naturalmente em humanos, uma vez que a lesão está restrita à região subendotelial, mantendo a integridade da lâmina elástica interna<sup>47</sup>.

A placa aterosclerótica não é uma estrutura estática. Preferencialmente, seu status em qualquer momento é o resultado de uma interação complexa e dinâmica de um grande número de fatores celulares e humorais<sup>48</sup>. A desestabilização de placa determinada pela quebra de colágeno, com perda local de fonte celular de síntese de colágeno, foi vista em coelhos por Reikter e cols.<sup>49</sup>. Eles demonstraram um decréscimo do conteúdo de colágeno total em placas ricas em lipídios tempo dependente, enquanto o nível de ligação cruzada não diferiu entre alto e baixo consumo de colesterol nos grupos. Uma ligação mecânica entre hipercolesterolemia e perda de colágeno é ainda hipotética, embora uma função crítica de macrófagos e outras enzimas proteolíticas têm sido fortemente sugeridas.

Dieta induzindo hipercolesterolemia em coelhos aumenta seletivamente a formação de trombo e embolização em arteríolas, mas não em veias. A observação de que o aumento de colesterol plasmático total resulta principalmente em aumento de colesterol LDL sugere que os efeitos observados da hipercolesterolemia sobre tromboembolismo arteriolar sejam causados pelo LDL e que a estimulação de produção de NO endógeno como estimulado por excesso de L-arginina seja capaz de antagonizar esse acréscimo do colesterol, acentuando tromboembolismo arteriolar<sup>50</sup>.

Se um trombo é oclusivo, ele conduzirá para infarto do miocárdio<sup>45</sup>. Como ruptura de placa é a principal complicação clínica, a estabilização da placa é crucial e a diminuição de lipídios pela manipulação dietética mostrou reduzir significativamente a atividade proteolítica e o aumento do conteúdo de colágeno de aterosoma estabelecido em coelhos<sup>51</sup>. O grau substancial de benefício clínico parece ser não proporcional à melhora da estenose produzida por redução do consumo de lipídio, estabilizando a placa ateromatosa pela redução nos níveis de atividade de proteinases, que podem degradar componentes estruturais da matriz extracelular arterial<sup>51</sup>. Dessa forma, reforça-se a habilidade da placa em resistir à ruptura.

A administração de fatores de crescimento angiogênicos é uma interessante nova terapêutica para doença cardíaca isquêmica. O fator de crescimento de fibroblastos promove reparo vascular e angiogênese, induzindo expressão de fator

tecidual em monócitos circulantes e na parede vascular em coelhos normais e hipercolesterolêmicos<sup>52</sup>.

Segundo Abela e cols.<sup>53</sup>, o modelo de coelhos com lesões arteriais que desenvolvem trombose após dano arterial mecânico e dieta rica em colesterol ocasiona placa vulnerável para ruptura e trombose, sendo capaz de ser usado para testar agentes farmacológicos que possam reduzir o desenvolvimento de placas ateroscleróticas vulneráveis ou quantidade de trombos formados. Agentes redutores de lipídios, antioxidantes, bloqueadores de canal de cálcio e inibidores da enzima conversora de angiotensina, além de fármacos antiplaquetários e antitrombóticos, podem ser testados para avaliar a habilidade de reduzir a quantidade de trombos. No entanto, a ruptura espontânea da placa não ocorre nesses modelos, embora o estímulo desencadeador possa provocar trombose arterial. Lesões produzidas nesses animais por lesão mais lipídico formam cápsulas fibrosas constituídas por células musculares lisas. O ateroma humano, tipicamente formado por décadas, pode ter aspectos não parecidos ao obtido em tempo relativamente curto em experimentos com coelho<sup>51</sup>.

