

Estudo histopatológico de lesões ateroscleróticas em suínos de raça alentejana

Histopathological study of atherosclerotic lesions in Alentejano pigs

A. Ramos¹, O. Bento^{2,3}, M.J. Lança^{2,3}, J.M. Martins^{2,3},
F. Capela-Silva^{2,4} & A. Freitas^{2,3}

RESUMO

Neste trabalho experimental procedeu-se à medição da espessura e à caracterização histológica de lesões ateroscleróticas, em suínos de raça Alentejana, procurando-se estabelecer uma relação entre estas e os valores dos parâmetros sanguíneos associados ao desenvolvimento deste processo patológico. As concentrações plasmáticas de triacilgliceróis, fosfolípidos, colesterol total, colesterol livre, LDLc e HDLc foram determinadas por métodos enzimáticos. Foram também feitas análises histopatológicas a amostras da artéria coronária esquerda. Os animais foram divididos em 2 grupos de 6 indivíduos cada: Grupo I, com elevada colesterolémia (4,25 mmol/L) e Grupo II, com níveis normais (2,53 mmol/L). Os valores do ganho médio diário (GMD) dos dois grupos foram semelhantes. Os animais do Grupo I apresentaram valores significativamente mais elevados ($P \leq 0,001$) para: colesterol total, colesterol livre, colesterol esterificado e LDLc. A área de lesão foi significativamente superior ($P \leq 0,05$) no Grupo I. Verificou-se uma relação linear entre a área de lesão (fases iniciais do tipo I e II) e os teores

plasmáticos de colesterol total, de LDLc e de colesterol livre, o que sugere a influência destes parâmetros na dimensão da área de lesão. Os resultados deste trabalho sugerem que os suínos de raça Alentejana podem desenvolver lesões ateroscleróticas ao longo do seu ciclo de vida, tal como o observado em humanos e outras raças de suínos. Estas lesões estão associadas a hipercolesterolemia que poderão ser devidas a mutações genéticas em apolipoproteínas, sistemas enzimáticos ou receptores. São necessários estudos futuros, quer a nível histológico quer a nível de biologia molecular, para um maior aprofundamento do conhecimento das lesões ateroscleróticas em suínos de raça Alentejana.

ABSTRACT

The present study aimed to assess the histopathological characterization of atherosclerotic lesions in Alentejano pigs, and to evaluate the relationship between several blood parameters and lesions development. Histomorphometric determinations of atherosclerotic lesions were performed on

¹ e-mail: antoniojaramos@gmail.com; ²ICAM - Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas, Universidade de Évora, Apartado 94 7002-554 Évora; ³Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora; ⁴Departamento de Biologia, Universidade de Évora

the left coronary artery and plasmatic levels of triacylglycerols, phospholipids, and of total, free, LDL and HDL cholesterol were measured by enzymatic methods. Pigs were assigned to two groups (n=6): Group I, with hypercholesterolemic pigs (4,25 mmol/L), and Group II, with normocholesterolemic ones (2,53 mmol/L). Average daily gain was similar in both groups. Plasmatic levels of total, free, esterified and LDL cholesterol were significantly higher ($P \leq 0,001$) in Group I. The atherosclerotic lesion area was significantly higher ($P \leq 0,05$) in the same group. Linear correlations between atherosclerotic lesion area (in initial Phases I and II) and plasmatic levels of total, free and LDL cholesterol were observed. The results of this study suggest that the Alentejano pig, like humans and other swine, may develop atherosclerotic lesions during its life cycle. Such lesions, associated with hypercholesterolemia, may be due to genetic mutations in apolipoproteins, lipid enzymes or receptor genes. Further studies on molecular genetics and on hysthopathology of this type of atherosclerotic lesion, in Alentejano pigs are required.

INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma doença dos vasos arteriais multifactorial, caracterizada pela migração e proliferação de células musculares lisas, formação de tecido conjuntivo, presença de células inflamatórias, formação de trombo e calcificação e acumulação de colesterol (Hiltunen *et al.*, 2002). A parede arterial é constituída por 3 túnicas: a íntima, a média, e a adventícia. Esta última transita gradualmente para o tecido periadventício, que é tecido adiposo associado à artéria (Chaldakov *et al.*, 2000). Ao nível da parede arterial, a hipercolesterolemia está associada não só a um maior depósito de lípidos nas

lesões, mas também à alteração de diferentes funções, tanto das células endoteliais, como das células musculares lisas e dos monócitos. A função endotelial é alterada pelas LDLs (do inglês *Low Density Lipoproteins*: lipoproteínas de baixa densidade) através de uma resposta diminuída da dilatação dependente do endotélio e um incremento das moléculas de adesão (Martínez-González *et al.*, 2001). A doença aterosclerótica surge no decurso da formação de placas de lípidos na parede arterial, de forma que lesões avançadas podem obstruir o lúmen do vaso (Françoso & Coates, 2002).

