

**INFLUÊNCIA DO GÊNERO SOBRE A REGURGITAÇÃO
AÓRTICA, DEPOSIÇÃO LIPÍDICA E SENESCÊNCIA
VASCULAR EM CAMUNDONGOS IDOSOS
ATEROSCLERÓTICOS**

Thiago de Melo Costa Pereira

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Centro Biomédico
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória – ES, 2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

THIAGO DE MELO COSTA PEREIRA

**INFLUÊNCIA DO GÊNERO SOBRE A REGURGITAÇÃO
AÓRTICA, DEPOSIÇÃO LIPÍDICA E SENESCÊNCIA
VASCULAR EM CAMUNDONGOS IDOSOS
ATEROSCLERÓTICOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof^a Dr^a Silvana dos Santos Meyrelles

Co-orientador: Prof. Dr. José Airton Arruda

Vitória

2009

THIAGO DE MELO COSTA PEREIRA

**INFLUÊNCIA DO GÊNERO SOBRE A REGURGITAÇÃO
AÓRTICA, DEPOSIÇÃO LIPÍDICA E SENESCÊNCIA
VASCULAR EM CAMUNDONGOS IDOSOS
ATEROSCLERÓTICOS**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Valter Correia de Lima
UNIFESP- Membro externo

Prof. Dr. José Airton Arruda
Intercath/Meridional- Membro externo

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez
UFES/EMESCAM - Membro interno

Prof. Dra. Ivanita Stefanon
UFES - Membro interno

Profa Dra Silvana dos Santos Meyrelles-
UFES - Orientadora

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg
Coordenador, PPGCF, Centro de Ciências da Saúde, UFES

Vitória, ____ de _____ de 2009.

DEDICO

***A Deus, o grande autor da
vida;***

As mulheres da minha vida,

Letícia e Lara

***Essa vitória também
pertence a vocês.***

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, autor e consumidor da minha fé. Que todo o investimento em minha carreira científica possa ter um único objetivo: ser um instrumento vivo de adoração ao que é digno de todo o meu louvor.

À professora Silvana e ao professor Vasquez, pela confiança, orientação e atenção dispensadas. Exemplos de pesquisadores e cidadãos, a começar pelo entusiasmo, dedicação e seriedade com a ciência. Cientistas que dificilmente possibilitarão comparações. Muito obrigado por acreditarem em mim. Serei eternamente grato a vocês pelo aprendizado não apenas de palavras, mas de atitudes.

Ao Dr. Airton, que mesmo tão atuante na área clínica não mede esforços para atuar e impulsionar a área experimental. Sinceramente, um referencial de médico a ser seguido. Muito obrigado!

Ao Marquinhos, um dos grandes nomes desse trabalho. Sua disposição em ajudar é fora do comum! Continue sempre sendo essa pessoa atenciosa, alegre e inteligente. “Valeu Marquinhos!”

Ao Vitor Pazolini, meu “braço direito” em procedimentos da angiografia e análises. Muito obrigado pela sua dedicação!

Aos laboratórios Marcos Daniel e Virchow, cujas análises e resultados foram fundamentais para minhas conclusões. Em especial, agradeço ao prof Jorge Terrão e a prof Luciene Motta pela dedicação e atenção prestadas.

Ao Breno, o grande irmão que eu ganhei na Pós-Graduação. Agradeço a Deus por ter além de um ótimo colega de trabalho, um amigo para todas as horas. Seu altruísmo é extraordinário! “*Valeu, mano....*”

À Agata, que com sua habilidade é capaz de fazer proezas num laboratório de Fisiologia...Aprendi muito com você viu... “*Boa tardiiiiinnn*”....

À Isabele e Lis, grandes parceiras dos meus projetos. Obrigado pelo desprendimento em me auxiliar em todas as vezes que precisei. Amigas raras que eu jamais me esquecerei. “*Tu num vale uma cocada....*”

À Marcella e ao Leandro, jovens pesquisadores que tem sede contagiante pelo aprendizado e por ajudar. Agradeço a Deus por ter tido o privilégio ser amigo de pessoas tão especiais. “*Aí mano, se deu mal....*”

Ao Rogério, obrigado pelo auxílio na etapa final. Que seu sucesso na carreira científica seja proporcional a sua dedicação... “*Sombrio...*”

À Camile pela sua sabedoria, paciência e vontade de aprender. Que isso persevere por toda sua jornada científica. “*Obrigado, minha filha!*”

Aos demais amigos do LTCC: Maíne, um exemplo de humildade e simpatia; Bianca e Clarissa; pela disponibilidade e idéias; Neila, Bernah e Vanessa, pelo esforço e ajudas dispensadas; Fernanda, Flávia, Edicléia e Sarah, pela convivência durante esses anos.

Aos amigos do LEMC, minha segunda “casa” no PPGCF.

Aos amigos conquistados nestes últimos anos: Marcelo Baldo, Wellington, Eduardo, Amilcar, Jones, Juliana, Diego, Washington, Alessandra, Eduardo e Fabiana.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Letícia, por vencer comigo cada etapa desde a nossa graduação. Enfim, vencemos meu amor! Obrigado pela paciência, incentivo e apoio incomparável. Te amo!

A Lara, que mesmo tão pequena faz-me refletir constantemente sobre os verdadeiros valores da vida e o desfrutar de cada momento como se fosse o último. Essa vitória também é sua minha filha! Te amo!

Aos meus pais, os quais desde a minha infância não mediram esforços para ver o meu sucesso. Sinceramente, tudo o que eu fizer ou disser será insuficiente para expressar toda minha gratidão pela dedicação, incentivo e cuidado prestados. Amo vocês!

As minhas irmãs Thais e Thássia, que mesmo de longe acompanharam minha luta durante esses anos. A alegria de vocês é contagiante! Amo vocês!

Aos meus sogros José Marques e Fátima e meu cunhado “irmão” Gustavo, pela agradável convivência ao longo desses anos;

Aos meus familiares, vô Amauri, vó Júlia, tio Mauro, Valesca, Washington, Gabriel, Tio Remígio, Tia Regina, Ângelo e Lory, obrigado pela existência de vocês na minha vida!

A minha grande família da igreja batista da praia da costa (IBPC), que me sustenta em orações e em plena comunhão por todos esses anos. Louvo ao Senhor sempre pela vida de vocês.

A todos aqueles que, mesmo na humildade do anonimato, contribuíram para essa vitória.

MENSAGEM

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”

(Louis Pasteur)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 01- Expectativa de longevidade de mulheres e homens americanos.

Figura 02- Metabolismo lipídico, com as várias lipoproteínas envolvidas, suas respectivas apolipoproteínas e seus receptores.

Figura 03- Esquema mostrando as principais camadas de uma artéria de grande e médio calibre.

Figura 04- Estágios da aterosclerose (AT), com adaptação dos desenhos de Stary et al.1995 e Sanz & Fayad, 2008.

Figura 05- Principais hormônios sexuais em mamíferos (adaptado de Czubryt et al., 2006)

Figura 06- Representação esquemática das principais fontes de andrógenos em mamíferos.

Figura 07- Impacto dos hormônios sexuais femininos na aterosclerose (AT). Adaptado de Shufelt e Merz, 2009.

Figura 08- Estudos em modelos animais que avaliaram os efeitos dos andrógenos e estrógenos na aterosclerose.

Figura 09- Principais espécies reativas do oxigênio (ROS).

Figura 10- Conceitos atuais sobre o estresse oxidativo atuando como causa ou consequência da AT.

Figura 11- Características principais das células senescentes que culminam para a trombogênese e AT.

Figura 12- Esquema que mostra a progressão da lesão valvar aórtica, em corte transversal e longitudinal.

Figura 13- Diagrama mostrando como a formação de lesão em camundongos com dieta normal é mais lenta que os animais sob dieta “Western type”. (Adaptado de Javieñ et al., 2004)

Figura 14- Imagem da primeira cinecoronariografia seletiva (coronária direita) do Dr. Mason Sones em 1958 (Ryan, 2002).

Figura 15- Subdivisão dos animais experimentais em dois grupos: C57 e ApoE-KO.

Figura 16- Foto típica mostrando a angiografia adaptada ao camundongo.

Figura 17- Técnica de angiografia adaptada para camundongos para avaliação dos diâmetros internos.

Figura 18- Técnica de angiografia adaptada para camundongos para avaliação dos diâmetros internos.

Figura 19- Imagens típicas da medida de área ventricular esquerda, sob ângulos de 90° e 45°.

Figura 20- Exemplo de análise em face de lesões ateroscleróticas, conforme Paigen e colaboradores (1987) e Daugherty e Rateri (2006).

Figura 21- Esquema simples de eletroforese (SDS-PAGE).

Figura 22- Representação esquemática da transferência de proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose.

Figura 23- Valores dos diâmetros internos em 4 segmentos aórticos (A, B, C, D) observados pela angiografia em camundongos C57 e ApoE.

Figura 24- Velocidade de fluxo (mm/s) obtida através da angiografia em camundongos C57 e ApoE.

Figura 25- Avaliação de diâmetro interno e externo de aorta descendente.

Figura 26- Aortas de camundongos C57 e ApoE fêmeas e machos submetidos ao corte transversal, longitudinal além de corte longitudinal (*en face*) com correlações da hipercolesterolemia.

Figura 27- Gráfico de barras mostrando o grau de regurgitação aórtica (RA) observado pela angiografia nos grupos de camundongos C57 fêmeas) e machos

Figura 28- Gráfico de barras mostrando o grau de regurgitação aórtica (RA) observado pela angiografia nos grupos de camundongos ApoE fêmeas e machos.

Figura 29- Análise de espessura valvar aórtica de camundongos com imagens típicas em cortes transversais de animais C57 e ApoE fêmeas e machos.

Figura 30- Imagens representando válvulas aórticas de camundongos C57 e ApoE submetidos a cortes longitudinais.

Figura 31- Grau de regurgitação aórtica (RA) observado pela angiografia em camundongos C57 ovariectomizadas em comparação com C57 fêmeas e machos.

Figura 32- Grau de regurgitação aórtica (RA) observado pela angiografia em camundongos ApoE ovariectomizadas em comparação com ApoE fêmeas e machos.

Figura 33- Expressão da proteína SERCA2a de coração de camundongos C57 fêmeas e machos.

Figura 34- Expressão da proteína SERCA2a de coração de camundongos ApoE fêmeas e machos.

TABELAS

Tabela 01- Outros fatores envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose (AT), agravados durante o processo do envelhecimento.

Tabela 02- Características importantes que definem as vantagens e desvantagens dos modelos experimentais de AT.

Tabela 03- Tipos de modelos murinos ateroscleróticos associados a outros “genes alvos”, com suas respectivas manifestações fenotípicas da AT.

Tabela 04- Grau de severidade de insuficiência valvar aórtica analisada através da angiografia adaptada para camundongos.

Tabela 05- Efeitos da ovariectomia em fêmeas C57: peso uterino, níveis plasmáticos de estradiol e colesterol

Tabela 06- Efeitos da ovariectomia em fêmeas ApoE: peso uterino, níveis plasmáticos de estradiol e colesterol

Tabela 07- Parâmetros ponderais de teor de água pulmonar, peso cardíaco e área ventricular de camundongos C57

Tabela 08- Parâmetros ponderais de teor de água pulmonar, peso cardíaco e área ventricular de camundongos ApoE

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 <i>Epidemiologia das Doenças Cardiovasculares (DCV).....</i>	20
1.2 <i>Aspectos gerais do metabolismo lipídico.....</i>	22
1.3 <i>Aterosclerose (AT)</i>	25
1.4 <i>Principais fatores de risco que modificam o desenvolvimento da AT e DCV.....</i>	28
1.4.1. Gênero	28
1.4.1.1 Estrógenos.....	29
1.4.1.2 Progestágenos.....	31
1.4.1.3 Andrógenos.....	32
1.4.2 Estresse oxidativo.....	33
1.4.3 Envelhecimento e senescência celular.....	37
1.4.4 Outros fatores envolvidos.....	39
1.5 <i>Valva aórtica: mais um tecido-alvo da AT.....</i>	40
1.6 <i>AT em modelos experimentais.....</i>	42
1.6.1 Aterosclerose em camundongos.....	44
1.6.2 Modelos murinos de aterosclerose geneticamente modificados.....	45
1.6.2.1 O modelo murino ApoE ^{-/-}	45
1.6.2.2 O modelo murino LDL receptor ^{-/-}	47
1.6.2.3 Outros modelos murinos de aterosclerose	48
1.7 <i>Angiografia digital e sua importância na fisiopatologia cardiovascular.....</i>	49
2. OBJETIVOS.....	53
2.1 <i> Gerais.....</i>	53
2.2. <i>Específicos.....</i>	53
.	
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.1 <i> Animais experimentais.....</i>	55
3.2 <i> Ovariectomia.....</i>	56
3.3 <i> Angiografia.....</i>	56
3.4 <i> Coleta de sangue dos animais.....</i>	60

3.5 Dosagem de colesterol plasmático.....	60
3.6 Dosagem de estradiol plasmático.....	60
3.7 Perfusão, coleta de órgãos e tecidos.....	61
3.8 Análises Histológicas.....	61
3.9 Preparação “en face”.....	62
3.10 Senescência vascular aórtica	63
3.11 Deposição lipídica vascular	63
3.12 Expressão de SERCA 2ATPase.....	64
3.13 Análise Estatística.....	67
4. RESULTADOS.....	69
4.1 Angiografia e histologia aórtica em camundongos C57 e ApoE.....	69
4.2 Análises morfométricas em aorta de camundongos C57 e ApoE fêmeas e machos.....	71
4.3 Regurgitação aórtica (RA) em camundongos C57 e ApoE fêmeas e machos.....	73
4.4 Análise valvar aórtica de camundongos C57 e ApoE fêmeas e machos.....	74
4.5 Regurgitação aórtica (RA) em camundongos C57 e ApoE fêmeas ovariectomizadas.....	76
4.5.1 Camundongos C57	76
4.5.2 Camundongos ApoE	78
4.6 Investigação de repercussões fisiopatológicas em órgãos-alvo da RA.....	79
4.6.1 Camundongos C57.....	79
4.6.2 Camundongos ApoE.....	80
5. DISCUSSÃO.....	83
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

LISTA DE ABREVIações

- ABCA1: "ATP Binding Cassete" A1
- ACAT 1: Acil colesterol acetil transferase tipo 1
- ACTH: Hormônio Adrenocorticotrófico
- AR: Receptor androgênico
- AT: Aterosclerose
- ANOVA: Análise de variância
- Apo: Apolipoproteína
- Apo B100: Apolipoproteína do tipo B100
- Apo CII: Apolipoproteína do tipo C II
- Apo E: Apolipoproteína do tipo E
- β -gal: Beta-galactosidase
- bpm: Batimentos por minuto
- CETP: Proteína de transferência de colesterol esterificado
- CEUA: Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais
- COX: Cicloxigenase
- CRH: Hormônio Liberador de Corticotrofina
- DCV: Doenças Cardiovasculares
- DHT: Dihidrotestosterona
- ECL: *Enhanced Chemiluminescent*
- ecSOD: Superoxidodismutase extracelular
- eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial
- EPM: Erro padrão da media
- ER α : Receptor de estrógeno tipo alfa
- ER β : Receptor de estrógeno tipo beta
- ET-1: endotelina
- E1: estrona
- E2: estradiol
- E3: estriol

- FC: Frequência cardíaca
- FSH: Hormônio Folículo Estimulante
- GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofina
- GPER: Receptor estrogênico acoplado a proteína G
- HDL: Lipoproteína de alta densidade
- HE: Hematoxilina-Eosina
- HMGCoA redutase: Hidroxi-metil-glutaril Coenzima A redutase
- HRP: Peroxidase “horseradish”
- HUCAM: Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes
- *i.m.*: Intramuscular
- IDL: Lipoproteína de densidade intermediária
- *i.p.*: Intraperitonal
- kDa: Kilo-dalton
- LCAT: Lecitina colesterol aciltransferase
- LDL: Lipoproteína de baixa densidade
- LDLr: Receptor para LDL
- LDL_{ox}: Lipoproteína de baixa densidade oxidada
- LH: hormônio Luteinizante
- LOX: Lipoxigenase
- LRP: *Receptor-related protein*
- LPL: Lipase lipoprotéica
- mA: Mili ampère
- Mn SOD ; Superoxidodismutase Mitocondrial
- NO: Óxido nítrico
- NOS: Óxido nítrico sintase
- OONO⁻ ou NO₃⁻: Peroxinitrito
- Ovx: Ovariectomia
- P: Progesterona
- PBS: *Phosphate Buffered Saline*
- PCR: Reação da Polimerase em Cadeia

- PGI₂: Prostaciclina
- PLPT : Proteína transferidora de fosfolípidos
- pH: -log [íon hidrogênio]
- PMSF: Fenilmetilsulfonil fluorídrica
- PR-A: Receptor para progesterona do tipo A
- PR-B: Receptor para progesterona do tipo B
- QCA: *Quantitative Coronary Analysis*
- RA: Regurgitação Aórtica
- ROS: Espécies Reativas do Oxigênio
- RPM: Rotações por Minuto
- SC: Senescência Celular
- SR-B1: Receptores hepáticos para HDL
- SDS: Duodecil Sulfato de Sódio
- SDS-PAGE: Gel de eletroforese com poliacrilamida e duodecil sulfato de sódio
- SOD: Superoxidodismutase
- T: Testosterona
- TBS: *Tris Buffered Saline*
- TG: Triglicerídeos
- TM: Tricrômio de Masson
- TXA₂: Tromboxano
- u.d.o.: Unidade de densidade óptica
- V: Volts
- VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa
- VK: Von Kossa
- X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolil- β -D-galactopyranossídeo
- °C: Grau Celsius

Resumo

Apesar de exaustivas evidências sobre as diferenças de desempenho cardiovascular de acordo com a idade, o impacto do gênero associado a senilidade carecem de maiores esclarecimentos. Tais investigações seriam importantes porque as diferenças relacionadas ao gênero no envelhecimento podem explicar, em parte, a maior longevidade das mulheres e fêmeas na maioria dos mamíferos. Nosso objetivo foi investigar em camundongos idosos alterações morfo-fisiológicas relacionadas ao gênero e dislipidemia através da angiografia, análises histológicas e ensaios enzimáticos. Foram usados camundongos de 18 meses de idade, separados nos grupos: C57 (fêmeas:n=26; machos:n=22; ovariectomizadas:n=10) e ApoE (fêmeas:n=28 e machos:n=23; ovariectomizadas: n=7). Após cateterização carotídea, foi realizada a angiografia para análise de diâmetro interno (DI), regurgitação aórtica (RA) entre outros parâmetros. A seguir, os animais foram submetidos a ensaios histológicos ou bioquímicos para detecção de áreas de deposição lipídica (DL), senescência vascular (SV) e colesterolemia. Dados expressos como média \pm EPM e para análise estatística, foram feitos teste t de Student ou ANOVA de 1 via, seguidas de post hoc de Tukey (* $p < 0,05$). A angiografia não detectou diferença entre os graus de DI nos animais C57 e ApoE nem na velocidade de fluxo ($95,4 \pm 6,2$ vs $102 \pm 5,7$ mm/s, respectivamente). Após a histologia, confirmou-se o aumento de diâmetro externo nos animais ApoE (2617 ± 149 mm²) quando comparados ao C57 (1396 ± 159 mm², $p < 0,001$). Quanto à avaliação histoquímica da aorta, apenas os animais ApoE machos apresentaram severa DL (C57 fêmea: 0.11 ± 0.01 , C57 macho: 0.12 ± 0.01 , apoE fêmea: 0.21 ± 0.04 e ApoE machos: $0.35 \pm 0.05^*$ cm²) e SV (0.01 ± 0.008 , 0.016 ± 0.01 , 0.025 ± 0.02 e $0.19 \pm 0.08^*$ cm², respectivamente), havendo uma correlação com a colesterolemia dos grupos C57 (fêmea: 81 ± 4 vs. macho: 96 ± 6 mg/dL) e ApoE (fêmea: $336 \pm 32^*$ vs. macho: $650 \pm 92^*$ mg/dL). Em relação a RA, observou-se um maior grau em machos quando comparados às fêmeas tanto no grupo C57 (fêmea: 0.7 ± 0.24 vs. macho: $3 \pm 0.24^*$) quanto no ApoE (fêmea: 0.8 ± 0.2 vs. macho: $2.3 \pm 0.3^*$). A análise histológica evidenciou uma boa correlação entre RA e espessura valvar, sem repercussões cardíacas patológicas ou compensatórias. Após 12 meses, as fêmeas ovariectomizadas C57 e ApoE não apresentaram qualquer diferença em relação aos respectivos grupos de fêmeas, tanto na DL, SV, colesterolemia ou RA. Portanto, nossos dados sugerem uma importante participação do gênero na progressão das lesões cardiovasculares, mostrando assim que fatores endógenos/genéticos podem ser essenciais para a progressão das doenças cardiovasculares.

