11ª Jornada Científica e Tecnológica do IFSULDEMINAS & 8º Simpósio de Pós-Graduação

Fator genético e alimentar são determinantes no processo inflamatório da aorta de camundongos knockout para receptor de LDL (LDLr-/-).

Maria G. S. CARVALHO [1]; Bethânia E. COSTA [1]; Vanessa C. TEIXEIRA [1]; Samuel J. F. LIMA [1]; Carlos R. PEREIRA [2]; Jéssica L. C. AMARAL [3]; Leandro SANTOS [4]; José A. D. GARCIA [5].

RESUMO

Fatores alimentares e/ou genéticos são fatores que promovem e sustentam a hipertrofia cardíaca em camundongos para gene do receptor de (LDLR -/-) por processo inflamatório, via CD40L. O objetivo neste estudo foi avaliar o processo inflamatório e as alterações morfológicas na parede da artéria aorta em camundongos LDLr-/- alimentados com dieta padrão e hiperlipídica, e comparar estes resultados com os dos camundongos selvagens. Os animais foram divididos em três grupos experimentais: WT (n=5), camundongos selvagens, receberam ração comercial por 15 dias; S (n=5), camundongos LDLr-/- que receberam ração comercial; Grupo HL (n=5), camundongos LDLr-/- que receberam ração hiperlipídica. Em conclusão, as lesões observadas na artéria aorta mostraram que a deleção do gene do receptor de LDL está entre os fatores de risco da aterosclerose, e sua associação com a dieta hiperlipídica aumenta o risco por mecanismos que envolvem o papel inflamatório e pró-aterogênico do CD40L.

Palavras-chave: Dieta hiperlípidica; Colágeno; Lesões.

1. INTRODUÇÃO

Aterosclerose é uma doença inflamatória da parede arterial (ROSS, 1999). Hiperlipidemia, hipertensão, tabagismo e diabetes são fatores de riscos cardiovasculares que induzem ao estresse oxidativo disfunção endotelial e processo inflamatório (LIBBY et al., 2002) no ambiente vascular. Esta trilogia tem sido considerada como o denominador comum dentre os mecanismos que promovem e sustentam a aterogênese.

Há concordância de que camundongos *knockout* para ApoE (apolipoproteína E) ou para o receptor de LDL podem desenvolver lesões que compartilham aspectos semelhantes às lesões humanas avançadas (JOHNSON e JACKSON, 2001; SONG et al., 2001).

No presente estudo avaliamos o processo inflamatório e as alterações morfológicas na parede da artéria aorta em camundongos LDLr-/- alimentados com dieta padrão e hiperlipídica, e comparamos estes resultados com os dos camundongos selvagens (wild type).

[1]Discentes do programa de pós-graduação em Reprodução, Sanidade e Bem Estar Animal – UNIFENAS. E-mail: maria h_roots@hotmail.com; bethaniaelias@hotmail.com; nessa_coelho@hotmail.com; samuelfvet@hotmail.com
[2]Discente do programa de pós-graduação em Ciências dos Alimentos – IFSULDEMINAS - *Campus* Machado. E-mail: c arlosrp12@yahoo.com.br
[3]Discente do curso em Licenciatura em Ciências Biológicas - IFSULDEMINAS – *Campus* Machado. E-mail: amaral.jes sy@yahoo.com.br
[4]Docente, Universidade Federal Rural do Pernambuco. E-mail: leandro.santos2@ufrpe.br
[5]Orientador, IFSULDEMINAS – *Campus* Machado. E-mail: jose.garcia@ifsuldeminas.edu.br

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em camundongos selvagens (cepa C57BL6) e em camundongos homozigotos para a ausência do gene do receptor de LDL (LDLr-/-) gerados no *background* C57BL6. Neste estudo utilizamos camundongos machos com 3 meses de idade, pesando 23 ± 3g. O uso dos animais e o protocolo experimental foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB - UNICAMP sob processo número 521-1.

Os camundongos foram divididos em 3 grupos experimentais. Grupo WT (n=5), camundongos selvagens os quais receberam ração comercial por 15 dias; Grupo S (n=5), camundongos LDLr-/- que receberam ração comercial por 15 dias; Grupo HL (n=5), camundongos LDLr-/- que receberam ração hiperlipídica por 15 dias.

Os camundongos foram anestesiados por via intraperitonial utilizando-se Xilazina/Ketamina na concentração de 6/40 mg/Kg, respectivamente. A toracotomia foi então realizada e o coração e a aorta foram removidos. Foram realizados corte de 10µm e corados com *Oil Red* e contra corados com *Light Green* e Hematoxilina de Harris.

Os arcos aórticos foram removidos e incluídos em parafina para cortes histológicos de 4µm de espessura, segundo Junqueira et al*.,* (1979), para análise imunoistoquímica e morfométrica.

Após contra coloração com Hematoxilina de Harris por 25 segundos as lâminas foram montadas e analisadas em microscópio óptico em um aumento de 400x.

Para análises das alterações morfológicas e para morfometria das artérias os cortes histológicos da aorta foram corados com hematoxilina/eosina e fotografados em aumentos de 100 e 400x. A medida das áreas luminal, média e íntima foram realizadas pelo software LGMC-image versão 1.0.

