

## **Doença Arterial Obstrutiva Periférica induzida em coelhos e suas repercussões na musculatura dos membros inferiores**

## **Peripheral Obstructive Arterial Disease induced in rabbits and its repercussions on the muscles of the lower limbs**

DOI:10.34119/bjhrv6n5-587

Recebimento dos originais: 22/09/2023

Aceitação para publicação: 25/10/2023

### **Ivan do Nascimento da Silva**

Doutorando em Ciências da Saúde pela Universidade Federal de Alagoas  
Instituição: Centro Universitário de Maceió (UNIMA), Afya  
Endereço: Avenida Comendador Gustavo Paiva, 501, Cruz das Almas, Maceió - AL,  
CEP: 57038-000  
E-mail: ft.ivan@hotmail.com

### **Gabriel Almeida Barbosa Resende Sampaio**

Graduando em Medicina  
Instituição: Centro Universitário de Maceió (UNIMA), Afya  
Endereço: Avenida Comendador Gustavo Paiva, 501, Cruz das Almas, Maceió - AL,  
CEP: 57038-000  
E-mail: gabrielsampaioed@gmail.com

### **Pericles Jorge Raposo Guimarães**

Graduando em Medicina  
Instituição: Centro Universitário de Maceió (UNIMA), Afya  
Endereço: Avenida Comendador Gustavo Paiva, 501, Cruz das Almas, Maceió - AL,  
CEP: 57038-000  
E-mail: pericles\_jorge@hotmail.com

### **Juliana Arôxa Pereira Barbosa**

Mestre em Patologia pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
Instituição: Centro Universitário de Maceió (UNIMA), Afya  
Endereço: Avenida Comendador Gustavo Paiva, 501, Cruz das Almas, Maceió - AL,  
CEP: 57038-000  
E-mail: juaroxa@hotmail.com

### **Sabrina Gomes de Oliveira**

Doutora em Ciências da Saúde pela Universidade de São Paulo (USP)  
Instituição: Centro Universitário de Maceió (UNIMA), Afya  
Endereço: Avenida Comendador Gustavo Paiva, 501, Cruz das Almas, Maceió - AL,  
CEP: 57038-000  
E-mail: sabrina.gomes@souunit.com.br

**Célio Fernando de Sousa Rodrigues**

Doutor em Morfologia pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Instituição: Universidade Federal de Alagoas - campus A.C. Simões

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, Maceió - AL

E-mail: celiofernando@yahoo.com.br

**RESUMO**

**Introdução:** Com acúmulo subintimal de lipídios e materiais fibroso presentes na DAOP ocorre redução do fluxo sanguíneo e consecutivas anormalidades musculoesqueléticas e nervosas associadas, as quais geram as principais manifestações clínicas dos portadores, como: claudicação intermitente, dor isquêmica em repouso e em ultima estância gangrena que necessita de amputação. **Objetivo:** verificar as alterações que a doença arterial obstrutiva periférica causa na musculatura dos membros inferiores em coelhos, tendo em vista o melhor entendimento das alterações macroscópicas e microscópicas. **Material e método:** O estudo é do tipo experimental. Onde foram coletadas as amostras de 18 animais, que foram randomizados em dois grupos: G1 – grupo controle (apenas ração) e G2 (ração mais gema). Seguidamente à eutanásia foi removido parte do musculo sóleo, a partir de uma dissecação da face posterior da pata posterior esquerda. Com as amostras em mãos deu-se início a etapa de preparação das lâminas para análise histológica com fragmentos musculares, seguindo protocolos de rotina laboratorial. **Resultado:** A análise das lâminas histopatológicas revelou notáveis alterações morfológicas no tecido muscular, caracterizadas pelo aumento das células adiposas e atrofia muscular, além do desarranjo da arquitetura, no grupo alimentado com ração e gema (G2), em comparação com o grupo controle (G1) que recebeu exclusivamente ração. Esses achados destacam claramente os efeitos prejudiciais de uma dieta rica em lipídios na estrutura e função muscular. **Conclusão:** os resultados das lâminas histopatológicas confirmam o impacto negativo de uma dieta rica em lipídios na estrutura muscular, o que ressalta a importância de investigações adicionais para aprofundar nossa compreensão desses efeitos e seus possíveis desdobramentos clínicos.