### Regulação metabólica em coelhos hipercolesterolêmicos

O coelho é uma espécie animal que tem vários aspectos similares aos dos humanos em relação ao metabolismo de lipoproteínas, exceto pela deficiência de lipase hepática<sup>54</sup>. Várias características dos coelhos fazem deles um excelente modelo para avaliar os efeitos dos transgenes humanos sobre metabolismo de lipoproteínas e susceptibilidade para aterosclerose: 1) lipoproteínas contendo apoB são similares àquelas vistas em humanos<sup>55</sup>; 2) fígado de coelhos produz VLDL contendo apoB-100, como em humanos<sup>56</sup>; 3) abundância de proteína de transferência de ésteres no plasma de coelhos<sup>57</sup>.

Pelo menos 4 mecanismos são responsáveis pela homeostase do colesterol e afetam as concentrações de colesterol plasmático (Tabela 3).

Em coelhos, a atividade da 7 $\alpha$ -hidroxilase e níveis de mRNA são inibidos após dieta hipercolesterolêmica com níveis de colesterol plasmático substancialmente elevados<sup>58</sup>. Entretanto, Overturf e cols.<sup>59</sup> descobriram que, alimentando coelhos com 0,1% de suplementação de colesterol por 7 meses, não produziram hipercolesterolemia, ao passo

que aumentando gradualmente o consumo de colesterol dietético, aumentou-se o tamanho do *pool* de ácidos biliares inversamente à atividade da 7 $\alpha$ -hidroxilase<sup>60</sup>.

A excreção de ácidos biliares aumenta a taxa do *clearance*, o qual diminui a concentração efetiva do colesterol intracelular, inibindo que o colesterol exerça influência sobre a expressão do receptor de LDL, já que os ácidos biliares são predominantemente reabsorvidos pela circulação êntero-hepática e retornam ao fígado para exercer controle de retroalimentação negativa sobre a enzima 7 $\alpha$ -hidroxilase e para regular o metabolismo do colesterol<sup>61</sup>.

Ácidos biliares são conhecidos por serem reabsorvidos no intestino por mecanismos passivos e ativos. Passivamente, o consumo ocorre via não iônica, iônica e difusão de micelas conjugadas ou não conjugadas a ácidos biliares e, ativamente, a absorção saturável ocorre via Na<sup>+</sup> dependente de ácidos biliares conjugados contra o gradiente de concentração. Várias espécies, incluindo coelhos, demonstram possuir ambos os processos de reabsorção de ácidos biliares<sup>62</sup>. E, no entanto, devido à natureza hidrofílica relativa de ácidos biliares conjugados porém, sofrem uma reabsorção intestinal passiva mínima devido à natureza hidrofílica relativa de ácidos biliares conjugados. O sítio primário de reabsorção de ácido biliar predominantemente é mediado por co-transportador ácido biliar Na<sup>+</sup>/bile ileal (ABST) e, a interrupção da circulação êntero-hepática dos ácidos biliares pela atenuação da reabsorção de ácidos biliares intestinais é considerada uma das melhores vias de redução dos níveis de colesterol plasmático<sup>62</sup>. Higaki e cols.<sup>63</sup> demonstraram com inibidor de ABST redução das quantidades de retorno de ácido biliar para o fígado e aumento da conversão de colesterol para ácido biliar em coelhos alimentados com colesterol.

O efeito inibitório do colesterol dietético sobre 7 $\alpha$ -hidroxilase em coelhos pode ajudar a explicar porque alguns indivíduos são mais sensíveis ao colesterol na dieta e aumentam as concentrações plasmáticas. Esses indivíduos podem responder a dieta hipercolesterolêmica com diminuída síntese de ácido biliar contribuindo para elevar os níveis de colesterol plasmáticos e reduzir os receptores de LDL. Alternativamente, outras pessoas respondem para dieta rica em colesterol com a síntese de ácido biliar sendo estimulada e, assim, os níveis de colesterol plasmáticos não aumentam. Identificando esses indivíduos, pode-se ajudar a esclarecer seu risco aterogênico e, assim, usar recomendações dietéticas mais sensíveis para o tratamento<sup>58</sup>.