Abstract

Although exhausting evidences have investigated age-related differences in cardiovascular performance, the impact of gender on such age-associated cardiovascular changes can be more explained. Such investigations would be important because the gender-related differences in cardiovascular aging may help to explain in part the greater longevity of women and of females of most of the mammalian species. Our aim was to investigate in aged mice morphophysiological alterations related to gender and dyslipidemia through the angiography, histological and enzymatic assays. We studied senescent mice of 18 months of age, separate in the groups: C57 (female: n=26; males: n=22; ovariectomized: n=10) and ApoE (female: n=28 and males: n=23; ovariectomized: n=7). After carotid catheterization, was realized the angiography for analysis of internal diameter (ID), aortic regurgitation (AR) and other parameters. Immediately after, the animals were submitted the histological or biochemical assays for detection of areas of lipid deposition (LD), vascular senescence (VS) and cholesterolemia. Statistical analysis was performed with Student's t or 1-way ANOVA followed by the Tukey *post hoc* test (*p<0,05). The angiography did not show significant differences between C57 and ApoE mice in relation to ID and aortic blood flow velocity ($95,4 \pm 6,2$ vs $102 \pm 5,7$ mm/s, respectively). After the histological analysis, was confirmed the increase of external diameter in ApoE animals (2617 ± 149 mm²) when compared with C57 (1396 ± 159 mm², p<0,001). In the histochemical evaluation of aorta, only the male ApoE animals showed a significantly severity of LD (C57 female: $0.11 \pm 0,01$; C57 male: $0.12 \pm 0,01$; ApoE female: $0.21 \pm 0,04$ and ApoE male: $0.35 \pm 0.05^*$ cm²) and VS (0.01 ± 0.008 , 0.016 ± 0.01 , 0.025 ± 0.02 e $0.19 \pm 0.08^*$ cm², respectively)having a correlation with cholesterolemia of the C57 groups (female: 81 ± 4 vs. male: 96 ± 6 mg/dL) and ApoE groups (female: $336 \pm 32^*$ vs. male: $650 \pm 92^*$ mg/dL). It was a remarkable level of severity of AR in male compared with female both in C57 (female: 0.7 ± 0.24 vs. male: $3 \pm 0.24^*$) and ApoE (female: 0.8 ± 0.2 vs.male: $2.3 \pm 0.3^*$). We found a good correlation between valvular regurgitation and histologically assessed valvular thickness, without pathological or compensatory mechanisms. After 12 months, the C57 and ApoE ovariectomized females did not show difference in LD, VS, cholesterolemia or AR between respective female groups. Therefore, our data suggest an important participation of gender-related differences in cardiovascular aging, showing that endogenous/genetics factors can be essentials for development of cardiovascular diseases.

PREMIAÇÕES DESTE TRABALHO

Prêmio Centrocor (2008): 1º Lugar

Apresentação Oral:

PEREIRA TMC, NOGUEIRA BV, PEÇANHA MAS, PAZOLINI VA, VASQUEZ EC, ARRUDA JA, MEYRELLES SS

Influência dos hormônios sexuais sobre a regurgitação valvar aórtica e senescência vascular em camundongos ateroscleróticos

In: XX Congresso da Sociedade Brasileira de Cardiologia do Espírito Santo, 2008, Domingos Martins-ES

Prêmio Jovem Investigador (2008): Menção Honrosa

Apresentação Oral:

PEREIRA TMC, NOGUEIRA BV, GOMES IBS, MOTTA LL, ARRUDA JA, MEYRELLES SS

Influência dos hormônios sexuais sobre a regurgitação valvar aórtica, deposição lipídica e senescência em camundongos ateroscleróticos

In: II Congresso de Ciências da Saúde da EMESCAM, 2008, Vitória, ES

Prêmio Saúde da Mulher-UNIMED (2007): 1º Lugar

Apresentação Oral:

PEREIRA TMC, PAZOLINI VA, LOURO LPS, ARRUDA JÁ, VASQUEZ EC, MEYRELLES SS

Efeito Protetor dos Hormônios Sexuais Femininos na Insuficiência Valvular Aórtica: análise angiográfica em camundongos

In: I Congresso de Ciências da Saúde da EMESCAM, 2007, Vitória, ES

Publicação em resumo expandido:

PEREIRA TMC, PAZOLINI VA, LOURO LPS, NOGUEIRA BV, ARRUDA JÁ, VASQUEZ EC, MEYRELLES SS

Influence of gender on the aortic valvular regurgitation and vascular senescence in atherosclerotic mice

In: Hypertension Berlin Congress, 2008, Berlin- Germany

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia das Doenças Cardiovasculares (DCV)

Nos últimos trinta anos, as doenças cardiovasculares (DCV) têm apresentado crescimento relativamente rápido e substancial em todo o mundo, gerando atualmente cerca de 18 milhões de mortes/ano, sobretudo nos países em desenvolvimento como o Brasil (Barreto et al., 2003). Além de importante causa de mortalidade, as DCV também representam uma grande relevância em termos de morbidade, liderando a lista de causas ordenadas pelo indicador de anos de vida vividos com incapacidade, conhecido como DALY* (*Disability Adjusted Life Years Lost*).

Mesmo diante de tantos avanços terapêuticos na área cardiovascular ao longo das últimas décadas, de acordo com as projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS), essa forte repercussão sobre o padrão de morbimortalidade tende a persistir: o crescimento da população idosa associado ao contemporâneo estilo de vida da sociedade como sedentarismo, dietas hiperglicídicas e/ou hiperlipídicas, baixo consumo de frutas, fibras e verduras são fatores de risco que só contribuem para a consolidação desses dados epidemiológicos (Beaglehole et al., 2001; Barreto et al., 2003; Ignarro et al., 2007; IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, 2007; Sanz e Fayad, 2008).

Dentre os fatores de risco supracitados, o envelhecimento (por não ser modificável) pode ser um dos mais relevantes. No decorrer das décadas de vida, há transformações substanciais na estrutura e função do sistema cardiovascular do indivíduo, cujas alterações associam-se ou agravam-se com condições fisiopatológicas diversas como a hipertensão, insuficiência cardíaca crônica e aterosclerose (AT). Entretanto, mulheres vítimas de infarto agudo do miocárdio ou doenças coronarianas possuem menores complicações em comparação aos homens, cujos dados não podem ser facilmente explicados por um simples ajuste de idade (Pepine et al., 2006; Shaw et al., 2006; Meyer et al., 2008). Outro dado interessante é que a deterioração senil do sistema cardiovascular parece não ocorrer de forma proporcional em homens e mulheres (Kalin e Zumoff, 1999; McGrath et al., 2008) modificando sensivelmente sua expectativa de longevidade conforme exemplo na figura 01, baseado em estudos de países desenvolvidos (Eckardstein e Wu, 2003; Isidori

et al., 2005; Otto, 2007). Ademais, esses maiores índices de longevidade não são privilégios da espécie humana, já que grande parte das fêmeas na maioria das espécies de mamíferos apresentam perfis semelhantes (Forman et al., 1997). Mesmo diante de dados tão claros, o impacto do gênero sobre as alterações cardiovasculares durante o envelhecimento permanecem incompletamente delineados. Dessa forma, surge a necessidade de investigações mais pormenorizadas sobre os fatores que influenciam as DCV na senilidade.

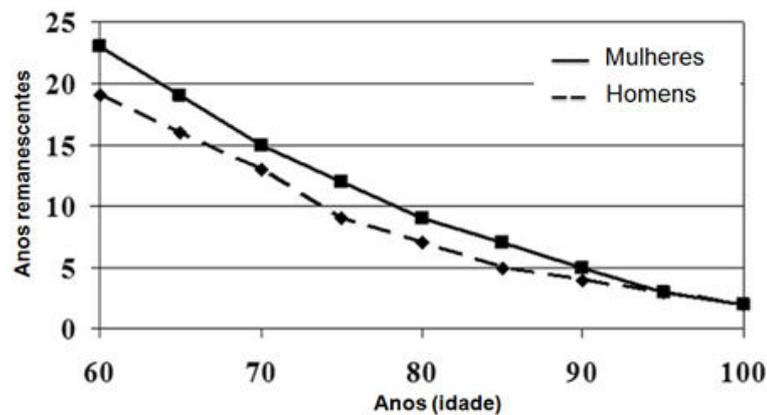


Figura 01. Expectativa de longevidade de mulheres (linha cheia) e homens (linha tracejada) baseando-se na idade dos indivíduos americanos. Adaptado de Otto, 2007.

No contexto dessa sociedade contemporânea, a maior parte das complicações cardiovasculares derivam da doença de base, a aterosclerose (AT) (McGrath et al., 2008). Doenças isquêmicas cardíacas e doenças cerebrovasculares são, em sua maioria, manifestações clínicas da AT sendo responsável inclusive por 50% de todas as mortes na sociedade ocidental (Luis et al., 2000; *American Heart Association*, 2004). Ainda que diversas disordens genéticas entre outros fatores externos sejam conhecidos para a gênese e o desenvolvimento da AT, ainda não são completamente entendidos os seus mecanismos fisiopatológicos por se tratar de um fenômeno repleto de moléculas e células, possuindo assim etiologia e consequências bastante complexas, inclusive de acordo com o gênero (Stocker e Keaney, 2003; Liu et al., 2003). Sendo uma doença multifatorial e ao mesmo tempo completamente integrada - acrescido de um dinamismo de informações imensurável- nessa introdução será necessário abordar aspectos bioquímicos, fisiopatológicos e

experimentais para promover uma discussão mais coerente de acordo com o trabalho proposto.

1.2 Aspectos gerais do metabolismo lipídico

Por apresentarem essencialmente uma natureza hidrofóbica, os lipídeos não podem ser carreados livremente pelo meio aquoso plasmático. Para que isso ocorra, as lipoproteínas auxiliam na solubilização e conseqüentemente no transporte dos fosfolipídeos, triglicerídeos (TG) e colesterol. As lipoproteínas são compostas por lipídeos e proteínas denominadas apolipoproteínas (Apo) as quais têm diversas funções no metabolismo das lipoproteínas, como a formação intracelular das partículas lipoprotéicas (Apo B100 e B48), como ligantes a receptores de membrana (Apo B100 e E), ou como co-fatores enzimáticos- Apo CII, CIII e AI (Lusis et al., 2004; Nelson & Cox, 2005).

Predominantemente, existem quatro grandes classes de lipoproteínas separadas em dois grupos principais: 1) as ricas em TG, maiores e menos densas, representadas pelos quilomícrons, de origem intestinal, e pelas lipoproteínas de densidade muito baixa ou “very low density lipoprotein” (VLDL), de origem hepática; e 2) as ricas em colesterol de densidade baixa “low density lipoprotein” (LDL) e de densidade alta ou “high density lipoprotein” (HDL). Existe ainda uma classe de lipoproteínas de densidade intermediária ou “intermediary density lipoprotein” (IDL) e a lipoproteína (a) [Lp(a)], que resulta da ligação covalente por pontes dissulfeto de uma partícula de LDL à Apo(a). Embora a função fisiológica da Lp(a) não seja totalmente conhecida, em estudos mecanísticos e observacionais ela também tem sido associada à formação e progressão da placa aterosclerótica. Infelizmente, por dificuldades técnicas laboratoriais sua utilização como marcador da doença aterosclerótica é limitada (Duriez et al., 1996; Ellington e Kullo IJ, 2008) e em animais experimentais alguns resultados têm sido contraditórios (Kronenberg et al., 1999).

Os quilomícrons são responsáveis pelo transporte dos lipídeos absorvidos pelo intestino, originários da dieta e da circulação entero-hepática.

No fígado, o conteúdo de colesterol é regulado por três mecanismos principais: a) síntese intracelular do colesterol; b) armazenamento após esterificação; c) excreção pela bile. Na luz intestinal, o colesterol é excretado na forma de metabólitos ou como ácidos biliares. Metade do colesterol biliar e aproximadamente 95% dos ácidos biliares são reabsorvidos e retornam ao fígado pelo sistema porta (circulação êntero-hepática).

O transporte de lipídeos de origem hepática ocorre por meio das VLDL, IDL e LDL, conforme figura 02. Os TG das VLDL, assim como os dos quilomícrons, são hidrolisados pela lipase lipoprotéica para que os ácidos graxos sejam liberados para os tecidos e finalmente metabolizados. Por ação da lipase lipoprotéica, os quilomícrons e as VLDL, progressivamente depletados de TG, recebem a denominação de “remanescentes”, os quais podem ser captados pelo fígado através interação da ApoE com o receptor de LDL (apoB/E receptor) ou LRP (*receptor-related protein*). Uma parte das VLDL dá origem às IDL, que são removidas rapidamente do plasma também pelos receptores de LDL (Lusis et al., 2004). O processo de catabolismo continua, envolvendo a ação da lipase hepática que resulta nas LDL, as quais permanecem por longo tempo no plasma. Esta lipoproteína tem um conteúdo apenas residual de TG uma vez que é composta principalmente de colesterol e uma única apolipoproteína, a Apo B100, cuja função é interagir com os receptores de LDL, atuando indispensavelmente no “uptake” do LDL. Diante de uma longa meia-vida do LDL, uma menor expressão desses receptores pode causar um incremento substancial dos níveis séricos de colesterol. Outra proteína que contribui para o controle do colesterol endógeno é a hidroximetilglutaril (HMG) CoA redutase, uma enzima-chave intracelular para síntese do colesterol hepático que quando inibida, torna-se um dos pontos-chave para a diminuição dos níveis de LDL plasmáticos (Sabine e James, 1976; Quintão, 1994; Strippoli et al., 2009).

No interior das células, independentemente da via exógena ou endógena de obtenção, o colesterol livre pode ser esterificado para depósito por ação da enzima acil colesterol-acil transferase (ACAT). No plasma, as VLDL também remanejam TG por ésteres de colesterol com as HDL e LDL por intermédio da ação da proteína de transferência de colesterol esterificado ou “cholesterol ester transfer protein” (CETP) (Quintão, 1995; Le Goff et al., 2004;

Ruggeri, 2008). Em camundongos isso não ocorre, uma vez que a CETP não é expressa (Xu, 2006).

Em paralelo, as partículas de HDL são formadas no fígado, no intestino e na circulação e seu principal conteúdo protéico é representado pelas Apo E, A-I e A-II, conforme Figura 02 (Lusis et al., 2004). O colesterol livre da HDL, recebido das membranas celulares, é esterificado por ação da lecitina-colesterolaciltransferase (LCAT). A apo A-I, principal proteína da HDL, atua como co-fator dessa enzima. O processo de esterificação do colesterol, que ocorre principalmente nas HDL, é fundamental para sua estabilização e transporte no plasma, no centro desta partícula. Finalmente, para que haja o transporte reverso do colesterol, a HDL transporta esse conteúdo dos tecidos periféricos até o fígado onde este é captado pelos receptores SR-B1. Neste transporte, é importante a ação do complexo "ATP Binding Cassete" A1 (ABCA1) que facilita a extração do colesterol dos tecidos periféricos pelas HDL. A HDL também tem outras ações que contribuem para a proteção do leito vascular contra a aterogênese, tais como a remoção de lipídeos oxidados da LDL, a inibição da fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio além de estimulação da liberação de óxido nítrico (Tall, 2008).

Além das diferenças de tamanho, densidade e composição química, as lipoproteínas podem também diferir entre si através da modificação *in vivo* principalmente por mecanismos de oxidação ou glicação. Tais modificações influenciam seu papel no metabolismo lipídico e no processo de desenvolvimento da aterosclerose, conforme veremos nos itens subsequentes.