**Palavras-chave:** músculo, Aterosclerose, hipercolesterolemia, membro inferior.

**ABSTRACT**

**Introduction:** With the subintimal accumulation of lipids and fibrous materials present in PAOD, there is a reduction in blood flow and consecutive associated musculoskeletal and nervous abnormalities, which generate the main clinical manifestations of patients, such as: intermittent claudication, ischemic pain at rest and, ultimately, gangrene. requiring amputation. **Objective:** to verify the changes that peripheral arterial obstructive disease causes in the muscles of the lower limbs in rabbits, with a view to better understanding the macroscopic and microscopic changes. **Material and method:** The study is experimental. Where samples were collected from 18 animals, which were randomized into two groups: G1 – control group (food only) and G2 (food plus yolk). Following euthanasia, part of the soleus muscle was removed, from a dissection of the posterior surface of the left hind paw. With the samples in hand, the stage of preparing the slides for histological analysis with muscle fragments began, following routine laboratory protocols. **Result:** Analysis of histopathological slides revealed notable morphological changes in muscle tissue, characterized by an increase in adipose cells and muscle atrophy, in addition to architectural disruption, in the group fed with chow and yolk (G2), compared to the control group (G1) who received exclusively food. These findings clearly highlight the detrimental effects of a high-lipid diet on muscle structure and function. **Conclusion:** the results of the histopathological slides confirm the negative impact of a diet rich

in lipids on the muscle structure, which highlights the importance of additional investigations to deepen our understanding of these effects and their possible clinical consequences.

**Keywords:** muscle, Atherosclerosis, hypercholesterolemia, lower limb.

## 1 INTRODUÇÃO

A doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) dos membros inferiores representa uma obstrução arterosclerótica dos segmentos aortoilíacos até as artérias mais crurais (CRIQUI *et al*, 2021). Acomete mais de 200 milhões de pessoas no mundo, diminuindo a capacidade funcional do indivíduo e com impacto significativo na morbimortalidade (ANNEX, B. H.; COOKE, J. P., 2021). A DAOP é a terceira maior causa de morbidade cardiovascular, após da doença arterial coronariana e o acidente vascular encefálico (ANEXO, BRIAN H E JOHN P COOKE, 2021). Contudo, o diagnóstico e o tratamento são muitas vezes negligenciados, com um número insuficiente de ensaios clínicos para uma patologia desta magnitude.

Os fatores de risco como tabagismo, diabetes, dislipidemia, hipertensão podem aumentar as chances de o paciente adquirir a DAOP, mas não só esses fatores que elevam essa possibilidade. Um estilo de vida sedentário sem a prática de atividades físicas também eleva o risco dessa pessoa adquirir essa enfermidade (KIM *et al*, 2020). O tabagismo e o diabetes são fatores, particularmente, fortes que se relacionam com o desenvolvimento da doença. O diabetes complica os resultados da DAOP, aumenta em 3x a possibilidade de o paciente desenvolvê-la (ELE *et al*, 2021). Já o tabagismo aumenta em 2x a possibilidade de desenvolver a doença e, ao parar de fumar, o paciente precisaria esperar 20 anos para que o seu risco chegue a se igualar com o de um não fumante (CRIQUI *et al* 2021). Valor elevado de colesterol total e baixo de lipoproteínas de alta densidade (HDL) também aumentam a possibilidade da instalação da DAOP no paciente, como também os níveis de apolipoproteína B e lipoproteínas são fatores independentes (TAKAHARA, 2021). As lipoproteínas ricas em triglicerídeos geram risco ao paciente de desenvolver DAOP, como também, pequenas partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) foram associadas com a doença (BRAGADEESH *et al*, 2015).

Em relação a epidemiologia brasileira, foi visto uma prevalência global de 1,05% de DAOP na população acima de 18 anos, aumentando com o avançar da idade, em que o pico foi de 11,5% em pessoas acima de 70 anos. Tem-se uma prevalência no sexo feminino (58,8%), de etnia branca (70,6%), com o IMC médio de 28,7%, circunferência abdominal média de 100cm, hemoglobina glicada média de 6,5%, LDL-C de 122 e Triglicerídeos de 141,1. Em relação aos

fatores de risco no país, 58,8% possuem o histórico de tabagismo, 41,2% são diabéticos e 76,5% são classificados como sedentários (RAFAEL *et al*, 2018).