### Considerações finais

Considerando que a prevalência de aterosclerose e doença cardíaca isquêmica está aumentando no mundo, ocasionando sérias consequências clínicas que exigem esforços para melhorar o conhecimento de sua patogênese, entende-se que é necessário buscar melhorias nas técnicas experimentais e nos novos tratamentos para essas condições, com avanços no uso de modelos experimentais.

Nesse sentido, o coelho como modelo experimental é uma importante ferramenta para o estudo da aterosclerose entre os animais que têm sido utilizados nas investigações científicas. Representa, dentre os animais estudados, o único que tem

**Tabela 3 - Mecanismos responsáveis pela homeostase do colesterol**

a) Síntese através do acetato como regulador pela formação de ácido mevalônico para 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A que é catalisada pela enzima taxa limitante HMG-CoA redutase;

b) Expressão de receptores LDL, especialmente no fígado, onde mais da metade dos receptores estão localizados, com diminuição do colesterol plasmático acompanhado pela redução dos níveis de LDL;

c) Consumo dietético de colesterol;

d) Transformação do colesterol em ácido biliar, a maior via catabólica para colesterol que, regulada pela formação da 7  $\alpha$ -hidroxicolesterol, é catalisada pela enzima 7 $\alpha$ -hidroxilase.

tendência para exibir hipercolesterolemia pela acumulação de colesterol exógeno com poucos dias de altas concentrações na dieta, já que não pode aumentar a excreção de esteróis. No entanto, cuidadosas extrapolações devem ser realizadas em relação ao grau de hipercolesterolemia produzido em animais de laboratório, uma vez que excedem o que usualmente encontramos em humanos. Limitações e avanços devem ser discutidos para que possam contribuir e elucidar os conhecimentos sobre etiologia, fisiopatologia e tratamento da aterosclerose com a caracterização dessas descobertas.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro e bolsa de

pesquisa e à Rede Mineira de Toxicologia e Farmacologia - TOXIFAR da Fapemig.

## Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPEMIG.

## Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Waleska Cláudia Dornas pela Universidade Federal de Ouro Preto.