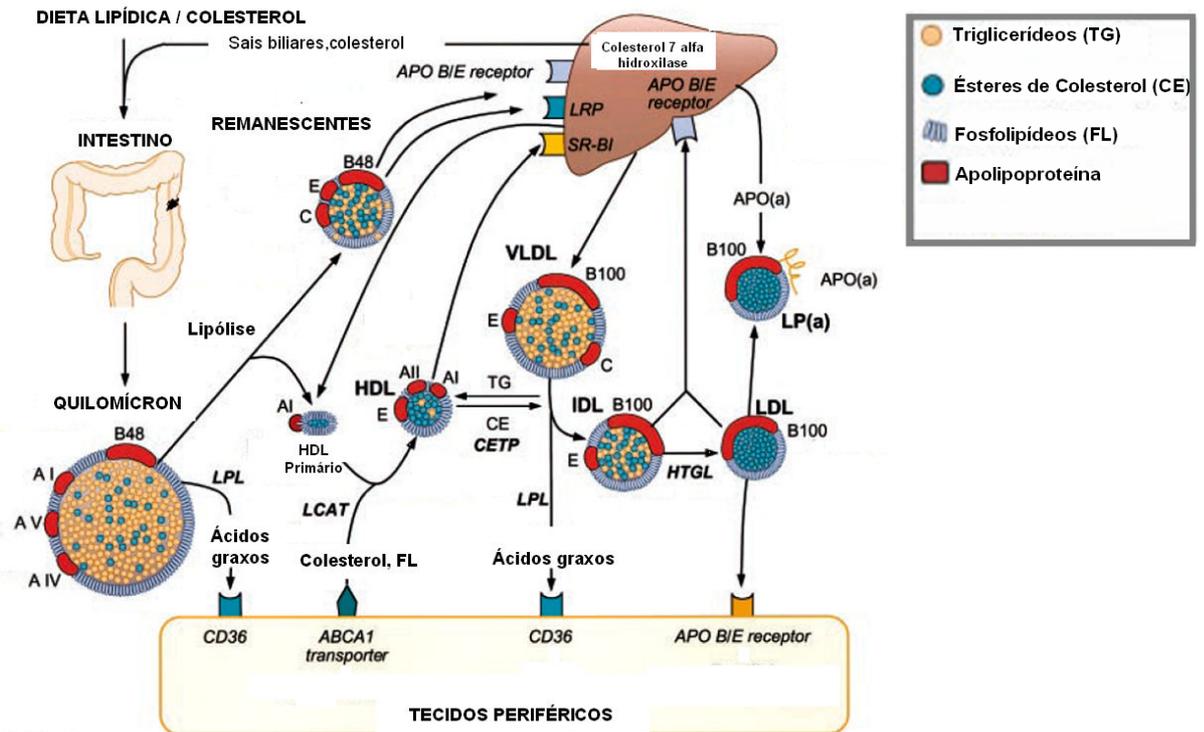


Figura 02. Metabolismo lipídico, com as várias lipoproteínas envolvidas, suas respectivas apolipoproteínas e seus receptores. Após absorção intestinal, o conteúdo lipídico é direcionado aos quilomícrons os quais são secretados no sistema linfático e atingem a corrente sanguínea apenas na cava superior, através do ducto torácico. Já na circulação, os TG são hidrolisados através da ação da lipase lipoprotéica (LPL) e os quilomícrons remanescentes captados no fígado pela interação da ApoE com o receptor de LDL (apoB/E receptor) ou LRP (receptor-related protein). Paralelamente durante a lipólise, parte da superfície dos fosfolipídeos e das proteínas dos quilomícrons são remanejadas para dar origem aos precursores de HDL. Enquanto isso, hepatócitos redistribuem os TG e ésteres de colesterol para as partículas de VLDL. Mais uma vez a LPL atua na remoção dos ácidos graxos desse conteúdo e consequentemente formando a IDL, que pode ser captada pelo receptor de LDL ou sofrer uma lipólise parcial pela ação da lipase hepática (HTGL-hepatic triglyceride lipase) para produzir LDL. Essa lipoproteína é composta por uma única apolipoproteína, a ApoB100, cuja função é permitir a interação com o receptor de LDL e ser finalmente depurada. Como a cinética do “uptake” é lenta, essa lipoproteína constitui a principal partícula carreadora de colesterol na maioria dos indivíduos. A LDL também pode complexar com a Apo(a) para formar as partículas denominadas Lp(a), as quais podem também apresentar potencial aterogênico. As partículas de HDL são formadas na circulação através das Apo A1 e A2 secretadas pelo fígado ou intestino e pela superfície dos quilomícrons ou VLDL durante a lipólise. Os precursores de HDL captam colesterol de vários tecidos através da interação com o transportador ABCA1 seguido de posterior esterificação pela lecitina-colesterolaciltransferase (LCAT). Os lipídeos podem ser transferidos entre lipoproteínas através da ação da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) e a proteína transferidora de fosfolipídeos (PLTP). Adaptado de Lusis et al., 2004 e IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, 2007.

1.3 Aterosclerose

A morfologia de um segmento arterial apresenta três camadas concêntricas que circundam o seu lúmen: 1) camada endotelial (íntima), 2) camada de músculo liso (médica) e 3) a mais externa, denominada adventícia. Os intervalos entre as respectivas camadas são demarcadas por camadas concêntricas de elastina, chamadas de lâmina elástica interna e lâmina elástica externa, conforme Figura 03.

A aterosclerose (AT) é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de grande e médio calibre (IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, 2007).

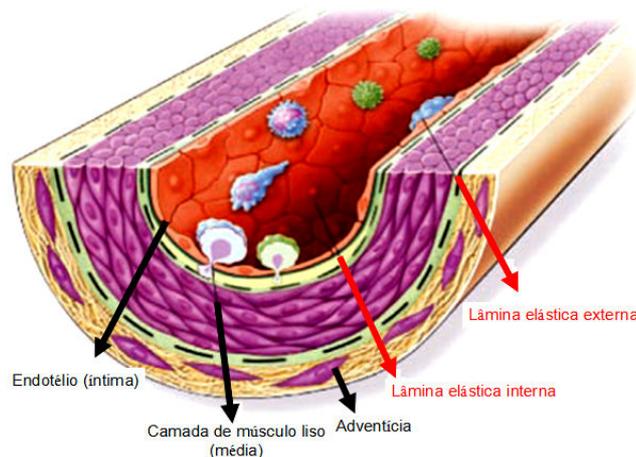


Figura 03. Esquema mostrando as principais camadas de uma artéria de grande e médio calibre. Adaptado de Stocker and Kearney, 2003.

Normalmente, a formação da placa aterosclerótica inicia-se diante de uma agressão contínua ao endotélio gerada pelo *shear stress* (induzida pela hipertensão arterial) que quando associada ao *stress* oxidativo e à elevação de lipoproteínas aterogênicas (LDL, IDL, VLDL ou quilomícrons remanescentes) a formação da placa pode ser acelerada (Stocker e Kearney, 2003; Lusis et al., 2004; Ignarro et al., 2007; Botham, 2008). O interessante é que existe uma conexão plena entre esses “três pilares” da gênese da AT, os quais potencializam-se quando associados: o endotélio disfuncionante aumenta a permeabilidade intimal às lipoproteínas plasmáticas favorecendo inclusive a retenção das mesmas no espaço subendotelial. Retidas, principalmente as partículas de LDL sofrem oxidação, formando as LDL_{ox}, ocasionando: a) menor capacidade de depuração plasmática por diminuir sua afinidade com

receptores de LDL ao mudar a estrutura da Apo B100 (Esterbauer et al., 1990); b) toxicidade para o endotélio (Engler et al., 2003; Botham, 2008); c) exposição de diversos neo-epítomos, tornando-as mais quimioatraentes para a diapedese de monócitos (pelo *up regulation* de moléculas de adesão leucocitárias) e mais imunogênicas para macrófagos (Brown e Goldstein, 1983; Jialal e Devaraj, 1996; Botham, 2008). Portanto, o depósito de lipoproteínas na parede arterial bem como sua oxidação, processo-chave no início da aterogênese, ocorre de maneira proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma, retroalimentando assim a lesão endotelial, evidenciando assim uma interação cíclica da AT (Wilkinson e Cockcroft, 2007).

Um fator agravante do processo é que os macrófagos repletos de ésteres de colesterol e lipídeos provenientes das LDL_{ox} perdem a capacidade plena de digestão intracelular do conteúdo fagocitado, visto que alguns desses compostos inibem a ação de suas catepsinas lisossomais (Hoppe et al., 1994), favorecendo assim a formação das células espumosas (*foam cells*). Este grupo celular é o principal componente das estrias gordurosas e lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (Stocker e Keaney, 2003). Geralmente em humanos, essas estrias gordurosas iniciam-se na aorta na primeira década de vida, nas coronárias na segunda década e finalmente nas artérias cerebrais na terceira ou quarta décadas (Lusis et al., 2000; Stocker e Keaney, 2003).

Após a formação das *foam cells*, a próxima etapa é a produção de mediadores inflamatórios que estimulam a migração e proliferação das células musculares lisas da camada média. Estas, ao migrarem para a íntima, passam a produzir não só citocinas e fatores de crescimento, como também matriz extracelular que formará parte da capa fibrótica da placa aterosclerótica. (Sanz e Fayad, 2008)

A placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico. Estes elementos formam na placa aterosclerótica o núcleo lipídico, rico em colesterol e a capa fibrosa, rica em colágeno (Lusis, 2000). As placas estáveis caracterizam-se por predomínio de colágeno, organizado em capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico de proporções menores. As instáveis apresentam atividade inflamatória intensa, especialmente nas suas bordas laterais, com grande atividade proteolítica,

núcleo lipídico proeminente e capa fibrótica tênue. A ruptura desta capa expõe material lipídico altamente trombogênico, levando à formação de um trombo sobrejacente. Este processo, também conhecido por aterotrombose, é um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose como infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral ou morte súbita (Ward et al, 2000; Jormsjö et al, 2002; Pasterkamp & Smits, 2002). A figura 04 resume todos os estágios previamente descritos da AT.

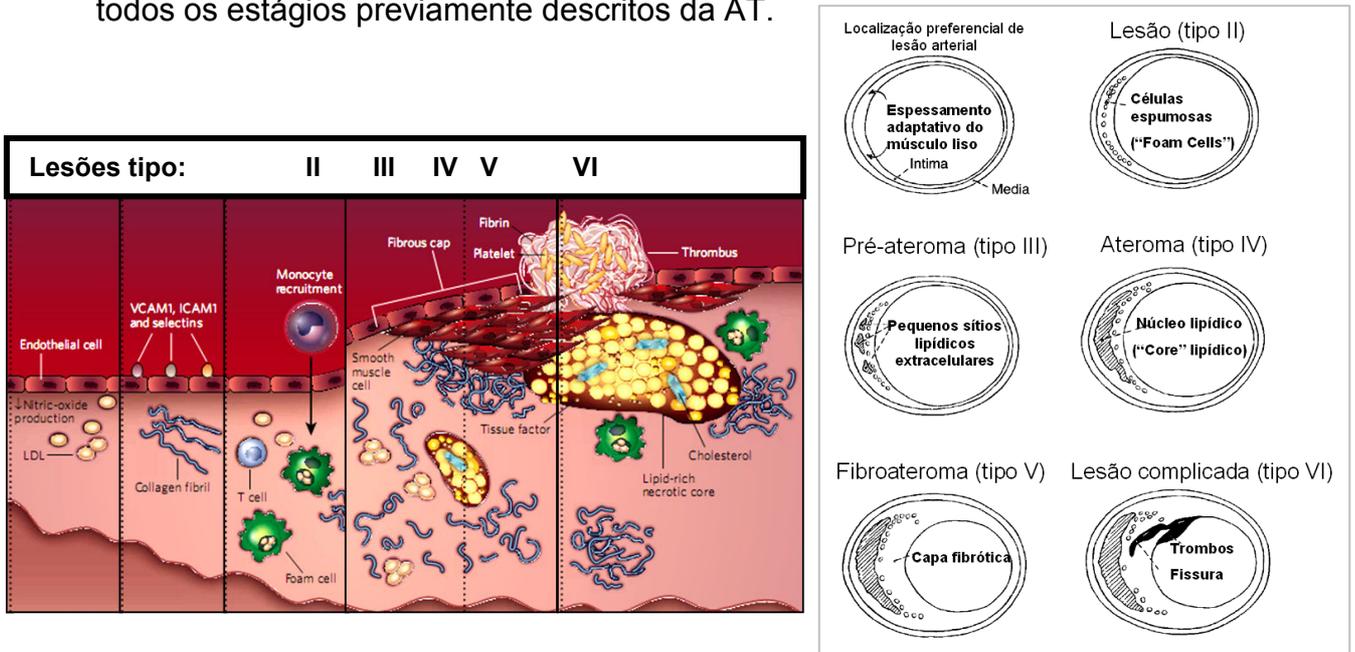


Figura 04. Estágios da aterosclerose (AT), com adaptação dos desenhos de Stary et al.1995 e Sanz & Fayad, 2008. A partir dessas figuras, é possível correlacionar a progressão diante de uma visão longitudinal e transversal simultaneamente, a qual foi subdividida em 6 estágios, culminando finalmente com ruptura de placa e trombose associada.

1.4 Principais fatores de risco que modificam o desenvolvimento da AT e DCV

1.4.1. Gênero

Diversos trabalhos mostram diferenças quanto à severidade e incidência de DCV quanto ao gênero. Há maior incidência em homens que em pré-menopausadas com a mesma idade (Barrett-Connor e Bush, 1991; Wenger et al., 1993; Prencipe et al., 1997; Jousilahti et al., 1999; Lloyd-Jones et al., 1999; McGrath et al., 2008), com risco dobrado de DCV quando comparado com as mulheres até os 60 anos (Nathan e Chaudhuri, 1997; McMahan et al., 2005; Meyer et al., 2008), sugerindo dessa forma que as mulheres seriam protegidas previamente durante sua vida por hormônios sexuais (Miller e Duckles, 2008). Mediada por estrógenos, progestinas e andrógenos (Figuras 05 e 06) esses hormônios podem exercer influência sobre a função cardiovascular por mecanismos genômicos ou não genômicos (Czubryt et al., 2006) cujas principais características e efeitos cardiovasculares serão pormenorizados nos subitens a seguir

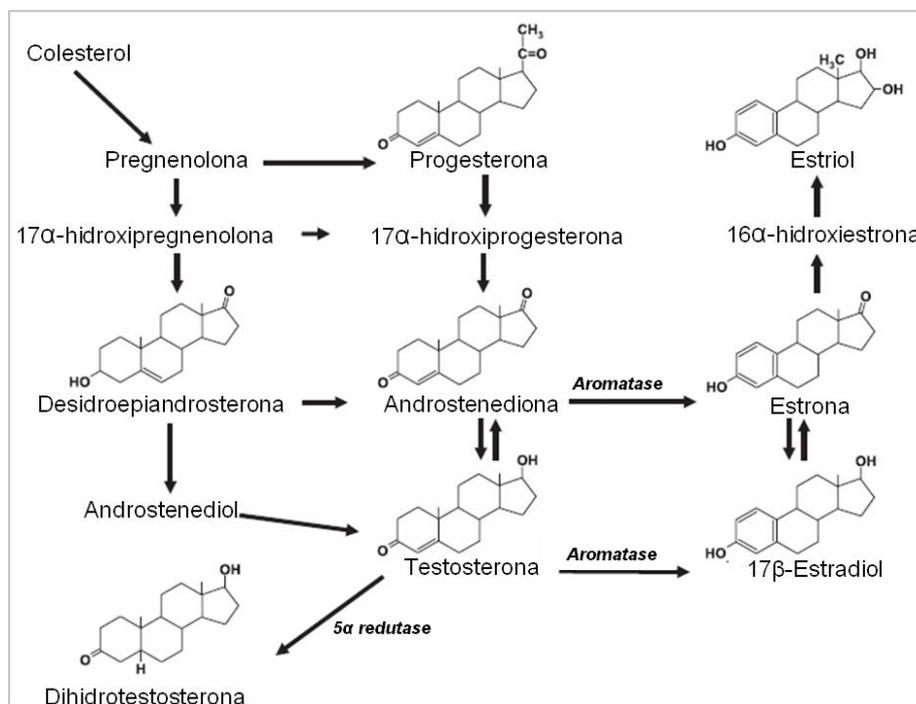
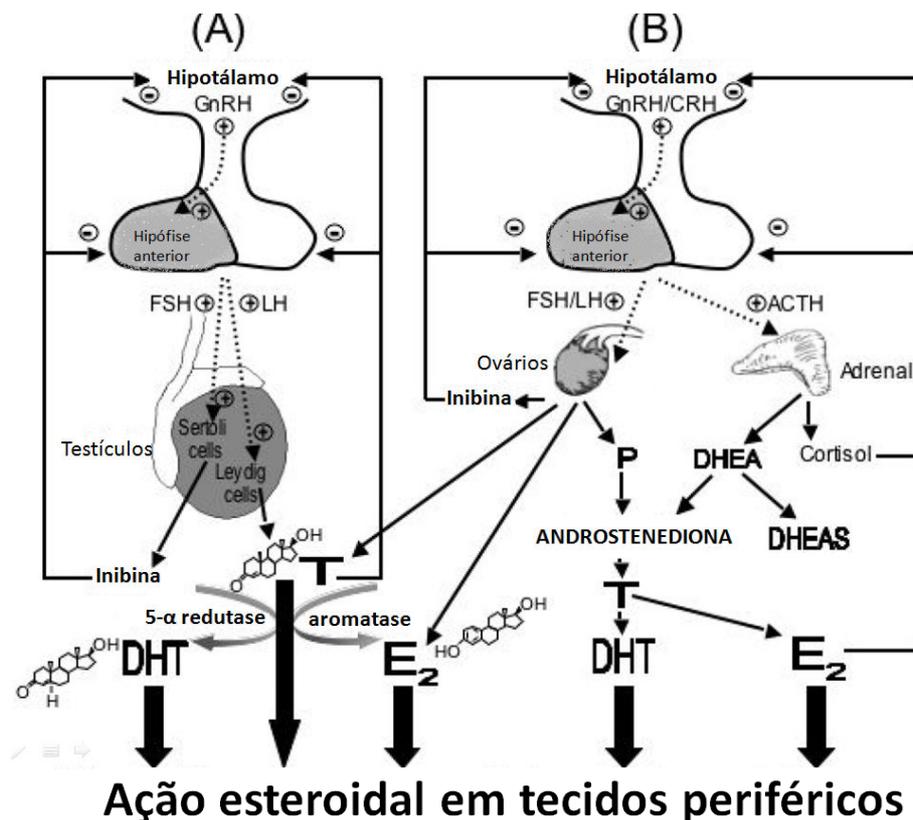


Figura 05. Principais hormônios sexuais em mamíferos (adaptado de Czubryt et al., 2006)



Ação esteroidal em tecidos periféricos

Figura 06. Representação esquemática das principais fontes de andrógenos em mamíferos. (A) Eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal em machos mostrando a liberação pulsátil de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina), FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante). O LH estimula os testículos para produzir T (testosterona) e o FSH estimula a produção de inibina, exercendo *feedback* negativo juntamente com a T. Sob ação da 5- α redutase, a T pode ser convertida em DHT (dihidrotestosterona) e sob ação da aromatase a T pode ser convertida em E2 (estradiol). (B) Eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal em fêmeas mostrando os principais locais de síntese de andrógenos em fêmeas em ovários (testosterona, estradiol e progesterona) e supra-renais (desidroepiandrosterona). A inibina produzida pelos ovários, o cortisol, E2, P (progesterona) e andrógenos adrenais exercem efeito de *feedback* negativo para regular a secreção de GnRH, CRH, FSH, LH e ACTH (Adaptado de McGrath et al., 2008).