Indivíduos que desenvolvem doenças cardiovasculares possuem algum tipo de dislipidemia, que é fator de risco para desenvolvimento de aterosclerose (OLIVEIRA *et al*, 2021). Dietas ricas em colesterol, sobretudo com a utilização de gema de ovo tem sido a maneira mais eficaz de induzir aterosclerose (DA SILVA, DOS SANTOS e RODRIGUES, 2023).

Com acúmulo subintimal de lipídios e materiais fibrosos presentes na DAOP ocorre redução do fluxo sanguíneo e consecutivas anormalidades musculoesqueléticas e nervosas associadas, as quais geram as principais manifestações clínicas dos portadores, como: claudicação intermitente, dor isquêmica em repouso e em última instância gangrena que necessita de amputação (WEISS *et al*, 2013). Os principais vasos acometidos são as ilíacas, femorais, poplíteas, tibiais e alguns ramos desses vasos. A avaliação inicial precisa incluir anamnese e exame físico completo, associado a índice tornozelo-braquial para confirmar o diagnóstico (CRIQUI *et al* 2021).

Portadores de DAOP apresentam prejuízo da função muscular esquelética devido a isquemia muscular, sendo uma das características clínicas mais notáveis a atrofia muscular dos membros inferiores com acúmulo de tecido adiposo, especialmente os músculos gastrocnêmio e sóleo, em que esses distúrbios são fortes preditores de mortalidade (WEISS *et al*, 2013). Investigações anatomopatológicas da panturrilha mostram uma área transversal menor das fibras tipo I e II, bem como o aumento intramuscular de colágeno, provavelmente devido a alterações nas sinalizações nas vias das proteases (KOUTAKIS *et al*, 2015). Em conjuntura, devido aos distúrbios microcirculatórios, ocorrem desmielinização e denervação na junção neuromuscular, contribuindo para fraqueza, menos uso daquele grupamento muscular e atrofia subsequente (WEISS *et al*, 2013). Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi verificar as alterações que a doença arterial obstrutiva periférica causa na musculatura dos membros inferiores em coelhos, tendo em vista o melhor entendimento das alterações macroscópicas e microscópicas.

## 2 MATERIAL E MÉTODO

O estudo é do tipo experimental e teve a liberação do comitê de ética animal da UNCISAL (CEUA), registrado sob o protocolo de número 002/2018. Parte do estudo já foi executado entre os meses de janeiro a maio de 2022, no biotério da UNCISAL/AL.

A amostra foi constituída de 18 animais, coelhos albinos Nova Zelândia, que foram randomizados em dois grupos: G1 – grupo controle (apenas ração) e G2 (ração mais gema). O

grupo G2 teve a indução de hipercolesterolemia por meio da administração de 20 ml de gema de ovo diariamente por 99 dias. A administração era feita intraoral usando uma seringa de 20 ml.

No 100º dia de procedimento os animais foram eutanasiados seguindo protocolo comum no biotério usando cetamina, xilazina, tiopental e por fim cloreto de potássio. As doses ajustadas de acordo com o peso dos animais. Seguidamente à eutanásia foi removido o músculo sóleo, a partir de uma dissecação da face da pata esquerda, sendo então colocado numa solução de formalina para conservação.

A preparação das lâminas seguiu o seguinte protocolo: fixação com formalina neutra tamponada; desidratação com álcool em concentrações crescentes (70%, 80%, 95% e 100%); Clarificação em que a amostra foi imersa em xileno; inclusão feita com parafina derretida; Corte feito em micrótomo; Desparafinização feitas com banhos de xileno e álcool; Coloração com Hematoxilina e Eosina; Montagem e observação das laminas em microscopia óptica.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