## Referências

1. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Sociedade Brasileira de Endocrinologia. II Consenso Brasileiro sobre dislipidemias. Detecção, avaliação e tratamento. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 1999; 43: 287-305.
2. Moghadasian MH. Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life Sci.* 2002; 70 (8): 855-65.
3. Kritchevsky D. Dietary protein, cholesterol and atherosclerosis: a review of the early history. *J Nutr.* 1995; 125 (3): 587S-593S.
4. Lichtman AH, Clinton SK, Iyama K, Connelly PW, Libby P, Cybulsky MI. Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice fed defined semipurified diets with and without cholate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19 (8): 1938-44.
5. Percegoni N, Oliveira TT, Nagem TJ, Lima LRP, Lima EQ, Matta SLP. Efeito de caseína, proteína isolada de soja e colestiramina em coelhos hiperlipidêmicos. *Rev Cienc Farm.* 2004; 25: 99-110.
6. Oliveira TT, Nagem TJ, Pinto AS, Lopes RM, Camini NA, Leão MA, et al. Ação de quitosana e naringenina em coelhos hiperlipidêmicos. *Rev Portuguesa de Farmácia.* 2001; 1: 43-8.
7. Lima LRP, Oliveira TT, Nagem TJ, Pinto AS, Stringheta PC, Tinoco ALA, et al. Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2001; 38 (4): 196-200.
8. Lima LRP, Oliveira TT, Nagem TJ, Pinto AX, Tinoco ALA, Silva JF, et al. Ação terapêutica e inocuidade no metabolismo de quercetina, bixina e norbixina em coelhos hiperlipidêmicos. *Tecnol Cien Agropec.* 2008; 2 (1): 51-6.
9. Lima LRP, Oliveira TT, Nagem TJ, Pinto AS, Oliveira MGA, Tinoco ALA, et al. Rutina e bixina do urucum e suas ações hipolipidêmicas em coelhos. *Rev Bras Farm.* 2000; 81 (3): 58-62.
10. Lima LRP, Oliveira TT, Nagem TJ. Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. *Rev Nutr.* 2003; 16 (3): 305-14.
11. Lima LRP, Oliveira TT, Nagem TJ, Pinto AS, Oliveira MGA, Tinoco ALA, et al. Controle de hiperlipidemia em coelhos tratados com flavonóides e corantes naturais do urucum. *Rev Acta Farmacêutica Boanarense (Buenos Aires).* 2001; 20 (1): 53-7.
12. Virtuoso LS, Oliveira TT, Nagem TJ, Pinto AS, Tinoco ALA. Efeitos de rutina, colestiramina e betalaína no controle de lipídeos em soros de coelhos hiperlipidêmicos. *Rev Bras Anal Clin.* 2001; 33 (2): 85-9.
13. Iturry-Yamamoto G, Alves AA, Picon PD. Propriedades anti-aterogênicas do fator relaxante derivado do endotélio (óxido nítrico). *Arq Bras Cardiol.* 1997; 69 (5): 349-57.
14. Sun YP, Lu NC, Parmley WW, Hollenbeck CB. Effects of cholesterol diets on vascular function and atherogenesis in rabbits. *Exp Biol Med.* 2000; 224 (3): 166-71.
15. Laight DW, Matz J, Caesar B, Carrier MJ, Anggard EE. Investigation of endogenous nitric oxide vascular function in the carotid artery of cholesterol-fed rabbits. *Br J Pharmacol.* 1996; 117 (7): 1471-4.
16. Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24 (6): 998-1005.
17. Jiménez A, Arriero MM, López-Blava A, González-Fernandez F, Garcia R, Fortes J, et al. Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression in the vascular wall and in mononuclear cells from hypercholesterolemic rabbits. *Circulation.* 2001; 104 (15): 1822-30.
18. Vasquez-Vivar J, Duquaine D, Whittett J, Kalyanaraman B, Rajagopalan S. Altered tetrahydrobiopterin metabolism in atherosclerosis: implications for use of oxidized tetrahydrobiopterin analogues and thiol antioxidants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22 (10): 1655-61.
19. Harrison DG, Ohara Y. Physiologic consequences of increased vascular oxidant stresses in hypercholesterolemia and atherosclerosis: implications for impaired vasomotion. *Am J Cardiol.* 1995; 75 (6): 75B-81B.
20. Matz J, Andersson TLC, Ferns GAA, Anggard EE. Dietary vitamin E increases the resistance to lipoprotein oxidation and attenuates endothelial dysfunction in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis.* 1994; 110 (2): 241-9.
21. Verbeuren TJ, Bonhomme E, Lbie M, Simonet S. Evidence for induction of a non-endothelial NO synthase in aortas of cholesterol-fed rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993; 21 (5): 841-5.
22. Pomerantz KB, Hajjar DP, Levi L, Gross SS. Cholesterol enrichment of arterial smooth muscle cells upregulates cytokine-induced nitric oxide synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 191 (1): 103-9.
23. Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89 (23): 11259-63.
24. Holm P, Andersen HL, Arroe G, Stender S. Gender gap in aortic cholesterol accumulation in cholesterol-clamped rabbits: role of the endothelium and mononuclear-endothelial cell interaction. *Circulation.* 1998; 98 (24): 2731-7.
25. Nathan L, Pervin S, Singh R, Rosenfeld M, Chaudhuri G. Estradiol inhibits leukocyte adhesion and transendothelial migration in rabbits in vivo: possible mechanisms for gender differences in atherosclerosis. *Circ Res.* 1999; 85 (4): 377-85.
26. Nematbakhsh M, Haghjooyanmard S, Mahmoodi F, Monajemi AR. The prevention of endothelial dysfunction through endothelial cell apoptosis inhibition in a hypercholesterolemic rabbit model: the effect of L-arginine supplementation. *Lipids Health Dis.* 2008; 7: 27.
27. Knopfholz J, Précoma DB, Brofman PRS, Bier GE, da Silva RFKC, Silva APK,