1.4.1.1 Estrógenos

Ainda que o estrogênio interfira na função cardiovascular modulando aspectos fisiopatológicos e apresentando implicações terapêuticas em potencial, o impacto da exposição ao estrogênio na prevenção ou tratamento de DCV é ainda controverso (Roeters van Lennep et al., 2002; Miller e Duckles, 2008; Meyer et al., 2008). Inclusive, recentemente alguns estudos clínicos têm demonstrado resultados negativos quanto a proteção cardiovascular em

pacientes sob terapias de reposição hormonal estrogênica (Nair e Herrington, 2000; Hendrix et al., 2006) apresentando em alguns casos até aumento do risco cardiovascular (Rossouw et al., 2002; Miller e Duckles, 2008). Na tentativa de justificar esses dados, outros autores afirmam que tal proteção só aconteceria ao longo da vida reprodutiva e que a reposição na menopausa não poderia contribuir de fato para uma maior proteção (Meyer et al., 2008).

Os estrógenos principais produzidos por mamíferos são: estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e estriol (E3), gerados tanto em fêmeas quanto em machos. Entretanto, em humanos, o nível estrogênico é sete vezes maior em premenopausadas que em homens e mulheres menopausadas, prevalecendo o E2 como o fundamental representante assim como em camundongos. Mesmo assim, todos os 3 tipos de estrógeno apresentam ações cardiovasculares podendo exercer impactos sobre a manifestação de doenças (Czubryt et al., 2006).

Quanto aos receptores estrogênicos (ER- *estrogen receptors*), inicialmente dois principais foram identificados, denominados ER α e ER β . Trata-se de uma superfamília de receptores classicamente denominados como “acoplados ao núcleo”, capazes de interagir com diferentes genes em distintas localizações cromossômicas (Dahlman-Wright et al., 2006). Além do núcleo celular, esses receptores podem ser encontrados na membrana plasmática, na mitocôndria de células endoteliais e células musculares lisas, atuando como fatores de transcrição após ativação estrogênica (Kuiper et al., 1996; Mendelsohn e Karas, 1999; Orshal e Khalil, 2004; Stirone et al., 2005). Enquanto o receptor ER α regula a diferenciação e proliferação das células musculares lisas, o ER β é a forma predominante expressa na musculatura lisa humana, principalmente em mulheres, participando na modulação do tônus vascular (Montague et al., 2006; Miller e Duckles, 2008). Posteriormente, mais um receptor presente no leito vascular foi identificado, denominado GPER (ou GPR30), um tipo de receptor estrogênico acoplado à proteína G, localizado em retículos endoplasmáticos de células musculares lisas arteriais e venosas, com funções ainda não muito bem esclarecidas (Haas et al., 2007).

Embora haja evidências de que o estrogênio altere a anatomia vascular acometida por lesões ateroscleróticas que ocorrem ao longo de meses em camundongos (ou décadas em humanos), os mecanismos moleculares durante

os estágios de desenvolvimento da AT não são claros. (Czubryt et al., 2006; Miller e Duckles, 2008). Até o presente, existem algumas evidências recentes de que o estresse oxidativo possa contribuir diretamente nesse fenômeno, modulando a biodisponibilidade de NO, melhorando a hemodinâmica vascular (Orshal e Khalil, 2004; Krause et al., 2006; Miller et al., 2007). Sabe-se que a liberação de NO endotelial é maior em artérias de fêmeas em comparação aos machos (Kauser e Rubanyi, 1994; Knot et al., 1999) e que em humanos a produção desse vasodilatador é maior em mulheres premenopausadas do que em homens (Forte et al., 1998). Portanto, diante do menor estresse oxidativo (e menor oferta de $\cdot\text{O}_2^-$) haveria maior biodisponibilidade de NO (devido menor formação de OONO^-), oferecendo uma ação protetora sobre o leito vascular (Miller et al., 2007). Outros efeitos também já descritos foram: 1) atividade hipolipemiante, 2) aumento da produção de prostaciclina (PGI_2), 3) estimulador de angiogênese e crescimento de células endoteliais, 4) atividade anti-inflamatória (Czubryt et al., 2006; Miller e Duckles, 2008).

Muitos estudos investigaram os efeitos dos estrógenos sobre o desenvolvimento de DCV tanto em animais como em humanos. Em 1996, Bourassa mostrou em machos, a proteção do E2 contra a formação de lesões ateroscleróticas. Em humanos, a coorte do *Framingham Heart Study* também publicou que elevados níveis de E2 estariam associados com menor risco de eventos cardiovasculares em idosos (Arnlov et al., 2006). Em contrapartida, estudos por imagem mostraram que a progressão da espessura de artérias carótidas em homens não estaria associada ou não haveria nem uma correlação positiva com os níveis plasmáticos de E2 (Muller et al., 2004; Makinen et al., 2005), sendo encontrado até correlações negativas entre E2 e remodelamento vascular (Tivesten et al., 2007).

1.4.1.2 Progestágenos

O progestágeno principal é a progesterona a qual interage também com dois tipos de receptores citosólicos, o PR-A e o PR-B (Hirata et al., 2003; Orshal e Khalil, 2004). Proveniente da pregnenolona, a progesterona é produzida por machos e fêmeas, embora os níveis sejam 60 vezes mais elevados em premenopausadas que em homens ou em mulheres menopausadas (Czubryt et al., 2006).

A função da progesterona no sistema cardiovascular tem sido estudada de uma forma menos intensa que os estrógenos, embora haja evidências de que também contribua para a regulação da função cardíaca e vascular, nem sempre de forma benéfica. Como os ER's, os PR's são também expressos em cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos, atuando como importante regulador de síntese protéica (Goldstein et al., 2004; Grohe et al., 1997) além de possuir uma capacidade exclusiva dos hormônios esteroidais: ligam-se especificamente aos receptores muscarínicos cardíacos M2 (Klangkalya e Chan 1988; Wilkinson et al. 1992). Quanto ao leito vascular, existem evidências sobre possíveis efeitos pró-oxidantes nas células vasculares (Wassmann et al., 2005), alteração dos níveis de HDL, diminuição da oferta de NO levando a um aumento da reatividade vascular (Shufelt e Merz, 2009) ou aumento da oferta de NO apenas em leito coronariano, possuindo distintas ações “tecido dependente” inclusive em processos patológicos (Guo et al., 2005; Miller et al., 2007).

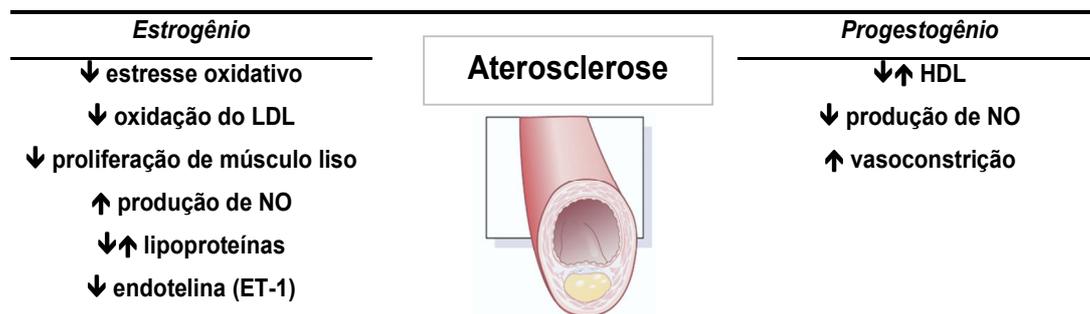


Figura 07. Impacto dos hormônios sexuais femininos na aterosclerose (AT). Adaptado de Shufelt e Merz, 2009.

1.4.1.3 Andrógenos

A testosterona e dihidrotestosterona e o fraco agonista androstenediona são também gerados em machos e fêmeas (testículos ou ovários e supra-renais respectivamente), embora os níveis de testosterona sejam 14 vezes mais elevados em machos (Czubryt et al., 2006). Os receptores andrógenos estão localizados também em células endoteliais e musculatura lisa (Orshal e Khalil, 2004; Miller et al., 2007). Sob a ação da 5 α redutase, a testosterona pode ser convertida em dihidrotestosterona, conhecido como o mais potente dos andrógenos.

A transdução de sinais pelos andrógenos devem-se aos seus receptores citosólicos denominados AR (*androgen receptor*). Quando ligados ao seu respectivo agonista, translocam-se para o núcleo permitindo ligações em específicas sequências de DNA (Cleassens et al., 2000). Os AR são expressos em corações humanos, estando aumentados durante a hipertrofia cardíaca (Thum e Borlak, 2002).

Os andrógenos podem estar envolvidos no desenvolvimento da hipertensão (Reckelhoff, 2005) embora haja amplas evidências de que possam exercer ações benéficas no sistema vascular como vasodilatação, melhora do perfil lipídico e efeitos protetores sobre diante de lesões vasculares independente da conversão em estradiol pela aromatase (Liu et al., 2003; Meyer et al., 2008). Inclusive, baixos níveis circulantes de testosterona parecem estar associados com aumento do risco de dislipidemia, obesidade, hiperglicemia e doenças arteriais em humanos (Hak et al., 2002; Choi e McLaughlin, 2007).

Diante da heterogeneidade de evidências em animais experimentais (conforme representado na figura 08), ainda são necessários mais estudos para melhor entendimento dos efeitos dos hormônios endógenos sexuais na AT e, assim, definir seu papel nas diferenças entre gêneros no tocante a etiologia e fisiopatologia de DCV ou no envelhecimento (Meyer et al., 2008).

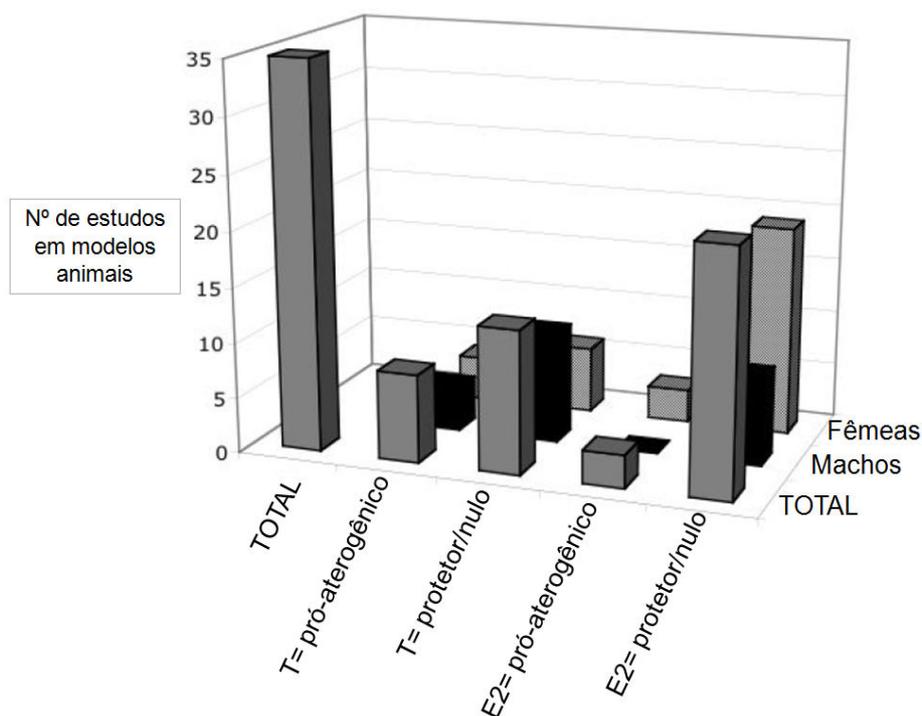


Figura 08. Estudos em modelos animais que avaliaram os efeitos dos andrógenos e estrógenos na aterosclerose. O número total de animais estão representados nas barras sólidas em cinza. Em preto, estão representados apenas os estudos em machos e em cinza (ao fundo) estão representados os estudos em fêmeas. T= testosterona; E2= estradiol. Adaptado de McGrath et al, 2008.

1.4.2 *Estresse oxidativo*

Chance e colaboradores (1979) abordam em uma revisão pela primeira vez sobre a possibilidade das células mamárias gerarem espécies reativas do oxigênio ou ROS (*reactive oxygen species*) através do metabolismo celular do O₂. Mais recentemente, mostrou-se que enzimas envolvidas na produção e remoção de ROS são expressas e funcionalmente ativas em diversos tecidos (inclusive em células vasculares) sob condições fisiológicas. Tal produção intencional de ROS parece ser importante para promover uma função vascular normal, atuando como moléculas de sinalização celular, desde a proliferação de células musculares lisas até o controle de seu tônus (Clempus e Griendling, 2006; Miller et al., 2007).

Normalmente, a quantidade e a magnitude de formação de espécies oxidantes são balanceadas pela sua taxa de metabolização ou eliminação. Entretanto, quando as células chegam a um limite da capacidade antioxidante, pode haver um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, ocorrendo o fenômeno conhecido como *estresse oxidativo*, induzindo conseqüentemente a um dano celular (Sies, 1991; Touyz, 2004). Trata-se de um importante fator para a iniciação e progressão de muitas doenças vasculares incluindo hipertensão, aterosclerose e acidentes vasculares (Cai et al., 2000; Madamanchi et al., 2005).

Em mamíferos, a fonte de produção de ROS são as NADPH oxidases, a cadeia transportadora mitocondrial de elétrons, a família das óxido nítrico sintases (NOS), as enzimas metabolizadoras do ácido araquidônico (ciclooxigenases [COX], lipoxigenases [LOX] e citocromo P450 [CYP450]) e a xantina oxidase (Miller et al., 2007). Entretanto, há evidências de que as NADPH oxidases sejam a fonte principal de produção de ROS no sistema cardiovascular (Griendling et al., 1994; Miller et al., 2005). As ROS normalmente interagem com compostos de baixo peso molecular como

enzimas antioxidantes ou co-fatores enzimáticos, lipídeos, proteínas, ácidos nucléicos e carboidratos. Como consequência, um novo radical é gerado, podendo ser ativada na verdade uma reação em cadeia, induzindo a danos celulares (Stocker e Keane, 2003).

As ROS são formadas através do mecanismo de oxi-redução do oxigênio, (Figura 09) cujo grupo pode ser subdividido em 1) *radicais livres*, estruturas com elétrons desemparelhados altamente reativos e instáveis, como ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e óxido nítrico (NO) além dos 2) *não radicais* como o H_2O_2 e o ONOO^- os quais possuem uma estabilidade maior (portanto menos reativos), apresentando uma meia-vida mais prolongada. Dentre os ROS apresentados, o NO , $\cdot\text{O}_2^-$ e o H_2O_2 são os principais produzidos por células do sistema cardiovascular (Miller et al., 2007; Paravicini e Touyz, 2008).

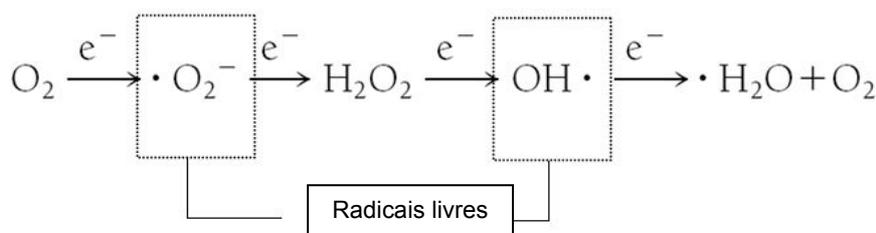


Figura 09. Principais espécies reativas do oxigênio (ROS). A partir de reduções sucessivas, pode-se obter o produto final H_2O e O_2 . As etapas intermediárias são compostas por substâncias muito reativas como ânion superóxido e hidroxila (radicais livres) e peróxido de hidrogênio (não radical). Adaptado de Paravicini e Touyz, 2008.

Em sistemas biológicos, a curta meia-vida do $\cdot\text{O}_2^-$ ocorre em parte devido a rápida redução para H_2O_2 pela enzima superoxidodismutase (SOD) (Johnson e Giulivi, 2005). A carga negativa do O_2^- impede sua mobilização pelas membranas celulares, exceto por canais iônicos. Em contraste, o H_2O_2 além de sua maior meia-vida, é mais facilmente difusível para os meios intra/extracelular. Existem três isoformas conhecidas da SOD: i) a SOD cobre/zinco (SOD1), encontrada no citosol, lisossomos e núcleo ii) a SOD mitocondrial (Mn SOD ou SOD2) e iii) a SOD extracelular (ecSOD ou SOD3), sendo esta última mais produzida pelo leito vascular (Mendez et al., 2005; Paravicini e Touyz, 2008). As distintas propriedades entre $\cdot\text{O}_2^-$ e H_2O_2 e suas diferenças de distribuição permitem que tais ROS possam ativar distintas vias

de sinalização, até mesmo respostas funcionais opostas. Por exemplo, o aumento de $\cdot\text{O}_2^-$ pode inativar o vasodilatador NO desencadeando disfunção endotelial e vasoconstrição, sendo o “gatilho” de muitas doenças vasculares, incluindo a AT. Por outro lado, o H_2O_2 pode atuar como um vasodilatador em alguns leitos vasculares, incluindo o leito cerebral, coronariano e mesentérico (Matoba et al., 2000; Paravicini et al., 2004).

Afinal, qual seria a relação direta do estresse oxidativo com a AT? Atualmente, existem duas teorias principais aceitas:

1) “LDL oxidation hypothesis”: hipótese clássica, proposta por Steinberg e colaboradores em 1989 ao afirmarem que o produto da oxidação da LDL, a LDLox, seria a principal molécula contribuinte para o início da AT, devido a I) estimulação do recrutamento de monócitos e linfócitos T para o espaço subintimal, II) inibição da habilidade do macrófago residente de deixar a íntima, III) elevação da taxa de captação de lipoproteínas induzindo a formação de células espumosas e IV) ação citotóxica, comprometendo a integridade endotelial (Quinn et al., 1985) e das células musculares lisas (Li et al., 2003).