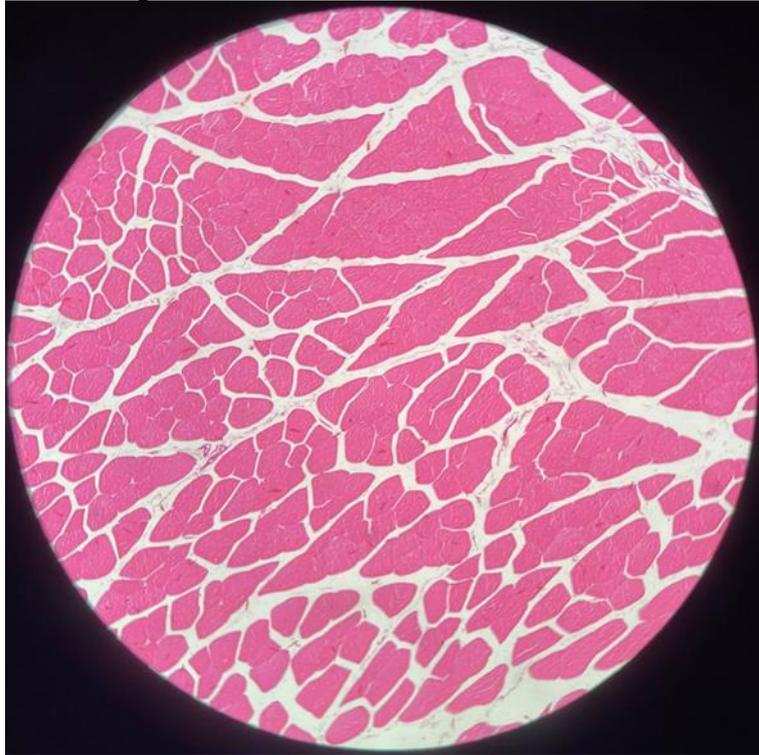
Ao examinarmos as peças macroscopicamente, foi evidenciado uma diferença entre os dois grupos, em que o grupo G2 teve diminuição de rigidez muscular a digitopressão.

Na avaliação feita através da microscopia óptica no grupo controle, as lâminas musculares desses roedores exibem uma organização histológica típica, com as fibras musculares apresentando padrões normais de alinhamento e arranjo, sem evidências de atrofia ou degeneração, com estriações longitudinais e transversais características de uma estrutura muscular saudável, não há sinais de inflamação ou fibrose e possuem uma coloração e distribuição muscular homogênea.

Podemos caracterizar a musculatura esquelética do musculo sóleo sendo suas fibras organizadas em feixes paralelos, o que acaba por dar uma aparência listrada ao mesmo, por possuir miofibrilas que possuem disposição regular dentro do músculo. E como é comum nos mamíferos, eles também possuem as fibras tipo 1 e 2, sendo a primeira de contração lenta, sendo normalmente utilizada para postura do animal, enquanto as do tipo 2 são fibras de contração rápida, sendo utilizadas para saltos e corridas (ROSS, 2021).

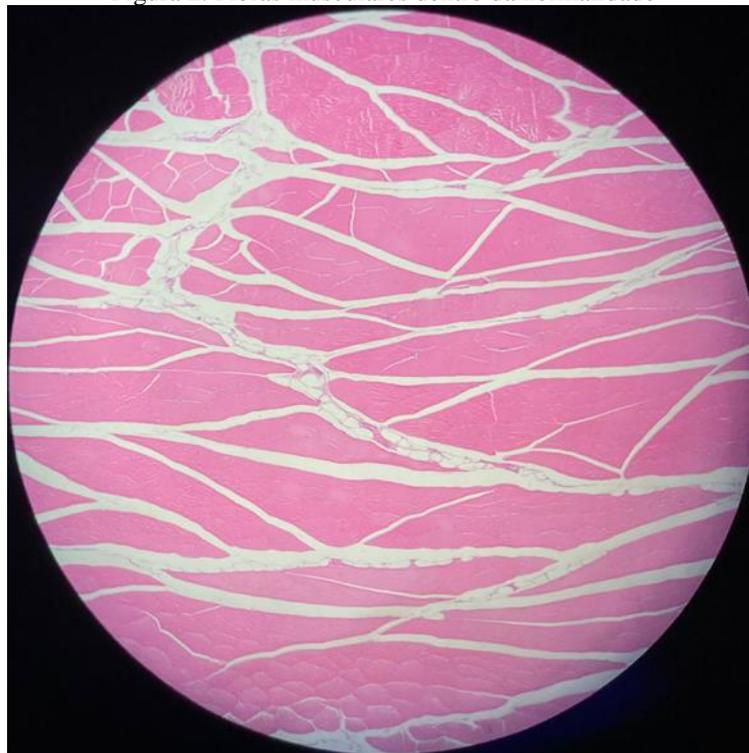
As figuras 1 e 2 são lâminas dos coelhos do grupo G1, os quais não possuíam nenhuma alteração patológica muscular, sendo esses alimentados apenas com ração.