- et al. Efeito da L-arginina na neoproliferação intimal e no remodelamento arterial após lesão por balão, em ilíacas de coelhos hipercolesterolêmicos. *Arq Bras Cardiol.* 2006; 87: 520-4.
28. Haghjooyjavanmard S, Nematbakhsh M, Monajemi A, Soleimani M. Von Willebrand factor, C-reactive protein, nitric oxide, and vascular endothelial growth factor in a dietary reversal model of hypercholesterolemia in rabbit. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2008; 152 (1): 91-5.
29. Sun H, Koike T, Ichikawa T, Hatakeyama K, Shiomi M, Zhang B, et al. C-reactive protein in atherosclerotic lesions: its origin and pathophysiological significance. *Am J Pathol.* 2005; 167 (4): 1139-48.
30. Hernández LR, Lundberg U, Arocha-Piñango CL. Experimental thrombosis I: relation with fibrinogen and other haemostatic parameters. *Thromb Res.* 2000; 99 (3): 295-305.
31. Minor RL, Myers PR, Guerra R Jr, Bater JN, Harrison DG. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J Clin Invest.* 1990; 86 (6): 2109-16.
32. Kolodgie FD, Katocs AS Jr, Largini EE, Wrenn SM, Cornhill JF, Herderick EE, et al. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol: methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16 (12): 1454-64.
33. Spagnoli LG, Orlandi A, Mauriello A, Santeusano G, de Angelis C, Lucreziotti R, et al. Aging and atherosclerosis in the rabbit. 1. Distribution, prevalence and morphology of atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis.* 1991; 89 (1): 11-24.
34. Holvoet P, Collen D. Beta-VLDL hypercholesterolemia relative to LDL hypercholesterolemia is associated with higher levels of oxidized lipoproteins and a more rapid progression of coronary atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17 (11): 2376-82.
35. Crowther MA. Pathogenesis of atherosclerosis. *Hematology.* 2005: 436-41.
36. Rosenfeld ME, Tsukada T, Gown AM, Ross R. Fatty streak initiation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis.* 1987; 7 (1): 9-23.
37. Johnstone MT, Botnar RM, Perez AS, Stewart R, Quist WC, Hamilton JA, et al. In vivo magnetic resonance imaging of experimental thrombosis in a rabbit model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21 (9): 1556-60.
38. Kamimura R, Suzuki S, Sakamoto H, Miura N, Misumi K, Miyahara K. Development of atherosclerotic lesions in cholesterol-loaded rabbits. *Exp Anim.* 1999; 48 (1): 1-7.
39. Staprans I, Pan X-M, Rapp JH, Feingold KR. Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18 (6): 977-83.
40. Nakazato K, Ishibashi T, Shindo J, Shiomi M, Maruyama Y. Expression of very low density lipoprotein receptor mRNA in rabbit atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1996; 149 (6): 1831-8.
41. Helft G, Worthley SG, Fuster V, Fayad ZA, Zaman AG, Corti R, et al. Progression and regression of atherosclerotic lesions: monitoring with serial noninvasive magnetic resonance imaging. *Circulation.* 2002; 105 (8): 993-8.
42. Kitajima S, Sakuma S, Morimoto M. Macroscopic distribution of coronary atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. *Exp Anim.* 1998; 47 (4): 221-7.
43. Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17 (10): 1859-67.
44. Shiomi M, Ito T, Yamada S, Kawashima S, Fan J. Correlation of vulnerable coronary plaques to sudden cardiac events: lessons from a myocardial infarction-prone animal model (the WHHLMI rabbit). *J Atheroscler Thromb.* 2004; 11 (4): 184-9.
45. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation.* 1995; 91 (11): 2844-50.