O colesterol é transportado no plasma como componente das lipoproteínas e no Homem e em suínos a sua maioria circula ligado às LDLs. Por esta razão, concentrações plasmáticas elevadas de LDLc (colesterol ligado às LDL) são um factor de risco para o desenvolvimento prematuro de aterosclerose e cardiopatia isquémica (Martínez-González *et al.*, 2001). Segundo Moghadasian (2002), suínos que apresentam mutações em determinados genes, desenvolvem hipercolesterolemia e aterosclerose nas artérias coronárias, ilíacas e femorais, mesmo com dietas pobres em lípidos e isentas de colesterol. Alguns estudos demonstraram que a extensão e complexidade das lesões ateroscleróticas estão correlacionadas com o grau e a duração da hipercolesterolemia em suínos com mutações naturais Lpb5 (epítipo da apoB, apolipoproteína B) e Lpu1 (epítipo da apoU, apolipoproteína U) (Lee *et al.*, 1990).

No presente trabalho experimental, pretendeu-se estudar e caracterizar, do ponto de vista histológico, lesões ateroscleróticas em suínos de raça Alentejana, a nível da artéria coronária esquerda, procurando-se estabelecer uma possível relação entre estas e os valores dos parâmetros sanguíneos associados ao desenvolvimento do processo aterosclerótico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Utilizaram-se 12 suínos de raça Alentejana de ambos os sexos (6 machos e 6 fêmeas), castrados, que no início do ensaio tinham cerca de 5 meses de idade e 36 kg de peso vivo (PV). Os animais foram sujeitos a confinamento e a sua alimentação baseou-se num alimento composto completo, de fabrico comercial, com 3107 Kcal de energia digestível/Kg e 150 g kg⁻¹ de proteína bruta, sem adição de colesterol. Este regime, destinado a suínos de raça Alentejana, continha também: 7% de celulose bruta, 3% de gordura bruta, 8% de cinza bruta, 0,95% de lisina, 20% de fibra NDF (do inglês *Neutral Detergent Fiber*: fibra solúvel em detergente neutro), 3500 UI de vitamina A, 1000 UI de vitamina D₃, 15 mg de vitamina E, 100 mg de cobre, 10 mg de avillamicina, antioxidante BHA (Butilhidroxianisol) e aglomerante sepiolita (max. 2%). A água foi distribuída em sistema *ad libitum*.

Colheita de amostras de sangue e determinação dos parâmetros plasmáticos

Ao atingirem um PV de 100 ± 2 kg, os animais foram abatidos no Matadouro Regional do Alto Alentejo, recorrendo-se a electronecrose e sangria. Ao abate, foram recolhidas da jugular amostras de sangue individuais, em tubos de vidro Venoject, com heparina de lítio (10mL; Terumo Europe NV, Leuven, Bélgica). Estes tubos foram posteriormente centrifugados (Beckman J-6B, Bucks, Reino Unido) a 1500 x g e a 4°C, durante 20 minutos. O plasma obtido foi colocado em *ependorfs*, e sujeito a ultracongelamento (-80 °C; Heto UF460, Brondby, Dinamarca) até à realização das análises. Os parâmetros analisados foram

os triglicéridos, os fosfolípidos, o colesterol total, o colesterol livre, as LDLc e as HDLc (colesterol ligado às HDL; do inglês *High Density Lipoproteins*: lipoproteínas de elevada densidade). Os níveis plasmáticos de triacilgliceróis e fosfolípidos foram determinados por testes enzimáticos (Roche Diagnostics) num analisador automático (Hitachi 704; Hitachi, Tokyo, Japan). O colesterol livre foi medido num espectrofotómetro (Beckam DU-530; Fullerton, CA, USA) e o colesterol total num analisador automático Hitachi 917, igualmente por testes enzimáticos (Wako Chemicals e Roche Diagnostics, respectivamente). O colesterol esterificado foi determinado pela diferença aritmética entre o colesterol total e o colesterol livre. As concentrações plasmáticas de LDLc e de HDLc foram determinadas por método enzimático directo (Roche Diagnostics) num analisador automático Hitachi 917, de acordo com Nakamura *et al.* (1997) e Sugiuchi *et al.* (1995), respectivamente.