Figura 1. Fibras musculares dentro da normalidade



Fonte: Autores (2023)

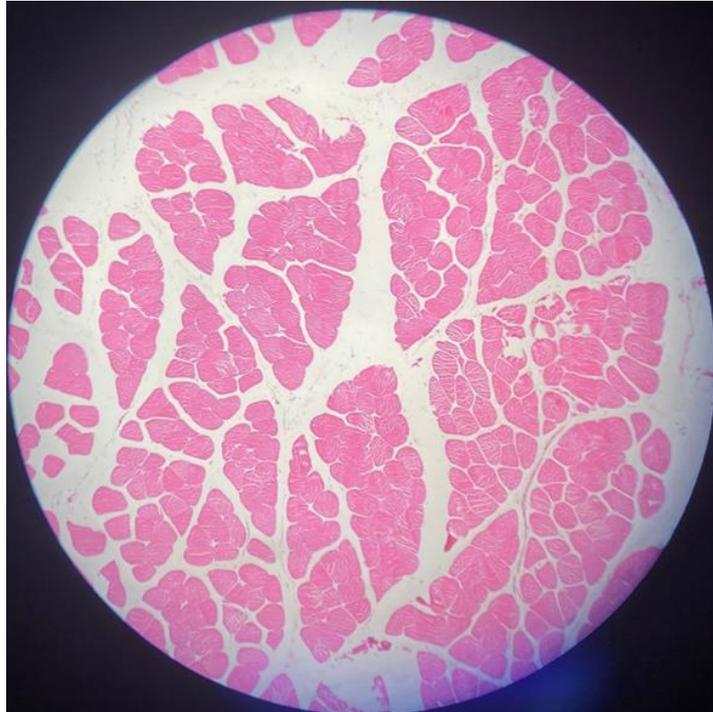
Figura 2. Fibras musculares dentro da normalidade



Fonte: Autores (2023).

As figuras 3 e 4 são lâminas feitas de area de secção transversal do musculo sóleo dos coelhos do grupo G2, os quais possuíam alteração patológica muscular, sendo esses alimentados com gema de ovo e ração.

Figura 3. Infiltrado gorduroso presente no citoplasma das fibras musculares com atrofia e maior distanciamento entre elas.



Fonte: Autores (2023).

Figura 4. Infiltrado gorduroso presente no citoplasma das fibras musculares com atrofia e maior distanciamento entre elas. Entre os fascículos musculares é evidente os inúmeros vacúolos lipídicos.



Fonte: Autores (2023).

Foi evidente no tecido Muscular: Os fascículos musculares estão com aparência cilíndrica e estriações transversais características com áreas de acúmulo de material eosinofílico no citoplasma das fibras, indicando a presença de gordura, representada por pequenos vacúolos de lipídeos de tamanhos variados distribuídos dentro do citoplasma das fibras musculares. Em adição, é evidente a atrofia muscular associada.

Foi evidente nos núcleos: Estão localizados na periferia das células e exibem um padrão oval característico. Eles estão preservados na região com infiltração gordurosa.

Foi evidente o desarranjo do Tecido Muscular: Devido à presença de gordura nas fibras musculares, observam-se áreas em que ocorre um desarranjo na disposição das fibras musculares, podendo afetar a função contrátil do músculo.

A lâmina histológica do músculo sóleo com infiltração gordurosa revela alterações patológicas associadas ao acúmulo de gordura no citoplasma das fibras musculares. Essa condição, conhecida como miopatia lipídica, pode ser resultado de diferentes condições, incluindo doenças metabólicas como a hiperlipidemia presente no grupo G2. A presença de infiltração gordurosa pode comprometer a função contrátil do músculo e, em alguns casos, levar a sintomas clínicos.