46. Rekhter MD, Hicks GW, Brammer DW, Work CW, Kim JS, Gordon D, et al. Animal model that mimics atherosclerotic plaque rupture. *Circ Res.* 1998; 83 (7): 705-13.
47. Uint L, Laurindo FR, Lopes EA, Da-Luz PL. Balloon-induced endothelial denudation promotes deep injury of the arterial wall. *Braz J Med Biol Res.* 1989; 22 (7): 913-5.
48. Cullen P, Baetta R, Bellosta S, Bernini F, Chinetti G, Cignarella A, et al. MAFAPS Consortium. Rupture of the atherosclerotic plaque: does a good animal model exist? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23 (4): 535-42.
49. Rekhter MD, Hicks GW, Brammer DW, Hallak H, Kindt E, Chen J, et al. Hypercholesterolemia causes mechanical weakening of rabbit atheroma. *Circ Res.* 2000; 86 (1): 101-8.
50. Broeders MA, Tangelder GJ, Slaaf DW, Reneman RS, Oude Egbrink MG. Hypercholesterolemia enhances thromboembolism in arterioles but not venules: complete reversal by L-arginine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22 (4): 680-5.
51. Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic SJ, Clinton SK, Brinckerhoff CE, et al. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation.* 1998; 97 (24): 2433-44.
52. Corseaux D, Meuride T, Six I, Rugeri L, Ezekowitz MD, Rouvier P, et al. Basic fibroblast growth factor increases tissue factor expression in circulating monocytes and in vascular wall. *Circulation.* 2000; 101 (16): 2000-6.
53. Abela GS, Picon PD, Friedl SE, Gebara OC, Miyamoto A, Federman M, et al. Triggering of plaque disruption and arterial thrombosis in an atherosclerotic rabbit model. *Circulation.* 1995; 91 (3): 776-84.
54. Moghadasian MH, Frohlich JJ, McManus BM. Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis. *Lab Invest.* 2001; 81 (9): 1173-83.
55. Chapman MJ. Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects. *J Lipid Res.* 1980; 21: 789-853.
56. Greeve J, Altkemper I, Dieterich J-H, Greten H, Windler E. Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing lipoproteins. *J Lipid Res.* 1993; 34: 1367-83.
57. Nagashima M, McLean JW, Lawn RL. Cloning and mRNA tissue distribution of rabbit cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res.* 1988; 29: 1643-9.
58. Xu G, Salen G, Shefer S, Ness GC, Nguyen LB, Parker TS, et al. Unexpected inhibition of cholesterol 7 alpha-hydroxylase by cholesterol in New Zealand white and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J Clin Invest.* 1995; 95 (4): 1497-504.
59. Overturf ML, Smith SA, Hewett-Emmett D, Loose-Mitchell DS, Soma MR, Gotto AM Jr, et al. Development and partial metabolic characterization of a dietary cholesterol-resistant colony of rabbits. *J Lipid Res.* 1989; 30 (2): 263-73.
60. Xu G, Shneider BL, Shefer S, Nguyen LB, Batta AK, Tint GS, et al. Ileal bile acid transport regulates bile acid pool, synthesis, and plasma cholesterol levels differently in cholesterol-fed rats and rabbits. *J Lipid Res.* 2000; 41 (2): 298-304.
61. Poorman JA, Buck RA, Smith SA, Overturf ML, Loose-Mitchell DS. Bile acid excretion and cholesterol 7 alpha-hydroxylase expression in hypercholesterolemia-resistant rabbits. *J Lipid Res.* 1993; 34 (10): 1675-85.
62. Aldini R, Ussia G, Roda A, Cilioni CG, Rizzoli R, Calcaterra D, et al. Evaluation of the ileal absorption capacity for bile acids in the rabbit. *Eur Surg Res.* 1990; 22 (2): 93-100.
63. Higaki J, Hara S, Takasu N, Tonda K, Miyata K, Shike T, et al. Inhibition of ileal Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter by S-8921 reduces serum cholesterol and prevents atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18 (8): 1304-11.