Diante de abundantes dados que respaldam tais conclusões, outra hipótese pareceria muito remota. Entretanto, um dos principais fatores que culminaram com o surgimento de outra proposta foram as fracas correlações entre estratégias farmacoterapias antioxidantes e a redução da progressão da AT em diversos estudos experimentais e clínicos (Carr e Frei, 1999; Rimm et al., 1993; Lusic, 2000 Heart Protection Study Collaborative Group, 2002; Upston et al., 2003; Stocker e Keane, 2003), gerando portanto a segunda hipótese:

2) a “oxidative response to inflammation hypothesis” propõe que os eventos oxidativos representem apenas uma contribuição para a AT, não sendo portanto a causa, mas apenas uma consequência do processo inflamatório inicial gerado, conforme a figura 10 (Stocker e Keane, 2003).

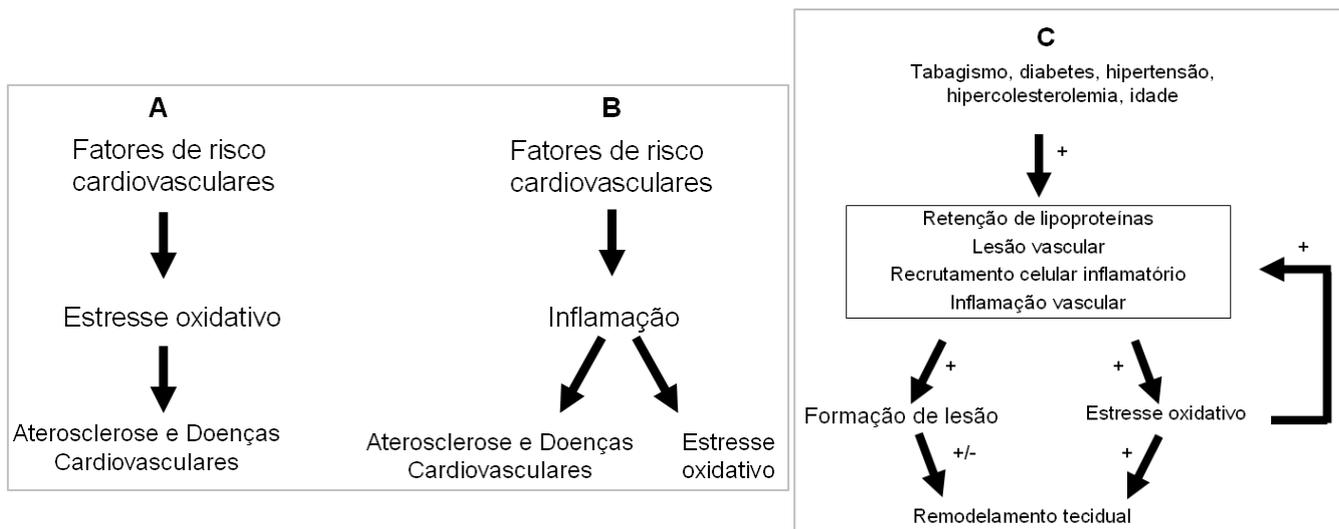


Figura 10. Conceitos atuais sobre o estresse oxidativo atuando como causa (A) ou consequência (B) da AT. (C) Visão mais detalhada sobre a hipótese da oxidação em resposta à inflamação. A presença dos fatores de risco cardiovasculares promoveria uma extensa retenção de lipoproteínas que culminaria com lesões no endotélio vascular. Em seguida, haveria um estímulo inflamatório com recrutamento de células para a parede arterial, culminando com inflamação vascular. O processo inflamatório seria o “gatilho” não só para o desenvolvimento da lesão mas também para a formação de ROS. Agora, com o estresse oxidativo presente, existiriam estímulos para remodelamento além de influências modulatórias na formação de lesões ateroscleróticas, não havendo portanto uma causa direta na AT (Adaptado de Stocker e Kearney, 2003)

1.4.3 Envelhecimento e senescência celular

Indubitavelmente, estudos epidemiológicos têm mostrado que a idade é um fator de risco dominante para as doenças cardiovasculares ateroscleróticas (Lakatta e Levy, 2003; Braunwald e Zipes, 2005). A incidência e prevalência de doenças aterotrombóticas incluindo doença coronariana e acidente vascular cerebral têm crescido de acordo com a idade (Braunwald e Zipes DP, 2005; Minamino e Komuro, 2007). Entretanto, os mecanismos moleculares fundamentais para o aumento do risco dessas doenças permanece incerto. Um bom exemplo para isso é o aumento da resistência periférica que ocorre ao longo dos anos (arteriosclerose) evidenciada por estudos com doppler, determinação de velocidade de onda de pulso, entre outras técnicas embora explicações moleculares convincentes que expliquem a associação da idade

com a disfunção vascular não tenham sido bem descritas. Como a idade inclui diversos fenômenos biológicos, é extremamente difícil atribuir alterações relacionadas à idade sobre a vasculatura ou ao organismo com apenas uma determinada molécula. Além disso, não existe um biomarcador preciso de envelhecimento capaz de resolver a problemática do estudo do envelhecimento vascular (Erusalimsky e Kurz, 2005), sendo necessário avaliar o grau de senescência celular que nem sempre acompanha o envelhecimento de forma proporcional, embora tenha sido nos últimos anos alvo de muitos estudos na área cardiovascular.

A senescência celular (SC) é um fenômeno de resposta ao estresse que culmina com uma perda da capacidade replicativa de células somáticas humanas seja *in vitro* (Hayflick, 1965; Minamino et al., 2002) ou *in vivo* (Fenton et al., 2001). A partir desse estágio, passam a apresentar um prejuízo homeostático, exibindo morfologia, função e expressão gênica diferentes, incluindo transcrição de reguladores negativos do ciclo celular como as proteínas repressoras (p53 e p16) e encurtamento dos telômeros (Fenton et al., 2001; Erusalimsky e Kurz, 2005; Minamino e Komuro, 2007). Essas mudanças fenotípicas não são observadas em células quiescentes e têm sido relacionadas com o envelhecimento bem como suas doenças associadas (Faragher e Kipling, 1998; Campisi, 2005). Tal hipótese de envelhecimento celular foi primeiramente descrita por Hayflick na década de 60 embora a relação entre senescência celular e AT só fosse explorada após aproximadamente quarenta anos, ainda com poucos estudos *in vivo* (Minamino et al., 2002; Erusalimsky e Kurz, 2005).

Ainda que o *turnover* endotelial como um todo tenha sido considerado de baixa intensidade, estudos experimentais revelam que áreas de transição vascular como as bifurcações e pontos de ramificação possuem células endoteliais com taxa de replicação aumentada (Wright, 1968; Caplan and Schwartz, 1973). Estes locais que correspondem em humanos como áreas propensas a AT, estão sujeitas a mudanças de forças hemodinâmicas e *shear stress* que podem atuar como uma fonte de injúria endotelial crônica (Glagov et al., 1988). Conseqüentemente, nesses locais o endotélio pode responder com um aumento do *turnover* celular a fim de manter sua integridade intimal (Langille et al., 1986). Isso sugere que *in vivo*, assim como o envelhecimento,

áreas com elevado *turnover* celular possam desenvolver regiões de SC. Além disso, como a vasculatura é cronicamente exposta uma variedade de fatores “extra-hemodinâmicos”, como estresse oxidativo, lipoproteínas e hormônios sexuais a soma desses fatores poderiam, em tese, acelerar o desenvolvimento de SC. Curiosamente, recentes trabalhos têm mostrado que a prevalência de SC em leitos vasculares coincidem com áreas de maior susceptibilidade ao desenvolvimento de AT (Erusalimsky e Kurz, 2005) envolvendo não somente SC em células endoteliais mas também em células musculares lisas, facilitando assim a instabilidade das placas e suas eventuais rupturas (Bennett et al., 1998; Minamino et al., 2003).

Em células endoteliais senescentes já foi mostrado que a produção de NO e a atividade da eNOS estão reduzidas inclusive sob *shear stress*, um dos estímulos característicos para o aumento da produção de NO (Matsushita et al., 2001; Minamino et al., 2002). Outro motivo que possa contribuir para queda da produtividade do NO seria o aumento da produção de ROS, característico das células senescentes (Lee et al., 1999; Deshpande et al., 2003; Unterluggauer et al., 2003;). Além disso, 1) a produção de prostaciclina (PGI₂) é diminuída, 2) produção de tromboxano (TXA₂) e endotelina -1 (ET-1) é aumentada, cujos fatores quando somados contribuem diretamente para a trombogênese e AT, conforme figura 11 (Neubert et al., 1997; Nakajima et al., 1997; Minamino e Komuro, 2007). Diante dos fatos, há indícios claros de que o acúmulo de células senescentes ao longo do leito vascular contribui para ao início e progressão da AT.

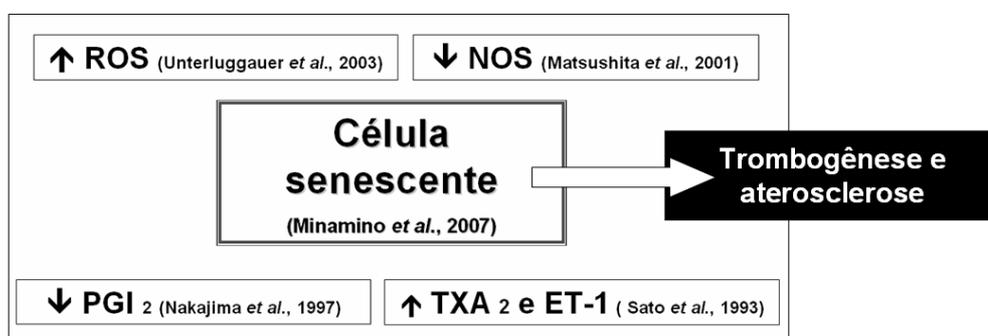


Figura 11. Características principais das células senescentes que culminam para a trombogênese e AT. ROS: espécies reativas do oxigênio, NOS: óxido nítrico sintase, PGI₂: protaciclina, TXA₂: tromboxano, ET-1: endotelina tipo 1.

1.4.4 Outros fatores envolvidos

Obviamente que outros fatores também podem contribuir para o desenvolvimento complicações da AT cujas características até são confundidas com o processo do envelhecimento. Portanto, ainda que não seja alvo desse estudo, segue a tabela 01 mostra alguns outros parâmetros que são alvos de outros estudos.

Fatores	Considerações
Hipertensão	-Associações observadas em estudos epidemiológicos. Estudos clínicos têm mostrado benefício com a redução da pressão arterial, principalmente nas consequências dos distúrbios cerebrovasculares (Luft, 1988; Assmann et al., 1999)
Hipercisteinemia	-Associações têm sido observadas em estudos epidemiológicos além de resultados de homocistinúria associados a doenças vasculares oclusivas (Gerhard et al., 1999)
Diabetes, obesidade, síndrome metabólica	-Associações observadas em estudos epidemiológicos e experimentais (Assmann et al., 1999) -A resistência insulínica é um fator associado a AT e doenças coronarianas (Lusis et al., 1998)
Inflamações sistêmicas	-Elevados níveis de moléculas pró-inflamatórias como a proteína C reativa está associada com DCV, assim como a artrite reumatóide (Kugiyama et al., 1999)
Estilo de vida moderno: Sedentarismo, Dieta hiperlipídica	-Fatores mais significantes para a progressão da AT (Lusis, 2000); -Estudos clínicos mostram benefícios com prática de exercícios, modificação da dieta e/ou redução dos níveis de colesterol (Assmann et al., 1999; Smith, 2001; Ignarro et al., 2007);
Tabagismo	-Fortes associações observadas em muitos estudos epidemiológicos. Estudos clínicos tem demonstrado benefícios com a suspensão do tabagismo (Lusis, 2000; Assmann et al., 1999).
Agentes infecciosos	-Estudos epidemiológicos têm mostrado evidências de associações entre diversos agentes infecciosos, como a <i>Chlamydia pneumoniae</i> . Estudos experimentais <i>in vivo</i> também suportam essa relação (Hu et al., 1999)
História familiar	-Quando todos os fatores de risco estão controlados, a história familiar permanece como um significativo fator independente (Goldbourt e Neufeld, 1988; Kawaguchi et al., 2003)

Tabela 01. Outros fatores envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose (AT), agravados durante o processo do envelhecimento.

1.5 Valva aórtica: mais um tecido-alvo da AT

Extraordinariamente, a valva aórtica abre e fecha aproximadamente 100.000 vezes por dia em humanos (e 790.000 vezes por dia em camundongos) além de tolerar repetitivas mudanças de forma e dimensão ao longo de um ciclo cardíaco (Palakodeti et al., 1997; Aikawa et al., 2007). Independente se humano ou modelo experimental, tais movimentos repetitivos comportam quatro funções principais: 1) permitir um rápido aumento da pressão intraventricular até o momento de sua abertura e, enquanto novamente fechada na diástole, 2) impedir o refluxo do sangue armazenado na aorta para a cavidade ventricular, 3) manter um adequado fluxo sanguíneo durante toda a diástole através do recolhimento elástico da aorta além de 4) direcionar o conteúdo do refluxo retrógrado para o leito coronariano permitindo assim uma adequada perfusão cardíaca. Diante de tantas funções importantes, sua alteração morfológica pode ocasionar importantes prejuízos no trabalho cardíaco.

As disfunções valvares aórticas ocorrem diante de progressivas desordens derivadas de espessamento inicial gerando um prejuízo no movimento valvar gerando insuficiência (ou regurgitação) seguida de processos de calcificação que culmina em severo desenvolvimento de estenose valvar (Kawaguchi et al., 2003). A estenose refere-se a incapacidade de uma valva de se abrir por completo, impedindo assim o fluxo anterógrado. Em contraste, a regurgitação aórtica (RA) resulta da incapacidade de uma valva se fechar por completo, permitindo dessa maneira um fluxo retrógrado. Essas anormalidades podem ser puras ou coexistirem simultaneamente, sendo classificadas como uma cardiopatia valvar mista, embora sempre predomine um dos defeitos (Cotran et al., 2000; Freeman e Otto, 2005).

Uma das precoces disfunções valvares aórticas é a regurgitação aórtica (RA), comumente gerada por um espessamento dos folhetos valvares (Kawaguchi et al., 2003). Entretanto, a prevalência de RA crônica e a incidência de RA aguda em humanos ainda não estão bem elucidadas, talvez pela sua silenciosidade quanto aos sintomas, os quais podem se manifestar ao longo de anos ou décadas (Plante et al., 2004). Singh e colaboradores (1999) através de estudos de Doppler com mapeamento de fluxo em cores citaram a prevalência

de RA em uma amostra da população dos estudos de Framingham, sendo encontrado mais em homens (13%) do que em mulheres (8,5%), com a maioria das manifestações pouco severas. Por meio de cálculos e análises estatísticas revelou-se que a idade e o sexo masculino seriam preditores da RA. Um ano depois, Lebowitz e colaboradores através do “Strong Heart Study” mostraram uma prevalência de 10% de RA na população nativa americana, também com severidade discreta, mostrando uma relação direta com a idade, porém sem qualquer correlação com gênero.

Diferentemente da RA, diversos estudos clínico-patológicos identificaram similaridade em lesões de valvas aórticas e placas ateroscleróticas (figura 12), cujos folhetos encontravam-se repletos de células inflamatórias e com depósitos de cálcio culminando em severos quadros de estenose valvar, sendo um crítico fator determinante de prognóstico (Otto et al., 1994; Olsson et al., 1999; Kawaguchi et al., 2003; Freeman et al., 2005). Evidências clínicas sugerem que a AT e tais danos valvares compartilham dos mesmos riscos epidemiológicos como idade, sexo, hipercolesterolemia, estresse oxidativo e hipertensão (Stewart et al., 1997; Agmon et al., 2001; Kawaguchi et al., 2003; Mohler, 2004; Allison et al., 2006; Rajamannan, 2009), embora seus mecanismos de indução sejam pouco claros. Diante disso, torna-se relevante observar em modelos experimentais idosos possíveis correlações entre gênero e AT quanto a distúrbios valvares, seja RA, estenose valvar ou ambos.

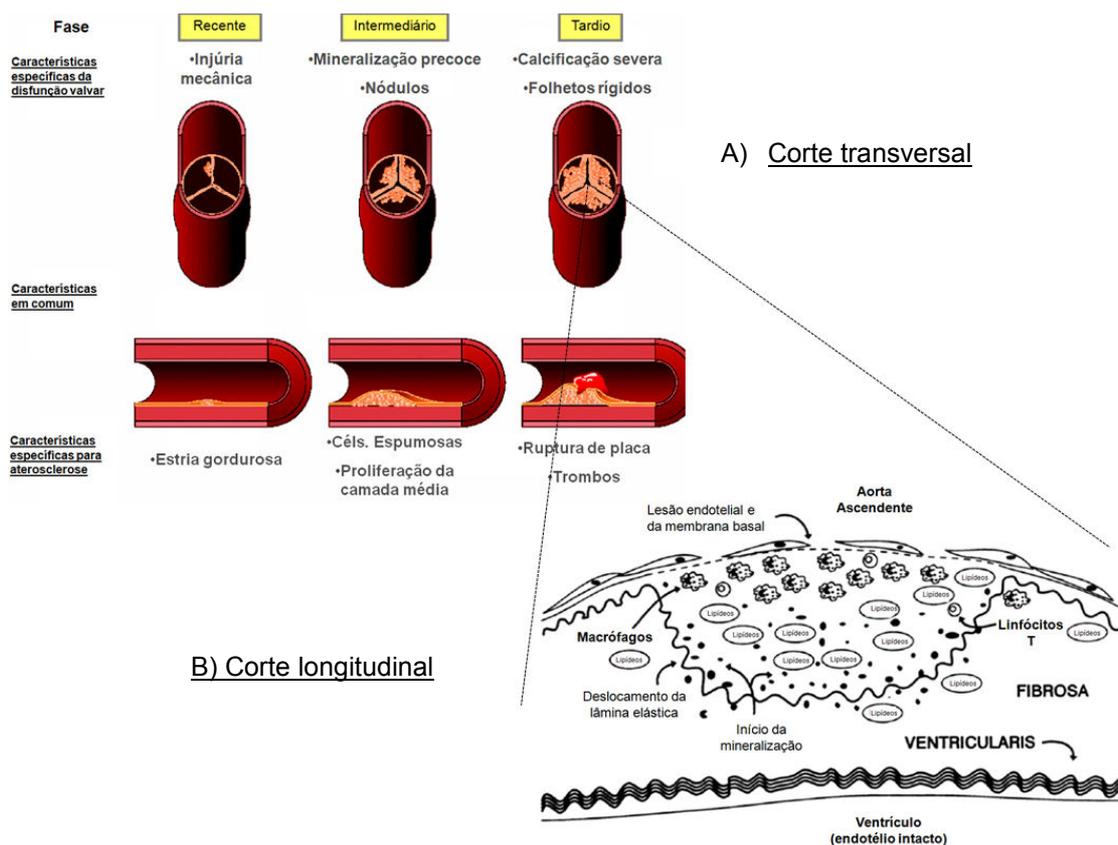


Figura 12. Esquema que mostra a progressão da lesão valvar aórtica, em corte transversal e longitudinal. Em paralelo, a progressão da AT, evoluindo proporcionalmente a lesão valvar. Adaptado de Otto et al., 1994 e Newby et al., 2005.