Processamento histológico de amostras de tecido arterial

Após o abate dos animais, procedeu-se à recolha de amostras de tecido arterial que foram imediatamente fixadas em formaldeído neutro a 10%, tamponado (fosfato), durante 24 horas, sendo posteriormente processadas por técnica histológica de rotina (incluídas em parafina e cortadas em micrótomo rotativo em secções com 5 µm de espessura). Para observação da estrutura geral, os cortes foram estendidos em lâminas de vidro de 75 x 25 mm, e corados com Hematoxilina e Eosina, com Tricrómico de Masson (Bio-Óptica, ref^a 010802) e pelo método de Weigert (para fibras elásticas; Bio-Óptica, ref^a 050802). As preparações definitivas foram observadas em microscópio Nikon

Eclipse 600, sendo as imagens, para análise histomorfométrica, obtidas através de câmara digital Nikon DN100.

Determinação das áreas de lesão, da espessura da parede arterial e classificação do tipo histológico de lesão

Nas fotomicrografias digitais foi determinada a área de lesão, em valor percentual (%), tendo para tal sido utilizado o programa Sigma Scan Pro versão 5 (SPSS, 2005). O valor da área de lesão foi obtido pela diferença entre a área do lúmen, englobando a lesão, e a área do lúmen sem a lesão. O valor obtido, para cada animal, representa a média de 3 medições. Também se determinou a espessura da parede vascular em μm , no que se refere ao seu valor total, e às túnicas média e adventícia. Os valores obtidos, para cada animal, resultaram da média de 10 medições. Estes valores foram obtidos através de medição com ocular micrométrica. A classificação histopatológica das lesões foi realizada através da escala descrita por Françoso e Cotes (2002).

Análise estatística

Para efeitos da análise estatística, foram constituídos dois grupos, compostos por 6 animais cada, de acordo com os valores do colesterol plasmático total: Grupo I, com valores mais elevados e Grupo II, com valores mais baixos. Foi efectuada uma análise de variância unifactorial usando o GML (do inglês *General Linear Model*: modelo linear geral) do programa SPSS 11.0 (SPSS, 2005). As comparações das médias foram realizadas por um teste de Newman-Keuls. Realizaram-se ainda análises de regressão entre algumas variáveis usando o programa SPSS 11.0.

RESULTADOS

Parâmetros fisiológicos

Os valores do GMD dos dois grupos de suínos foram semelhantes (Quadro 1). Os animais do Grupo I apresentaram valores significativamente mais elevados ($P \leq 0,001$) para os teores plasmáticos analisados (colesterol total, colesterol livre, colesterol esterificado, LDLc), mas não para os triacilglicérolis e HDLc (Quadro 1).

No que se refere aos parâmetros histológicos, não foram verificadas diferenças significativas em relação aos valores médios dos dois grupos. A única excepção foi a área de lesão, significativamente superior no Grupo I ($P \leq 0,05$) (Quadro 1).

Relação entre algumas variáveis estudadas

Das análises de regressão efectuadas entre as diferentes variáveis, verificou-se uma relação linear entre a área de lesão e o teor plasmático de colesterol total, a área de lesão e o teor plasmático de LDLc e a área de lesão e o teor plasmático de colesterol livre (Quadro 2), o que sugere que estes parâmetros plasmáticos influenciaram a dimensão da área de lesão.

A relação entre a área de lesão e o colesterol esterificado, apresenta uma tendência significativa ($P=0,058$). Por outro lado, o teor plasmático de LDLc não foi influenciado pelo GMD dos suínos ($P=0,839$) (Quadro 2).