Cortes histológicos foram corados com Picrosírius Red e Tricrômico de Masson para análise quantitativa do colágeno utilizando-se a câmara digital acoplada ao programa Leica IM50 (versão 1.20). Os cortes corados com Picrosírius Red foram analisados com luz polarizada. Cada fotomicrografia foi analisada pelo software LGMC-image versão 1.0. As porcentagens de colágeno foram quantificadas das áreas média e íntima da parede das artérias e área total incluindo a área adventícia.

Os dados foram expressos como média ± EPM. Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste Tukey foi utilizada para comparar as médias entre diferentes grupos. Consideramos as diferenças significativas quando o valor de $p< 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os Camundongos S mostraram coloração positiva quando comparado com WT, revelando discretas áreas de depósito de lipídeo no segmento aórtico valvular. Contudo, camundongos HL mostraram depósito de lipídeos e desenvolvimento de placa aterosclerótica em várias áreas analisadas.

As lesões ateroscleróticas observadas nos camundongos S em relação aos WT foram acompanhadas de aumento na imunorretividade para NOSn. Todavia, a predominância desta imunorreatividade foi observada nos camundongos HL.

Verificamos um aumento na imunorreatividade para NOSe nas aortas dos camundongos S em relação aos camundongos WT, e um marcado aumento nos camundongos HL.

Não observamos imunorreatividade para NOSi nas aortas dos camundongos WT e S. Porém, foi evidenciada uma área imunorreativa dispersa na região das túnicas íntima, média e adventícia nos camundongos HL.

Na análise imunoistoquímica para CD40L foi observada uma área imunorreativa dispersa na região da túnica íntima, média e adventícia. A imunorreatividade foi maior nas aortas dos camundongos S em relação aos camundongos WT e este aumento foi potencializado nos camundongos HL.

Camundongos S e HL mostraram uma redução na imunorreatividade para α-actina em relação aos camundongos WT, sendo que camundongos HL apresentaram uma redução maior em relação aos camundongos S.

Associada ao depósito de lipídeo e a aterosclerose verificamos um remodelamento arterial com maior espaço na túnica íntima e entre as fibras elásticas da túnica média da aorta nos camundongos S e HL em relação aos WT. Os camundongos LDLr-/- (S e HL) apresentaram aumento na área íntima em relação aos WT, com predominância deste aumento nos camundongos HL. Por outro lado somente os camundongos HL apresentaram aumento na área média. Observamos também, aumento da porcentagem do colágeno nas túnicas média-íntima e do colágeno total (túnicas íntima, média e adventícia) nos camundongos LDLr-/- (S e HL) quando comparados com WT. Contudo, camundongos HL apresentaram aumento na deposição de colágeno em relação aos S.

Diante dos resultados, mostramos nesse presente estudo, que a deleção do gene que expressa o receptor para LDL em camundongos, por si só é um fator determinante no depósito de lipídeos no segmento aórtico valvular. Contudo, a deleção gênica associada à dieta hiperlipídica sustenta e mantém o processo inflamatório. Observamos no segmento aórtico valvular depósitos de lipídios acompanhados de um aumento na imunorreatividade para NOSn. Todas estas alterações tiveram um marcado aumento nos camundongos HL com avanço das lesões.

O aspecto relevante deste estudo foi a identificação de um aumento na imunorreatividade para

CD40L em inversa relação com a imunorreatividade para α-actina em camundongos S e HL na fase precoce. Em fases iniciais, a interação CD40-CD40L está associada à expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e liberação de quimiocinas, como IL-8 e proteína inflamatória de macrófago 1α (MIP-1-α), estando sua presença correlacionada com um aumento de vias pró-inflamatórias.

O remodelamento arterial observado nos camundongos S em relação ao WT foi caracterizado pelo aumento na área média-íntima e pelo aumento no depósito de colágeno na parede arterial, com predominância destes aumentos nos camundongos HL. Este remodelamento evoluiu com o processo inflamatório. O aumento da imunoreatividade para CD40L nas túnicas média-íntima e na adventícia dos camundongos HL mostrou que o aumento no depósito de colágeno nestas regiões está envolvido com processo inflamatório.

5. CONCLUSÕES

As lesões na artéria aorta observadas no presente estudo mostraram que a deleção do gene do receptor de LDL está entre os fatores de risco da aterosclerose, e sua associação com a dieta hiperlipídica aumenta o risco por mecanismos que envolvem o papel inflamatório e pró-aterogênico do CD40L.

AGRADECIMENTOS

UNIFENAS, UFRPE, UNICAMP ao IFSULDEMINAS e a CAPES.

REFERÊNCIAS

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius red staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J.** v. 11, p. 447-455, 1979.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASERI, A. Inflammation and Atherosclerosis. **Circulation**. v.105, p.1135-42, 2002.

ROSS R. Atherosclerosis and inflammatory disease. **N Engl J Med**. v. 340, n. 2, p. 115-26, 1999.

SONG, L.; LEUNG, C.; SCHINDLER, C. Lymphocytes are important in early atherosclerosis. **J Clin Invest. v.** 108, p.251-59, 2001.

JOHSON, J. L. e JACKSON, C. L. Atherosclerotic plaque rupture in the apoliprotein E knockout mouse. **Atherosclerosis.** v.154, n. 2, p. 399-406, 2001.