Diante da sobrecarga crônica de volume em quadros de RA ou estenose valvar é inevitável a formação de uma progressiva dilatação da câmara ventricular acrescido de uma excêntrica hipertrofia compensatória, comumente observada em humanos (Plante et al., 2004; Bekeredjian et al., 2005). Em modelos experimentais de RA, é também descrito que uma de suas principais conseqüências seria a hipertrofia cardíaca, seguido de remodelamento da cavidade intraventricular culminando com edema pulmonar em conseqüência de falhas da resposta adaptativa por fibrose e morte de miócitos (Patten et al., 2002; Forman et al., 1997; Kawaguchi et al., 2003; Droogmans et al., 2007 e 2009). Além de alteração nos parâmetros ponderais, o decréscimo do desempenho de células cardíacas na insuficiência cardíaca poderia também ser determinado por alterações bioquímicas decorrentes de modificações na expressão de proteínas do cardiomiócito que participam da regulação do processo de excitação-contração e relaxamento (Balke & Shorofsky, 1998) como a SERCA2a (*Sarco(endo)plasmic reticulum Ca(2+)-ATPase*) e o

fosfolambam (PLB). Basicamente, enquanto a SERCA2a é responsável pela recaptação de Ca^{++} pelo retículo sarcoplasmático e conseqüentemente o relaxamento do miócito (Arai et al., 1994), o PLB regula a sua atividade, mediada principalmente por estímulo simpático, pois o aumento de PKA fosforila o fosfolambam, deixando de inibir a SERCA2a, aumentando assim a recaptação de Ca^{++} e o inotropismo positivo (Dhalla et al., 1991; Arai et al., 1994). Em miócitos hipertrofiados de pacientes com disfunção ventricular grave há *down regulation* de RNAm e proteína bem como queda da atividade da SERCA2a, aumentando a ligação do cálcio a troponina C, comprometendo o fenômeno diastólico e sistólico do miocárdio (Arai et al., 1994; Meyer et al., 1995; Colucci, 1997, Schwinger et al., 1999; Hasenfuss et al., 1999; Wisloff et al., 2002).

1.6 AT em modelos experimentais

Diversas espécies de animais têm sido utilizadas para estudar a fisiopatologia bem como tratamentos em potencial de lesões ateroscleróticas. A primeira evidência de uma aterosclerose experimental foi em 1908 quando Ignatowski relatou um espessamento da camada intimal com processo inflamatório na aorta de coelhos sob dieta rica em proteínas animais (carne, leite, ovos). Após isso, grande parte dos estudos foram realizados em modelos experimentais de grande porte como coelhos, porcos ou primatas. Hamsters e aves foram alvos ocasionais por problemas peculiares de tais espécies. Quanto aos cães e ratos, não houve uma boa repercussão porque tais espécies não desenvolviam lesões espontâneas além de necessitarem de modificações radicais na dieta para induzir lesões vasculares (Jawien' et al., 2004).

Mesmo diante de tantas dificuldades de um modelo "ideal", os coelhos foram utilizados porque são altamente responsivos às alterações de colesterol além de desenvolverem lesões nítidas rapidamente (Drobnik et al. 2000). Tais lesões são muito mais ricas em gorduras e macrófagos que lesões humanas além de acompanhar uma hipercolesterolemia muito mais severa que humanos. Agora, na intenção de se estudar uma lesão mais próxima dos humanos, os porcos e macacos foram utilizados. Todavia, diante do risco de extinção e alto custo os macacos não puderam substituir os coelhos. Quanto

aos porcos, esses tornaram-se bons animais para investigação porque sob dieta com colesterol, eles alcançam níveis plasmáticos e lesões ateroscleróticas similarmente aos humanos. Como desvantagem estavam o custo, sua manutenção de colônias bem como o manejo dos animais.

Diante de tantas dificuldades, surge um modelo pequeno, geneticamente reproduzível: o camundongo, capaz de suprir muitos problemas e deficiências de animais de grande porte e em particular, permitir possíveis terapias que requeiram um número relativamente maior de animais (Paigen et al., 1985; Plump et al., 1992; Jawień et al., 2004).

À partir de 1992, muda-se então o foco dos mecanismos de aterosclerose em coelhos, com um pequeno número de estudos em porcos e primatas, apesar desses estudos iniciais também colaborarem com as investigações sobre a AT. Em porcos por exemplo, foi inicialmente descrito que a infiltração de monócitos era o evento inicial mediado por células no processo aterogênico (Gerrity, 1981). Com macacos e coelhos, foi possível investigar melhor os eventos celulares que iniciavam e desenvolviam as lesões ateroscleróticas (Faggiotto e Ross et al., 1984; Rosenfeld et al., 1987). No século XXI, a grande “explosão” do número de estudos *in vivo* tem sido realizada em camundongos, justificada por uma série de características que o tornam um modelo ideal, conforme a tabela 02.

Questionamentos principais sobre os modelos de aterosclerose	Camundongos	Ratos/ Cães	Coelhos	Suínos	Macacos
Existe similaridade entre as lesões formadas e as lesões humanas?	↑↑	-	↑	↑↑	↑↑
Existe similaridade entre o perfil das lipoproteínas plasmáticas e com o metabolismo lipídico humano?	↑(ApoE ^{-/-}) ou ↑↑ (LDL r ^{-/-})	-	↑	↑↑	↑↑
O tempo para que as lesões se formem são favoráveis?	↑↑	-	↑	↓↓	↓↓↓
Existe viabilidade para se adquirir e manter tais animais?	↑	-	↓	↓↓	↓↓↓
Qual a facilidade exigida para as manipulações <i>in vivo</i> bem como as técnicas de imagem estabelecidas?	↓↓	-	↑	↑	↑
Existe possibilidade de manipulações genéticas com o modelo experimental escolhido?	Sim	Não	Não	Não	Não

Tabela 02. Características importantes que definem as vantagens e desvantagens dos modelos experimentais de AT.

1.6.1 *Aterosclerose em camundongos*

Até 1969, os camundongos enquadravam-se no mesmo conceito de cães e ratos, por apresentarem alta resistência à AT. No entanto, animais isogênicos C57BL/6J com dieta à base de 30% de lipídeos, 5% de colesterol e 2% de ácido cólico por cinco semanas quebraram tal paradigma (Thompson-Wissler's Laboratory). Entretanto, diante de uma alta taxa de mortalidade dos animais submetidos à tal dieta (as quais geravam perda de peso e infecções respiratórias), tal protocolo foi desencorajado. Somente em 1985, Paigen e colaboradores desenvolveram uma dieta com concentração intermediária (à base de 15% de lipídeos, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico), por 10 semanas, apresentando assim lesões ateroscleróticas aliadas à baixa mortalidade entre os murinos.

Apesar desse protocolo desenvolvido, foi observado que as lesões eram restritas ao arco aórtico e com estágios limitados (Jawień et al., 2004). Diante disso, o uso do modelo C57 foi gradativamente substituído para os animais geneticamente modificados, os quais tinham a capacidade de exibir extensas lesões, com baixo índice de mortalidade e em alguns modelos inclusive sem a necessidade de dietas hiperlipídicas.

1.6.2 *Modelos murinos de aterosclerose geneticamente modificados*

As tecnologias de animais *knock-out* permitiram um estudo mais pormenorizado da ação de genes individuais na biologia e na patologia vascular. Com a deleção de “genes alvos” por um alelo específico, permite-se identificar a importância de uma determinada proteína num metabolismo específico. As manipulações genéticas mais comumente utilizadas em modelos murinos de aterosclerose são aquelas que viabilizam deleções de genes envolvidos no metabolismo do colesterol, alterando conseqüentemente o perfil lipídico, mais precisamente com o aumento dos níveis plasmáticos de VLDL e LDL (Meir e Leitersdorf, 2004; Daugherty e Rateri, 2006) contrapondo os elevados níveis de HDL dos animais normais (Hofker et al., 1998). Como exemplo, a partir da década de 1990 foram desenvolvidos 2 modelos principais,

os quais são os mais utilizados atualmente: o ApoE^{-/-} e o LDL receptor^{-/-}, os quais serão detalhadamente descritos a seguir.

1.6.2.1 O modelo murino ApoE^{-/-}

Em 1992, uma das estratégias iniciais para induzir hiperlipidemia aterogênica foi desenvolvida praticamente em dois laboratórios simultaneamente (Piedrahita et al., Plump et al.) com a deleção do gene da apolipoproteína E (ApoE). A ApoE é uma glicoproteína de 34kDa sintetizada principalmente no fígado, cérebro entre outros tecidos (recentemente relatado em monócitos e macrófagos do leito vascular) sendo um constituinte de todas as lipoproteínas, exceto aquelas de baixa densidade (LDL). A ApoE tem uma participação fundamental no metabolismo lipídico, atuando como um ligante para receptores que depuram os quilomícrons e os VLDL remanescentes (LDL receptor e LRP receptor), modulando a absorção e reabsorção de colesterol pela circulação êntero-hepática ou até na homeostase local - em reações inflamatórias ao longo do leito vascular, visto que a ApoE auxilia o efluxo de colesterol para HDL, inibindo a transformação de macrófagos em células espumosas (Curtiss et al., 2000; Sehayek et al., 2000; Meir e Leitersdorf, 2004; Lusis, 2000; Lusis et al., 2004).

A deleção do gene ApoE foi realizada através de uma recombinação homóloga em células-tronco embrionárias. Para tanto, um par de plasmídeos foi utilizado (pJPB63 e pNMC109), ambos contendo um gene de resistência à neomicina que substitui uma parte do gene ApoE, comprometendo sua estrutura para uma perfeita transcrição. Através da técnica de eletroporação os plasmídeos foram inseridos nas colônias de células-tronco, cujo procedimento foi confirmado por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR) e *Southern blotting*. Inicialmente, os animais que receberam o blastocisto foram transmitindo o “gene knockout” para as próximas gerações. A partir de heterozigotos desenvolvidos foram formados naturalmente os homozigotos de acordo com a frequência mendeliana esperada, mostrando inclusive que a ausência de expressão do gene ApoE foi compatível com um desenvolvimento normal desse modelo experimental. (Piedrahita et al., 1992; Javien’et al., 2004)

Diante da ausência da ApoE, a alteração do metabolismo de captação bem como a velocidade de degradação dos constituintes lipoprotéicos aumenta

a susceptibilidade de desenvolvimento de placas ateroscleróticas (semelhantes às humanas) até mesmo diante de uma dieta normal, tornando-se o modelo murino experimental mais comum para estudo de progressão e composição da placa aterosclerótica (Strong, 1992; Tangirala et al., 1995, Jawien'et al., 2004). Sob dietas normais, os camundongos apresentam níveis médios de 500 mg/dL de colesterol total, com prevalência das frações de quilomícrons remanescentes e VLDL. Suas lesões ateroscleróticas com células espumosas são presentes à partir da 10^o semana de vida; as lesões mais complexas iniciam-se somente à partir da 15^o semana; com 40 semanas, espera-se já a formação de placas calcificadas (Plump et al., 1992; Hofker et al., 1998). Com dietas hiperlipídicas do tipo "Western type" (a qual mais mimetiza a "human fatty fast food diet"- 21% de lipídeos, 0,15% de colesterol e sem ácido cólico) o nível sérico de colesterol poderia ser quadruplicado (Piedrahita et al., 1992), acelerando inclusive o desenvolvimento de placas ateroscleróticas, conforme Figura 13 (Nakashima et al., 1994; Javien' et al., 2004). Quanto aos tipos de células contidas nessas placas, são encontradas as mesmas observadas em humanos com aterosclerose: macrófagos, linfócitos T além de células musculares lisas com predileção de desenvolvimento no arco aórtico (Nakashima et al.,1994). Com o passar dos meses, outros locais podem também desenvolver placas como: artéria sino aórtica, porção proximal das coronárias, artérias pulmonares, carótidas, aorta abdominal bem como as demais bifurcações aórticas (Reddick et al., 1994;Hartley et al. 2000).

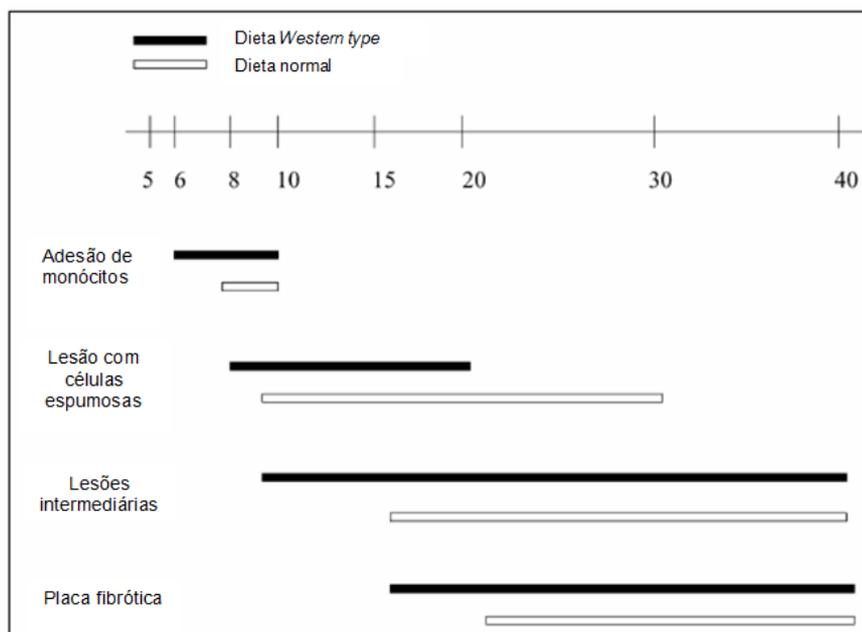


Figura 13. Diagrama mostrando como a formação de lesão em camundongos com dieta normal é mais lenta que os animais sob dieta “Western type”. Adaptado de Javieñ et al., 2004.

Indubitavelmente, o modelo geneticamente modificado ApoE apresenta um enorme potencial para os estudos de fisiopatogenia e tratamento da aterosclerose devido a quatro fatores principais: 1) grande similaridade com as lesões encontradas em humanos, 2) desenvolvimento de lesões sem necessidade de dieta hiperlipídica, 3) curto período de ciclo reprodutivo, 4) genoma extensivamente estudado e conhecido (Javieñ et al., 2004; Meir e Leitersdorf, 2004; Nogueira et al., 2007). Tais características podem explicar por que desde 1992 o número de publicações sobre tal modelo aumenta progressivamente (Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992; Weinreb et al., 2007), embora predomine a limitação por estudos *ex vivo* ou *in vitro* (Fayad et al., 1998; Weinreb et al., 2007).

1.6.2.2 O modelo murino LDL receptor^{-/-}

Sabe-se que a deficiência na expressão de receptores de LDL poderia desencadear uma pronunciada hipercolesterolemia com severas complicações cardiovasculares em humanos, comprometendo inclusive a resposta farmacológica de estatinas para a redução dos níveis séricos de colesterol (Kajinami et al., 2004). Diante de tantas evidências sobre a importância do

metabolismo do LDL, Ishibashi e colaboradores (1993) desenvolveram o modelo murino LDL *receptor*^{-/-} através de modificações do gene alvo em células tronco embrionárias. Como resposta, tais animais apresentaram o dobro dos níveis plasmáticos de colesterol (250 mg/dL- com predominância de VLDL e LDL). Paradoxalmente, a hipercolesterolemia e as lesões ateroscleróticas mais extensas só foram observadas quando os animais foram submetidos à dieta contendo 10% de sobrecarga lipídica ou do tipo “Western type” respectivamente.

Mesmo assim, apesar da necessidade da dieta para a manifestação da aterosclerose, o grau de lesão apresentado pelo grupo LDL *receptor*^{-/-} foi mais extenso que o modelo pioneiro C57 (Masucci-Magoulas et al. 1997). Outro argumento importante que ainda justifica a sua utilização é que o seu perfil lipídico é mais próximo da hiperlipidemia humana que os animais ApoE^{-/-} (Veniant et al., 2001; Ohashi et al., 2004).

1.6.2.3 Outros modelos murinos de aterosclerose

Seguindo a invenção dos animais ApoE e LDL *receptor knockout*, diversas modificações genéticas foram desenvolvidas para obtenção de fenótipos que se assemelhassem as manifestações ateroscleróticas humanas, auxiliando assim no maior entendimento dessa fisiopatologia bem como em medidas terapêuticas que previnam, atenuem ou até corrijam (como desejo maior) sua progressão. Na verdade, a maior parte dos novos modelos apresentam-se com alteração dupla de genes (duplo *knockout* ou *knockout + up regulation* de outro gene), permitindo assim o entendimento de outros genes que possam participar na manifestação da AT, sejam eles envolvidos diretamente no metabolismo lipídico ou não, conforme exemplos da Tabela 03, mostrando como consequência se houve aumento ou redução da placa. Com o modelo murino, percebeu-se que a base genética da aterosclerose é muito complexa. O número de animais geneticamente modificados os quais podem alterar a progressão da AT já ultrapassou de 100 genes (Lusis et al., 2004).