Tipos de lesões

As lesões observadas nas artérias coronárias esquerdas foram, de acordo com Françoso & Coates (2002), classificadas como sendo do tipo I ou II. Como se mostra no Quadro 3, no Grupo I verificou-se que 2

QUADRO 1 - GMD, parâmetros plasmáticos, área de lesão (%) e espessura das túnicas arteriais (artéria coronária esquerda) nos grupos (n = 6) de suínos Alentejanos estudados

Parâmetros	Grupo I	Grupo II	EPM	ANOVA
GMD (g/dia)	428,87	434,18	11,63	NS
Triacilgliceróis (mmol/L)	59,50	57,67	8,78	NS
Fosfolípidos (mmol/L)	2,01 ^a	1,46 ^b	0,08	***
Colesterol total (mmol/L)	4,25 ^a	2,53 ^b	0,12	***
Colesterol livre (mmol/L)	1,05 ^a	0,65 ^b	0,06	***
Colesterol esterificado (mmol/L)	3,20 ^a	1,88 ^b	0,10	***
LDLc (mmol/L)	3,00 ^a	1,38 ^b	0,15	***
HDLc (mmol/L)	1,20	0,98	0,09	NS
Espessura total (µm)	280,33	298,46	29,13	NS
Túnica média (µm)	196,96	221,00	21,04	NS
Túnica adventícia (µm)	83,38	77,46	9,31	NS
Área de lesão (%)	19,61 ^a	7,49 ^b	3,57	*

NS - sem significância; * - significância para $P \leq 0,05$; *** - significância para $P \leq 0,001$

QUADRO 2 - Relações observadas entre algumas variáveis estudadas (n = 12)

Parâmetros	Euações	R ²	Significância
LDLc / GMD	$y = 1,236432 + 0,02206 \times \text{GMD}$	0,004	NS; $P = 0,839$
Área de lesão/Colesterol total	$y = -10,427416 + 7,073624 \times \text{Col tot}$	0,402	* $P = 0,027$
Área de lesão/LDLc	$y = -2,670950 + 7,411353 \times \text{LDLc}$	0,418	* $P = 0,023$
Área de lesão / Colesterol livre	$y = -14,355471 + 32,737246 \times \text{Col liv}$	0,591	** $P = 0,004$
Área de lesão/Colesterol esterificado	$y = -6,995787 + 8,097511 \times \text{Col est}$	0,314	NS; $P = 0,058$

NS - sem significância; * - significância para $P \leq 0,05$; ** - significância para $P \leq 0,01$

animais apresentaram lesões de tipo I e 4 animais lesões de tipo II. Por outro lado, no Grupo II, 4 animais apresentaram lesões de tipo I, e 2 animais apresentaram lesões de tipo II (Quadro 3).

QUADRO 3 - Tipo histológico da lesão apresentado pelos animais dos 2 grupos

Grupo ¹	Animal	Tipo histológico da lesão
I	1	I
	2	I
	3	II
	4	II
	5	II
	6	II
II	7	I
	8	II
	9	I
	10	I
	11	II
	12	I

¹Grupo I: animais com valores mais elevados do colesterol plasmático total; Grupo II: animais com valores mais baixos do colesterol plasmático total

As lesões de tipo I caracterizaram-se por um espessamento da túnica íntima. Nas lesões de tipo II, além do espessamento da túnica íntima, ocorreu uma degradação da lâmina elástica externa e migração de células musculares lisas da túnica média para a túnica íntima, sendo também visíveis algumas células fagocitárias modificadas (células espumosas). Em todas as lesões ateroscleróticas foi visível um espessamento da túnica íntima.

DISCUSSÃO

O GMD observado nos dois grupos foi semelhante ao obtido por Freitas (2003) para suínos de raça Alentejana com um intervalo de peso compreendido entre 37,5 e 100 kg de PV em regime alimentar semelhante (498 g/dia).

A hipercolesterolemia é o factor de risco dominante que está associado com a aterosclerose (Stokes *et al.*, 2002). Como se pôde observar pelos parâmetros sanguíneos, o Grupo I apresentou valores de colesterol total (4,25 mmol/L) bastante superiores aos encontrados em estudos anteriores (Martins *et al.* submetido), onde os valores normais de colesterolemia, em porcos sujeitos a dieta sem adição de colesterol, eram de 2,68 mmol/L. A maioria do colesterol plasmático, tal como referido por Dixon *et al.* (1999), foi transportado em partículas de LDL.

Existiu uma clara diferença nos valores observados para alguns dos parâmetros plasmáticos, nos dois grupos de suínos em estudo. Esta diferença ($P \leq 0,001$) foi observada para os fosfolípidos, o colesterol total, o colesterol livre, o colesterol esterificado e o LDLc. Relativamente aos triacilglicéris e HDLc não se verificaram diferenças significativas entre ambos os grupos. Ao contrário do HDLc, que desempenha uma importante função anti-aterogénica, através do transporte reverso do colesterol das células periféricas para o fígado, o LDLc é um factor de risco (Fredenrich & Bayer, 2003), pelo que níveis elevados deste correspondem a uma propensão acrescida para o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, o que efectivamente se verificou no presente ensaio.