#### 4 CONCLUSÃO

A análise das lâminas histopatológicas revelou notáveis alterações morfológicas no tecido muscular, caracterizadas pelo aumento das células adiposas e atrofia muscular, além do desarranjo da arquitetura, no grupo alimentado com ração e gema (G2), em comparação com o grupo controle (G1) que recebeu exclusivamente ração. Esses achados destacam claramente os efeitos prejudiciais de uma dieta rica em lipídios na estrutura e função muscular.

A influência da dieta hiperlipídica na função muscular é evidente, e esses efeitos podem resultar em diversas manifestações clínicas em qualquer espécie. Portanto, os achados anatomopatológicos desse estudo constituem uma importante base para estimular pesquisas mais abrangentes e avançar o conhecimento nessa área.

Apesar de terem sido identificadas algumas alterações nas lâminas do grupo controle (G1), seria altamente recomendável aumentar o tamanho da amostra para possibilitar uma comparação mais sólida e abrangente. Além disso, a ausência da microscopia eletrônica neste estudo representa uma limitação, pois essa técnica poderia oferecer dados mais precisos sobre as alterações específicas em microestruturas celulares. Uma análise mais completa poderia fornecer uma compreensão mais precisa dos efeitos adversos da dieta hiperlipídica na morfologia muscular.

Em conclusão, os resultados das lâminas histopatológicas confirmam o impacto negativo de uma dieta rica em lipídios na estrutura muscular, o que ressalta a importância de investigações adicionais para aprofundar nossa compreensão desses efeitos e seus possíveis desdobramentos clínicos.

## REFERÊNCIAS

- ANNEX, B. H.; COOKE, J. P. New Directions in Therapeutic Angiogenesis and Arteriogenesis in Peripheral Arterial Disease. **Circulation Research**, v. 128, n. 12, p. 1944–1957, 11 jun. 2021.
- BRAGADEESH, T. et al. Detection of peripheral vascular stenosis by assessing skeletal muscle flow reserve. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 45, n. 5, p. 780–785, mar. 2015.
- ELE, Y. et al. “Intervenções de cuidados humanísticos em pacientes com arteriosclerose ocliterante de extremidades inferiores”. **Jornal americano de pesquisa translacional** vol. 13,9 10527-10535. 15 de setembro de 2021
- HE, Y. et al. Humanistic care interventions in patients with lower extremity arteriosclerosis ocliterans. **American journal of translational research**, v. 13, n. 9, p. 10527–10535, 2021.
- KIM, K. et al. Skeletal Muscle Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Peripheral Arterial Disease: A Unifying Mechanism and Therapeutic Target. **Antioxidants**, v. 9, n. 12, p. 1304, 18 dez. 2020.
- KOUTAKIS, P. et al. Abnormal Accumulation of Desmin in Gastrocnemius Myofibers of Patients with Peripheral Artery Disease. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 63, n. 4, p. 256–269, 9 jan. 2015.
- RONTOYANNI, V. G. et al. Mitochondrial Bioenergetics in the Metabolic Myopathy Accompanying Peripheral Artery Disease. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 13 mar. 2017.
- TAKAHARA, M. “Diabetes Mellitus e Doença Arterial Periférica das Extremidades Inferiores”. **Revista JMA** vol. 4,3 (2021): 225-231. doi:10.31662/jmaj.2021-0042
- WEISS, D. J. et al. Oxidative damage and myofiber degeneration in the gastrocnemius of patients with peripheral arterial disease. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, n. 1, 25 set. 2013.
- PAWLINA, Wojciech; ROSS, Michael H. **Ross histologia texto e atlas**. 8 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.
- OLIVEIRA, L.S. e al. Dyslipidemia as a risk factor for atherosclerosis and acute myocardial infarction. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v.4, n.6, p.24126-24138 nov./dec. 2021.
- DA SILVA, I. N; DOS SANTOS, J. A. B. ; RODRIGUES, C. F. S. Estudo da aterosclerose induzida por diferentes tipos de dieta hiperlipídica em coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*). **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, p. 16270-16279, 2023.