<i>Tipo de modelo</i>	<i>Outros “genes alvos”</i>	<i>Knockout (KO) ou Transgene (Tg)</i>	<i>Efeitos na aterosclerose*</i>
ApoE ^{-/-}	ApoA-I	Tg	↓↓ ¹
ApoE ^{-/-}	Lipase hepática	KO	↓ ²
ApoE ^{-/-}	AcetilCoA colesterol acetiltransferase 2	KO	↓↓ ²
ApoE ^{-/-}	Metaloproteinase 1 humana	Tg	↓ ²
ApoE ^{-/-}	Receptor <i>scavenger</i> de classe B, tipo I (SR-BI)	KO	↑↑ ²
ApoE ^{-/-}	Proteína C Reativa	Tg	↑ ²
ApoE ^{-/-}	eNOS (óxido nítrico sintase endotelial)	KO	↑ ²
ApoE ^{-/-}	iNOS (óxido nítrico sintase induzível)	KO	↓ ²
ApoE ^{-/-}	Selectina P	KO	↓↓ ²
LDL r ^{-/-}	ApoE	KO	↑ ²
LDL r ^{-/-}	ApoA-I	KO	↑↑ ³
LDL r ^{-/-}	ApoB 100	Tg	↑↑ ⁴
LDL r ^{-/-}	ApoA-I	Tg	↓↓ ⁵
LDL r ^{-/-}	12/15 lipoxigenase	KO	↓↓ ⁶
LDL r ^{-/-}	RAG1 (indução de linfocitopenia)	KO	↓↓ ⁷
ACAT1 ^{-/-}	---	KO	↑↑ ⁸

* Aumento (↑) ou Diminuição (↓)

Tabela 03. Tipos de modelos murinos ateroscleróticos associados a outros “genes alvos”, com suas respectivas manifestações fenotípicas da AT. Fonte: ¹Paszy et al., 1994, ²Meir e Leitersdorf, 2004, ³Moore et al., 2003; ⁴Veniant et al., 2001 ⁵Valenta et al., 2006, ⁶George et al., 2001; ⁷Song et al., 2001; ⁸Accad et al., 2000.

1.7 Angiografia digital e sua importância na fisiopatologia cardiovascular

Historicamente, a base do desenvolvimento da intervenção cardiológica invasiva, o raio-X, pode ser considerado como uma das mais significativas inovações para a medicina clínica por permitir a visualização do interior do organismo para a inspeção médica. Desde a década de 1930, o raio-X já possibilitava a visualização de todos os sistemas do corpo humano (Reiser, 1978; Bronzino, 1990). Quanto ao coração, embora haja registros de tentativas de obtenção de imagens desse órgão desde 1907 (através de testes em crianças com a injeção de subnitrito de bismuto) os procedimentos descritos não se tornaram rotineiros, sobretudo pela dificuldade de controle dos agentes

de contraste e pelo movimento do coração que impedia a captura de imagens pelo aparelho de raio-X (Monteiro, 2003).

A visualização do coração vivo só foi realmente conseguida no final de 1920, com a introdução do cateterismo. O primeiro cateterismo cardíaco no homem *in vivo* ocorreu em 1929 pelo cirurgião alemão Werner Forssmann quando após diversas práticas em cadáveres, introduziu um cateter de 30 cm de comprimento no seu próprio corpo obtendo imagens fluoroscópicas do coração (Berry, 2006). Somente em 1956, Forssmann receberia o prêmio Nobel de Medicina pela sua audácia, coragem e por ter efetuado um exame que revolucionaria toda a cardiologia do futuro.

Em 1941, Cournard e Richards (em colaboração com Forssmann) utilizaram um cateter cardíaco para medir o débito cardíaco. Em 1958, Mason Sones, Cardiologista Pediátrico da *Cleveland Clinic (EUA)*, injetou acidentalmente 50cm³ de contraste na artéria coronária direita (em um jovem de 26 anos com regurgitação de valva mitral e aórtica), sem consequências, realizando assim a primeira coronariografia (Sones, 1959; Hurst, 1985; Ryan, 2002). Antes da infusão de contraste por Sones, acreditava-se que tal procedimento seria fatal como observado em cães experimentais por induzir uma hipóxia assimétrica na circulação coronariana gerando assim um desbalanço eletrolítico culminando com uma arritmia (Ryan, 2002). Felizmente, isso não ocorreu. A partir de então, essa técnica revolucionou o método da angiocardiografia coronária e ficou conhecida no mundo inteiro como "cin coronariografia seletiva" mais conhecida atualmente como arteriografia coronariana (Ryan, 2002), conforme figura 14.



Figura 14. Imagem da primeira cinecoronariografia seletiva (coronária direita) do Dr. Mason Sones em 1958 (Ryan, 2002).

A arteriografia representa uma situação singular na história da cirurgia vascular e da propedêutica instrumental em geral. Reinou absoluta como o método diagnóstico de escolha na avaliação arterial periférica durante 50 anos, pela sua aplicabilidade prática e boa correlação com os achados cirúrgicos. Além disso, a arteriografia possui, na forma de apresentação de imagens de segmentos contíguos em filmes de raios X, um fator facilitador de interpretação pelos radiologistas e cirurgiões vasculares e, portanto, de praticidade no uso diário (Engelhorn et al., 2002).

Por ter sido demonstrada como uma técnica de baixo risco, não só abrigou diversas evoluções tecnológicas constantes na via de introdução do cateter percutâneo, como também permitiu modificações no equipamento de raio-X, possibilitando analisar em tempo real as imagens obtidas, as quais sendo digitalizadas podem ser incessantemente revistas e objetivamente quantificadas quando necessário. Adicionalmente, pode ser correlacionada com avaliações funcionais - como o eletrocardiograma, cujas fases da contração cardíaca podem ser analisadas e interpretadas mediante as alterações anatômicas. Com o método de Sones associado à ventriculografia, pode-se estudar a fisiologia da contração cardíaca no homem sadio ou doente, a farmacologia entre outros aspectos da função cardíaca (Reis, 1986).

Em relação ao benefício da arteriografia para a AT, há anos que os benefícios estenderam-se do diagnóstico ao intervencionismo terapêutico. Desse modo, os estudos morfo-fisiológicos sobre a AT geralmente envolvem dois grandes campos: 1) dos métodos histológicos, predominantes nos animais experimentais; 2) dos estudos *in vivo*, por técnicas não invasivas, com imagens mais próximas do “fisiológico”, as quais prevalecem em humanos.

Contudo, ainda que o aprimoramento da arteriografia ao longo de cinco décadas permita o mínimo de complicações aos pacientes submetidos a esse método, muitas estratégias de investigações cardiovasculares não poderiam ser desenvolvidas em humanos diretamente, por razões óbvias e éticas. Portanto, se modelos experimentais de AT permitem intervenções cirúrgicas e farmacoterapêuticas mais ousadas, surge a oportunidade de aliar um método

excelente de imagem a um modelo murino, visando assim um entendimento mais direto e completo da modulação na progressão da AT bem como outras repercussões fisiopatológicas. Conseqüentemente, como Mason Sones e tantos outros pesquisadores, tentamos romper barreiras para impedir visões cíclicas ou até mesmo limitadas a respeito da AT, visto que em quase a totalidade dos experimentos em camundongos tais avaliações estão restritas a procedimentos *in vitro* ou *ex vivo* (Yamashita et al., 2002).

Finalmente, posso confidenciar que a oportunidade pioneira no Brasil de se aliar estudos *in vivo* em um modelo experimental de AT com técnicas *ex vivo* previamente estabelecidas foi a primeira “força motriz” para que esse trabalho se desenvolvesse, trazendo-nos resultados intrigantes e ao mesmo tempo, surpreendentes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar em camundongos idosos ateroscleróticos possíveis alterações morfo-funcionais e bioquímicas do sistema cardiovascular associadas ao gênero.

2.2 Objetivos específicos

- Detectar lesões ateroscleróticas em aorta de camundongos idosos C57 e ApoE *knockout* através da angiografia;
- Correlacionar os resultados encontrados da angiografia em camundongos com técnicas histológicas convencionais;
- Investigar em camundongos idosos C57 e ApoE (fêmeas e machos) possíveis correlações da hipercolesterolemia com grau de deposição lipídica e senescência celular aórtica;
- Investigar a possível participação dos hormônios sexuais femininos na hipercolesterolemia, grau de deposição lipídica e senescência celular aórtica;
- Analisar o grau de regurgitação aórtica (RA) em camundongos idosos C57 e ApoE (fêmeas e machos), explorando assim mais uma informação obtida durante a angiografia dos animais estudados;
- Investigar através de ensaios histológicos valvares possíveis causas da RA;
- Investigar a possível participação dos hormônios sexuais femininos na RA;
- Avaliar se o prejuízo da RA reflete em sinais de insuficiência cardíaca patognomônicos (hipertrofia cardíaca, dilatação ventricular ou edema pulmonar) ou moleculares (expressão da SERCA2a).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6 e ApoE *knockout*, fêmeas e machos, com idade igual ou superior a 18 meses de idade, pesando entre 28 e 40 g. Os animais eram provenientes de uma colônia de criação de responsabilidade de nosso próprio laboratório, sendo criados e mantidos no biotério de Transgenes e Controle Cardiovascular (LTCC), pertencente ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas no Centro de Ciências da Saúde da UFES. Os animais recebiam água e ração (Labina[®]- PURINA) *ad libitum*, tinham o ciclo de 12 horas claro/escuro bem como a temperatura (22 ± 2 °C) e a umidade ($60\pm 10\%$) do local controlados. A utilização e manuseio dos animais experimentais foram de acordo com as normas estabelecidas pelas entidades científicas (CEUA). Para os ensaios devidos, os animais foram separados em 2 grandes grupos experimentais: C57 (n=57) e apoE ^{-/-} (n=57), sendo cada grupo subdividido em 3 subgrupos: fêmeas (C57= 26 e ApoE=28), fêmeas Ovariectomizadas (C57=10 e ApoE=7) e machos (C57= 22 e ApoE=23), conforme a figura 15.

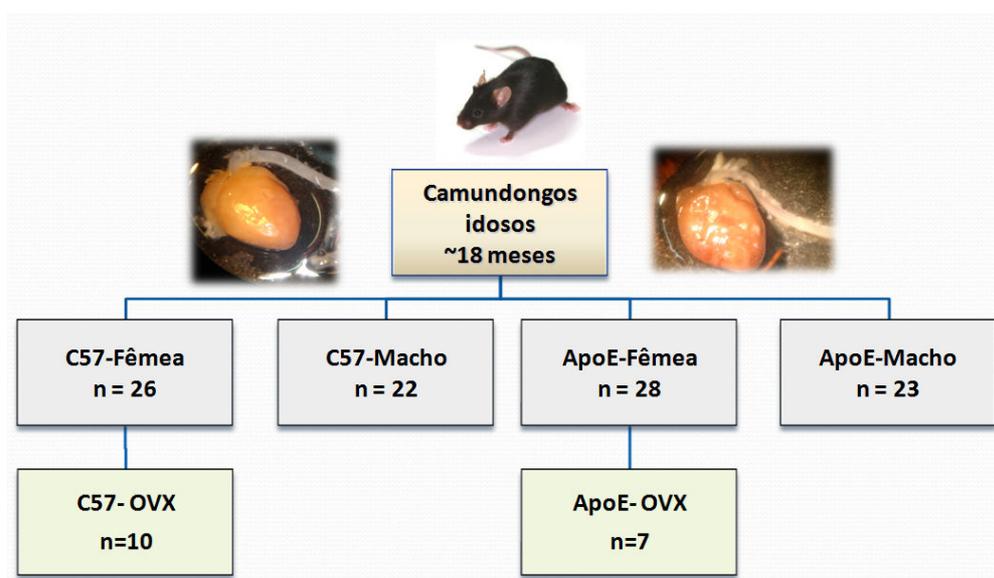


Figura 15. Subdivisão dos animais experimentais em dois grupos: C57 e ApoE-KO. As fotos revelam imagens típicas de aortas de camundongos cujas placas ateroscleróticas desenvolvem-se nos animais ApoE-KO, contrastando nitidamente com os animais C57.

3.2 Ovariectomia

Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de ketamina (90 mg/Kg) e xilazina (9,1 mg/Kg) aplicada por via intraperitoneal (*i.p.*). Em seguida, após retenção dos animais em decúbito lateral esquerdo e direito posteriormente, o útero e o ovário foram expostos por meio de uma pequena incisão lateral. Após um completo isolamento desses órgãos, foi realizada a ovariectomia com uma sutura em torno da tuba uterina em proximidade com o ovário. Após sutura, foi realizado um corte, retirando assim finalmente o ovário esquerdo. Em seguida, a musculatura foi suturada com *catgut* simples e a pele com fio de algodão. Durante toda a cirurgia a temperatura corporal era controlada por uma manta térmica regulada mantendo-a em 37 °C. Após tal procedimento, as mesmas etapas foram repetidas no lado direito. Em seguida, receberam profilaticamente 0,1 mL do antibiótico enrofloxacina 2,5 % (Flotril®) por via subcutânea. Após a cirurgia, essas fêmeas foram mantidas durante 2 (duas) semanas em gaiolas individuais, recebendo água e ração *ad libitum*, sob as mesmas condições dos demais animais experimentais, onde permaneceram por mais aproximadamente 12 (doze) meses até o momento da angiografia bem como os demais procedimentos.

3.3 Angiografia

Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de ketamina (90 mg/Kg) e xilazina (9,1 mg/Kg) aplicada por via intraperitoneal (*i.p.*). Em seguida, após retenção dos animais em decúbito dorsal, com auxílio de uma lupa cirúrgica (Opto eletrônica S/A Sn-2002, São Carlos-SP), foi cateterizada a carótida direita com cateteres de polietileno (PE-50 acoplada a uma PE-10). Essas estavam previamente preenchidas com solução de salina/heparina (50:1) para evitar a formação de coágulos até o momento da angiografia.

Todos os procedimentos angiográficos foram realizados no Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) com auxílio de um sistema de aquisição de imagens por raios X (Shimadzu®), conforme figura 16. Num

intervalo de aproximadamente 30-60 minutos (em média) após a cateterização, os animais ainda sob anestesia foram submetidos à injeção do contraste (200 μ L de iodo de meglumina a 35%) no momento da angiografia. Cada animal foi submetido a dois tipos de imagens, sob angulações de 90° e 45°, previamente padronizados.



Figura 16. Foto típica mostrando a angiografia adaptada ao camundongo(indicado pela seta vermelha). De forma sistemática, todos os procedimentos foram realizados com um posicionamento padronizado do animal, conforme especificações a seguir: 0° ou 45° , 0° e 90° , sob lente 5, com magnificações de 90cm, 90cm e 1.24cm, acompanhado de uma esfera de 1cm ou um cateter com distâncias repetidas de 1 cm para posterior padronização das medidas.

As imagens obtidas foram analisadas pelo programa do QCA (*Quantitative Coronary Analysis*), cujos segmentos da artéria aorta foram divididos em quatro partes para avaliação dos respectivos diâmetros internos e determinação da velocidade de fluxo (Figura 17), diante da obtenção do comprimento do leito aórtico e o tempo necessário (obtido pelo número de *frames*) para a chegada do contraste na bifurcação ilíaca, fazendo-se portanto a razão entre esses dois parâmetros.

Diante das visualizações constantes de regurgitação aórtica (RA) nos procedimentos, tal medida também foi padronizada de acordo com seu grau de severidade, classificada em graus que variam de 0 a 4, conforme Pujadas(1980), até então utilizada apenas em humanos (tabela 04).

Graus de Insuficiência aórtica	Regurgitação após infusão do contraste?	Características adicionais
0	Não	Sem especificações
1	Sim	Contraste presente no máximo até a metade do ventrículo esquerdo
2	Sim	Contraste presente até o ápice do ventrículo esquerdo, embora o contraste seja esvaziado na sístole
3	Sim	Contraste presente em toda a câmara, contudo no final das sístoles o contraste é totalmente eliminado
4	Sim	Contraste presente em toda a câmara e no final das sístoles o contraste permanece no ventrículo esquerdo inclusive numa cor mais intensa que a própria aorta

Tabela 04. Grau de severidade de insuficiência valvar aórtica analisada através da angiografia adaptada para camundongos.

Um último parâmetro extraído dessa técnica foi a medida da área ventricular esquerda, utilizando-se as imagens “congeladas” no momento de maior enchimento pelo contraste, delineando-se todo o perímetro ventricular. Com o auxílio do *software* “Image J” (domínio público - *National Institute of Health*, USA), foi feita a plotagem da área sob os ângulos de 90° e 45°, conforme imagens típicas da figura 19.

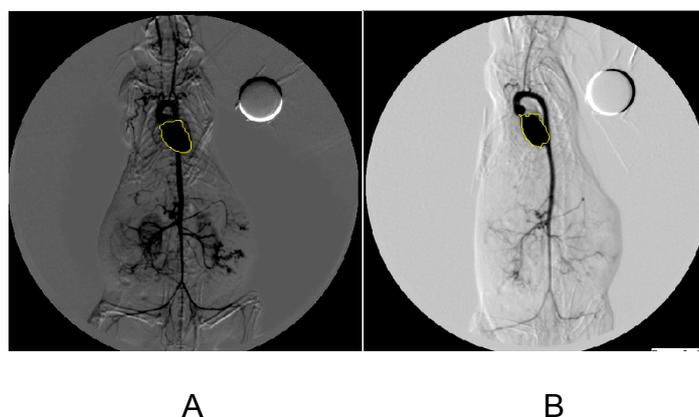


Figura 19. Imagens típicas da medida de área ventricular esquerda, sob ângulos de 90° (A) e 45° (B), evidenciadas pela marcação em amarelo. As esferas do lado direito dos animais são importantes para padronização da escala.

3.4 Coleta de sangue dos animais

Ainda sob anestesia, os animais submetidos à angiografia foram também submetidos à coleta de sangue momentos antes da angiografia, através do próprio acesso à carótida direita, evitando assim contaminação com o contraste iodado. O volume obtido nesse procedimento era de aproximadamente 400µL.

Outros animais que porventura não foram submetidos à angiografia (por problemas durante a canulação ou disponibilidade de horários para o procedimento) foram posteriormente sacrificados para coleta de sangue e órgãos. Nesse caso, o sangue foi coletado do ventrículo direito com o uso de uma seringa de 1 mL acoplada a uma agulha de insulina (13x4,5mm). Normalmente, o volume obtido nessa coleta era de aproximadamente 700 µL.

Independente da forma de coleta, todas as amostras eram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 4000 rpm à temperatura ambiente. Em seguida, o soro era recolhido e finalmente armazenado a -20 °C até o dia das dosagens de colesterol plasmático e de estradiol.

3.5 Dosagem de colesterol plasmático

As dosagens de colesterol total em soro de camundongos foram realizadas pelo método enzimático colorimétrico utilizando “kit” da BIOCLIN. O colesterol foi determinado após a hidrólise enzimática e oxidação das amostras do soro. O indicador quinoneimina é formado a partir do peróxido de hidrogênio e 4- aminofenazona na presença do fenol e peroxidase, obtendo-se assim uma coloração rosa em intensidade proporcional à quantidade de colesterol da amostra. Todas as amostras foram lidas num espectrofotômetro (Biospectro SP-220) a 500 nm.