Atendendo a que os dois grupos de animais ingeriram o mesmo tipo de dieta e apresentaram um GMD semelhante, o aparecimento de animais hipercolesterolemicos e com lesões do tipo II nas artérias coronárias esquerdas, poderá indiciar que alguns destes animais possuiriam genes mutados conforme o verificado por Attie e Prescott (1988) e Hasler-Rapacz *et al.* (1998). Estes autores verificaram a existência de lesões ateroscleróticas iniciais, ao ano de idade, embora os suínos ingerissem uma dieta isenta de colesterol, baixa em gordura.

Também Moghadasian (2002) relacionou situações de hipercolesterolemia, em suínos que ingeriam dietas isentas de colesterol, com o aparecimento de lesões ateroscleróticas.

No que se refere à relação entre os valores dos parâmetros plasmáticos (colesterol total, colesterol livre, colesterol esterificado e LDLc) e a área de lesão, verificou-se existir uma relação significativa entre estas variáveis, excepto para o colesterol esterificado ($P=0,058$). Tal como o verificado por Hackman *et al.* (1996), em estudos realizados com suínos obesos, observou-se uma relação linear significativa entre os parâmetros colesterol total e LDLc, com a área de lesão. A relação entre os níveis de colesterol e a área de lesão também foi constatada em estudos efectuados por Bocan *et al.* (1993) em porcos miniatura do Iucatão. O colesterol livre, que é citotóxico (Martínez-González *et al.*, 2001), apresentou uma significância ainda maior ($P=0,004$) na sua relação com a área de lesão.

No respeitante à classificação das lesões, e de acordo com a escala de classificação histológica apresentada por França & Coates (2002), as lesões encontradas são de tipo I e II, verificando-se uma predominância das lesões de tipo I nos animais com níveis de colesterolemia mais baixos (Grupo II). Por outro lado, as lesões mais avançadas (tipo II) surgiram sobretudo nos animais que apresentaram valores de colesterolemia mais elevados (Grupo I), o que está de acordo com os resultados obtidos por Gerrity *et al.* (2001). Da observação das alterações histológicas ao nível das lesões, é de salientar um espessamento da túnica íntima tal como observado por Shimokawa *et al.* (1996), uma degradação da lâmina elástica externa como o observado por Graf *et al.* (1998), migração de células musculares lisas da túnica média para a túnica íntima como o indicado por Hackman *et al.* (1996) e o apa-

recimento de células espumosas, alterações que foi possível visualizar neste ensaio nas colorações com hematoxilina-eosina, Weigert ou tricrômico de Masson.

CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho sugerem que as lesões ateroscleróticas em suínos de raça Alentejana podem surgir mesmo em animais sujeitos a uma dieta sem adição de colesterol, o que poderá indiciar mutações genéticas como as observadas no Homem e outras raças de suínos. Com efeito, verificou-se que, embora os animais tivessem cerca de 11 meses de idade, já apresentavam lesões ateroscleróticas com características histológicas correspondentes a fases iniciais (tipo I e II) do processo aterogénico. Por outro lado, os animais que apresentaram colesterolémias mais elevadas, também apresentaram áreas de lesão maiores.

Para um maior aprofundamento do conhecimento das lesões ateroscleróticas em suínos de raça Alentejana, são necessários estudos futuros, quer a nível histológico quer a nível de biologia molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Attie, A. D. & Prescott, M. F. 1988. The Spontaneously Hypercholesterolemic Pig as an Animal Model for Human Atherosclerosis. *ILAR News*, **30**: 5-12.
- Bocan, T. M., Mueller, S. B., Uhlendorf, P. D., Brown, E. Q., Mazur, M. J. & Black, A. E. 1993. Inhibition of acyl-CoA cholesterol O-acyltransferase reduces the cholesteryl ester enrichment of atherosclerotic lesions in the Yucatan micropig. *Atherosclerosis*, **99**: 175-186.
- Chaldakov, G. N., Fiore, M., Ghenev, P. I., Stankulov, I. S. & Aloe, L. 2000. Atherosclerotic Lesions: Possible Interactive Involvement of Intima, Adventitia and Associated Adipose Tissue. *International Medical Journal*, **7**: 43-49.
- Dixon, J. L., Stoops, J. D., Parker, J. L., Laughlin, M. H., Weisman, G. A. & Sturek, M. 1999. Dyslipidemia and Vascular Dysfunction in Diabetic Pigs Fed an Atherogenic Diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **19**: 2981-2992.
- Françoso, L. A. & Coates, V. 2002. Evidências Anatomopatológicas do Início da Aterosclerose na Infância e Adolescência. *Arq Bras Cardiol*, **78**: 131-136.
- Fredenrich, A. & Bayer, P. 2003. Reverse cholesterol transport, high density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data. *Diabetes Metab*, **29**: 201-205.
- Freitas, A. B. 2003. Peso Ótimo de Abate do Porco Alentejano Destinado à Produção de Carne para Consumo em Fresco. *XIII Congresso de Zootecnia – Produzir Qualidade em Segurança – Évora, 1 a 4 de Outubro*.
- Gerrity, R. G., Natarejan, R., Nadler, J. L. & Kimsey, T. 2001. Diabetes-Induced Accelerated Atherosclerosis in Swine. *Diabetes*, **50**: 1654-1665.
- Graf, T. L., Boleman, S. L., Krook, L. P., Su, D-R., Mersmann, H. J., Savell, J. W. & Pond, W. G. 1998. Effect of Neonatal Dietary Cholesterol Deprivation in Pigs with Genetically High or Low Plasma Cholesterol on Plasma Lipids and Early Atherogenesis. *Nutrition Research*, **18**: 1615-1629.
- Hackman, A. M., Pond, W. G., Mersmann, H. J., Wong, W. W., Krook, L. P. & Zhang, S. 1996. Obese Pigs Fed a High Cholesterol Diet from Birth to 2 Months Are Less Susceptible than Lean Pigs to Atherosclerosis. *J Nutr*, **126**: 564-573.
- Hasler-Rapacz, J., Ellegren, H., Fridolfsson, A., Kirkpatrick, B., Kirk, S., Andersson, L. & Rapacz, J. 1998. Identification of a

- Mutation in Low Density Lipoprotein Receptor Gene Associated with Recessive Familial Hypercholesterolemia in Swine. *Am. J. Med. Genet.* **76**:379-386.
- Hiltunen, M. O., Tuomisto, T. T., Niemi, M., Bräsen, J. H., Rissanen, T. T., Törönen, P., Vajanto, I. & Ylä-Herttuala, S. 2002. Changes in gene expression in atherosclerotic plaques analyzed using DNA array. *Atherosclerosis*, **165**: 23-32.
- Lee, D.M., Mok, T., Hasler-Rapacz, J. & Rapacz, J. 1990. Concentrations and compositions of plasma lipoprotein sub-fractions of Lpb⁵-Lpu¹ homozygous and heterozygous swine with hypercholesterolemia. *J Lipid Res*, **31**: 839-847.
- Martins, J.M., Neves, J., Freitas, A. & Nunes, J. Effects of body weight on some blood plasma parameters of pigs from the Alentejano breed. *Options Méditerranéennes* (in press).
- Martínez-González, J., Llorente-Cortés, V. & Badimon, L. 2001. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas. *Rev Esp Cardiol*, **54**: 218-231.
- Moghadasian, M. H. 2002. Experimental atherosclerosis – A historical overview. *Life Sciences*, **70**: 855-865.
- Nakamura, M., Taniguchi, Y., Yamamoto, M., Hino, K. & Manabe, M. 1997. Homogenous assay of serum LDL-cholesterol on an automatic analyser. *Clin Chem*, **43 (Suppl. 6)**: 260–261.
- Shimokawa, H., Ito, A., Fukumoko, Y., Kadokami, T., Nakaike, R., Sakata, M., Takayanagi, T., Egashira, K. & Takeshita, A. 1996. Chronic Treatment with Interleukin-1 β Induces Coronary Intimal Lesions and Vasospastic Responses in Pigs In Vivo – The Role of Platelet-derived Growth Factor. *J Clin Invest*, **97**: 769-776.
- SPSS 2005. <http://www.spss.com/>
- Stokes, K. Y., Cooper, D., Tailor, A. & Granger, D. N. 2002. Hipercholesterolemia Promotes Inflammation and Microvascular Dysfunction: Role of Nitric Oxide and Superoxide. *Free Radical Biology & Medicine*, **33**: 1026-1036.
- Sugiuchi, H., Uji, Y., Okabe, H., Irie, T., Uekama, K., Nayahara, N. & Miyauchi, K. 1995. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulphated α -cyclodextrin. *Clin Chem*, **41**: 717-723.