3.6 Dosagem de estradiol plasmático

As dosagens de estradiol em soro de camundongos foram realizadas pelo método de quimioluminescência automatizada com kits comercialmente disponíveis *Diagnostic Products Corporation* (DPC – *Immunolite*-USA), sob auxílio do laboratório de Análises Clínicas “Marcos Daniel” em Vitória-ES.

3.7 Perfusão, coleta de órgãos e tecidos

Após a angiografia e ainda sob anestesia, os animais foram toracotomizados, o átrio direito foi perfurado e a aorta canulada através do ventrículo esquerdo. Dessa forma, iniciou-se a perfusão com 50 mL de tampão fosfato (PBS 0,1M - pH 7,4), até total retirada do sangue remanescente. A perfusão vascular foi continuada com 50 mL de paraformaldeído tamponado (4%) com pressão constante de 100 mmHg. Posteriormente, os órgãos submetidos à análise (pulmões e útero) foram extraídos cuidadosamente, pesados e colocados em estufa aquecida a 40° C por no mínimo 18 horas para desidratação dos mesmos e em seguida serem novamente pesados. Após obtenção dos pesos secos do pulmão, o teor de água (%H₂O) de cada órgão foi definido pela equação abaixo (conforme Portes e Tucci, 2005):

$$\%H_2O = (\text{peso úmido} - \text{peso seco}) / \text{peso úmido} \times 100$$

Finalmente, foram retirados o coração e o segmento aórtico para análise histológica, detecção de senescência e deposição lipídica.

3.8 Análises Histológicas

Após retirada do coração e o segmento aórtico de interesse, os mesmos foram alocados em recipientes plásticos contendo solução de PBS com paraformaldeído (9:1) até o momento da preparação histológica.

Para análises de imagens longitudinais, o coração com a valva aórtica íntegra e a porção proximal da aorta ascendente foram preparados para inclusão em parafina com uso de álcool e xileno (xilol) em diferentes tempos e concentrações. Após a inclusão, foram feitos cortes de 10 µm de espessura e os cortes colocados sobre lâminas de vidro tratadas com albumina para aderência tecidual. Em seguida, os cortes foram submetidos a 3 (três) tipos de colorações: 1) hematoxilina-eosina (HE), deixando os tecidos corados em azul-arroxeado (estruturas basófilas) e em róseo-avermelhado as estruturas acidófilas; 2) Von Kossa (VK), deixando os tecidos descalcificados em tom vermelho-alaranjados e pretos em locais com deposição de cálcio; 3) Tricrômio de Masson (TM), para observar a presença de deposição de colágeno (coloração azul) além de núcleos marcados com uma coloração vermelho-

escura. Ao término da impregnação pelos corantes, realizou-se a montagem para a preservação dos cortes.

Para a análise de cortes transversais, o coração com a valva aórtica e a porção proximal da aorta ascendente foram embebidos em 24% de solução com gelatina. Os cortes foram realizados com espessura entre 12 a 20 μm de espessura num criostato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Jung CM 1800; Leica, Wetzlar, Germany). Após alocação dos cortes em lâmina, esses foram corados com Oil-Red-O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para a detecção de lipídeos neutros e hematoxilina (Sigma-Aldrich) para a visualização dos núcleos celulares.

Com uso de um microscópio (Olympus AX70; Olympus, Center Valley, PA) acoplado a uma câmera digital (VKC150; Hitachi, Tokyo, Japan) fez-se a captura das imagens de interesse, tanto da musculatura e a valva cardíaca como a aorta ascendente tanto no sentido longitudinal quanto transversal. Tais procedimentos foram efetuados no laboratório de patologia Virchow (Vitória-ES) ou no Departamento de Morfologia da UFES. A medida da máxima espessura de cada valva em corte transversal foi realizada através do *software* "Image J" (domínio público - *National Institute of Health*, USA), de acordo com Droogmans et al., 2007 e 2009.

3.9 Preparação "en face"

A análise *en face* determina na totalidade a área de lesão ou seleciona regiões previamente padronizadas da íntima aórtica. Para tanto, a aorta é dissecada livremente desde o ponto inicial da aorta ascendente até a bifurcação ileal (figura 20). A completa retirada da camada adventícia é cuidadosamente realizada no próximo dia. Em seguida, o corte inicial é realizado através da curvatura aórtica menor e estendido até a bifurcação ileal. O segundo corte é feito simetricamente ao longo da curvatura maior até o nível da artéria subclávia. Durante todo o processo foi necessário ter o cuidado para não deslocar lesões ateroscleróticas da superfície intimal. A padronização da dissecação é importante para manter intactas as regiões com lesão conforme descrito previamente por Paigen (1987) e pormenorizado por Daugherty and Rateri (2006). Após o corte, as aortas foram presas em superfície de EVA com pinos de aço para manter sempre o tecido na sua posição plana e horizontal.

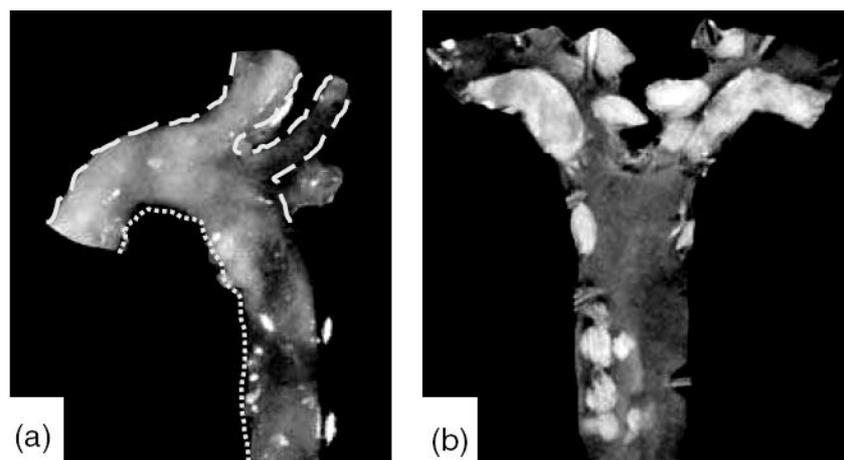


Figura 20. Exemplo de análise *en face* de lesões ateroscleróticas, conforme Paigen e colaboradores (1987) e Daugherty e Rateri (2006). (a) As linhas tracejadas e pontilhadas indicam o modo do corte ao longo do arco aórtico (b) Um exemplo de uma aorta presa com pinos em superfície de EVA (Etileno Acetato de Vinila) para posterior análise de senescência celular e deposição lipídica.

3.10 Senescência vascular aórtica

Para a detecção de senescência vascular, utilizou-se a técnica de coloração por medida de atividade enzimática da β galactosidase (β -gal em pH 6,0) (Minamino & Komuro, 2007). As amostras previamente prontas *en face* foram lavadas com PBS e posteriormente expostas em uma solução contendo 1 mM de $MgCl_2$, $K_3Fe(CN)_6$ (4,9 mM), $K_4Fe(CN)_6$ (4,7 mM), e X-gal, 2,4 mM (Sigma-Aldrich) em PBS por 18 h a 37° C em pH 6,0. Em tecidos senescentes, o X-gal é hidrolisado pela β -gal e produz um indoliol o qual é oxidado e emite a coloração azul. A análise da senescência foi realizada através da intensidade e extensão da coloração azul cujas imagens foram adquiridas usando uma câmera digital de alta resolução (Canon) e posteriormente digitalizadas para análise morfológica pelo software "Image J" (domínio público - *National Institute of Health, USA*).

3.11 Deposição lipídica vascular

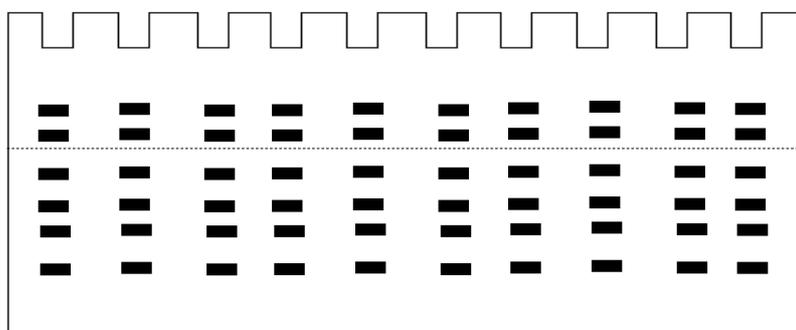
As amostras previamente submetidas à avaliação de senescência vascular foram posteriormente destinadas para a observação de deposição lipídica, através de uma coloração com o marcador de lipídeos Oil-Red para visualização de acúmulos de lipídeos.

Todas as amostras eram submersas em solução alcoólica com o Oil-Red por 1 minuto e em seguida lavadas em uma cuba com água até retirar todo o excesso do corante vermelho. A análise da deposição lipídica foi realizada através da intensidade e extensão da coloração vermelha cujas imagens foram adquiridas usando uma câmera digital de alta resolução (Canon) e posteriormente digitalizadas para análise morfométrica pelo *software* “Image J” (domínio público - *National Institute of Health, USA*).

3.12 Expressão de SERCA2a ATPase

Os órgãos previamente perfundidos foram retirados do armazenamento a -80°C e sob refrigeração a -4°C foram triturados com bisturi e vertidos num homogeneizador de vidro em tampão de lise hipotônico a 60°C contendo TrisHCl pH7,4-10 mM, NaVO_3 -1mM, SDS-1%, DTT- 0,5 mM, EDTA- 5 mM, PMSF-1mM, NaF-10 mM e inibidor de protease-1:100 (0.1 $\mu\text{L}/\text{mg}$ - Sigma Aldrich P2714) para homogeneização em gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 11000 rpm (4°C) durante 15 minutos e o sobrenadante foi recolhido. Alíquotas do homogeneizado foram utilizadas para a determinação da concentração de proteína pelo método de Bradford (1976).

Foi calculada a quantidade necessária do extrato para aplicação de 80 μg de proteína em um gel de acrilamida (SDS-PAGE). Em seguida foi preparado o gel em um sistema Mini-Protean III (BioRad) o qual é composto por dois níveis: Gel 1 ou de separação (8% de acrilamida) e Gel 2 ou de entrada (3% de acrilamida), conforme a figura 21.



Pereira

Figura 21. Esquema simples de eletroforese (SDS-PAGE). Nesta etapa, as proteínas na sua estrutura linear são separadas mediante o peso molecular.

Alíquotas do homogeneizado foram diluídas em solução de Laemmli (Tris-HCl-62,5 mM c/ pH 8,0, SDS-2%, glicerol-25%, Azul de bromofenol 0,01%, DTT-6%, uréia 39 μ M) em concentrações definidas de proteína, como citado anteriormente. Esta diluição foi realizada na proporção de 1:1. Posteriormente, foram fervidas as alíquotas já diluídas a 99° C durante 4 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas no Gel 2 (gel de entrada) previamente preparada sobre o Gel 1 (gel de separação) no sistema. Em dois poços distintos, no mesmo gel, serão aplicados 4 μ L de marcador de peso molecular (Invitrogen) cuja função é comprovar a separação e a posterior transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose. Após aplicação, foi adicionada uma corrente constante de 80V (Power Pac 300, BioRad) por 1 hora e 30 minutos ou até desejada separação das bandas observada pelos marcadores de peso molecular cromóforos (Invitrogen- Lc 5725).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-GE-*Healthcare*) previamente embebida com solução de transferência (Tris-25 mM, Glicina-190 mM, Metanol-20%, SDS-0,1%) por 30 minutos. Para a transferência, o gel, a membrana e o papel de Whatman foram colocados em um sistema de *sandwich* (Figura 22) dentro de um Trans-Blot *Semi-dry* (BioRad). O sistema foi submetido a uma corrente constante de 25 V (Power Pac 300, BioRad) durante 30 minutos.

A transferência foi confirmada pela presença de coloração das bandas do marcador de peso molecular na membrana, pela ausência de bandas no gel através da coloração com Coomassie Blue além da coloração da membrana com Ponceau 0,1 % em ácido acético.

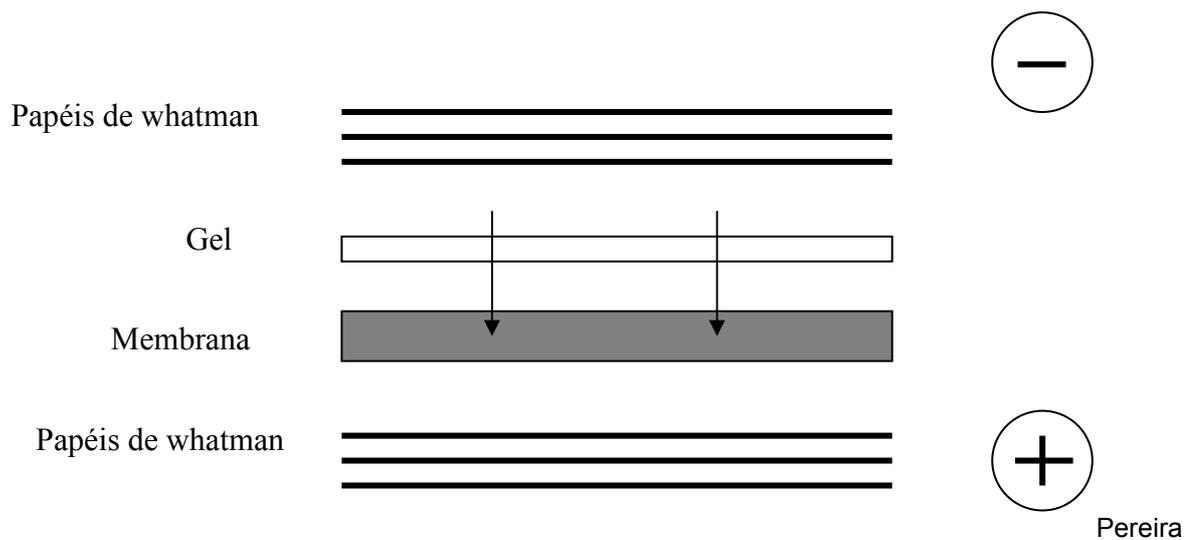


Figura 22. Representação esquemática da transferência de proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose. As setas indicam o sentido da migração das proteínas (catodo para o anodo) previamente separadas durante a eletroforese (SDS-PAGE), de acordo com o peso molecular.

Para descoloração da membrana, foi utilizado ácido acético 1% por 5 minutos. Em seguida, água deionizada durante 5 minutos e por fim, TBS-T (NaCl-500mM, Tris HCl- 20mM pH7,5, Tween 20- 0,1%) durante 5 minutos. A seguir, o bloqueio não específico da membrana foi realizado com *wash buffer* (NaCl-100mM, Tris HCl- 10mM pH7,5, Tween 20- 0,1%) com 5% de leite desnatado por um período de 1 hora no *orbital shaker*. Após isso, a membrana foi lavada com *wash buffer* em 3 momentos (15, 5 e 5 minutos, respectivamente). Após lavagem, a membrana foi dividida em duas partes para incubação devida com os anticorpos primários anti-SERCA2a ATPase (*Affinity bioreagents* - MA3-919, monoclonal, diluição 1/500 em TBS-T + BSA a 5%) e anti-GAPDH como *housekeeping* (Abcam 8245, monoclonal, 1/5000 em TBS-T + leite desnatado a 5%) ambos em *overnight* a 4°C no *orbital shaker* a 57 rpm. O corte da membrana possibilita a exposição simultânea dos 2 tipos de anticorpos, já que as proteínas avaliadas possuem pesos moleculares de 115kDa e 37 kDa, respectivamente.

Cuidadosamente, a membrana foi lavada com TBS-T em 3 momentos e 10 minutos, também sob agitação (57 rpm). Após lavagem, foi feita a incubação do anticorpo secundário anti-*mouse* (*Stressgen- SAB-100* em TBS-T + leite desnatado a 5% em diluições de 1/2500 para SERCA 2a e 1:5000 para GAPDH) e durante 1 hora sob agitação em temperatura ambiente. Mais uma vez, a membrana foi lavada com TBS-T em 3 momentos de 10 minutos, também sob a mesma agitação. Finalmente, para promover a retirada do *Tween* é realizado mais 3 lavagens com TBS. Para revelação da membrana, foi usado o sistema para ECL-PLUS (*GE Healthcare -RPN 2132*). A membrana foi envolvida com plástico e fixada no hipercassete. Rapidamente, numa sala escura, o filme de raio X (*Hyperfilm- cód. 28906840*) foi adicionado sobre esta membrana. Após exposição de 2 minutos (ou mediante a intensidade de luz emitida), o filme foi revelado (revelação-fixação-lavagem, IBF-filmes, Brasil, São Paulo). A seguir, esse foi retirado e observado sob luz vermelha apropriada. A seguir, as imagens respectivas foram digitalizadas com o auxílio do *scanner*, as quais foram salvas em arquivo tipo "TIF". Em seguida, a quantificação das bandas foi feita com o auxílio do *software* "Image J" (domínio público - *National Institute of Health, USA*).

3.13 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM. As médias dos valores comparando os diferentes grupos foram analisadas estatisticamente análise de variância (ANOVA) de uma via completamente randomizadas, seguida do teste *post hoc* de Tukey, utilizando-se o *software* PRISMA (versão 5). O teste *t* de Student foi utilizado apenas quando a comparação desejada era entre 2 amostras independentes. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

Resultados

4.1 Angiografia e histologia aórtica em camundongos C57 e ApoE

A angiografia adaptada para camundongos permitiu avaliarmos o diâmetro interno médio aórtico o qual foi subdividido em 4 segmentos. Conforme a figura 23, observamos que não houve diferença entre os diâmetros internos dos animais C57 em comparação aos animais ApoE em quaisquer segmentos (segmento A: $1,9 \pm 0,05$ vs $1,8 \pm 0,04$ mm; segmento B: $1,6 \pm 0,04$ vs $1,5 \pm 0,04$ mm; segmento C: $1,3 \pm 0,03$ vs $1,2 \pm 0,03$ mm; segmento D: $1,1 \pm 0,02$ vs $1,05 \pm 0,02$ mm, respectivamente). Quanto a velocidade de fluxo, também não foi observada diferença entre os grupos C57 e os animais ateroscleróticos ApoE ($95,4 \pm 6,2$ vs $102 \pm 5,7$ mm/s) conforme mostrado na figura 24.

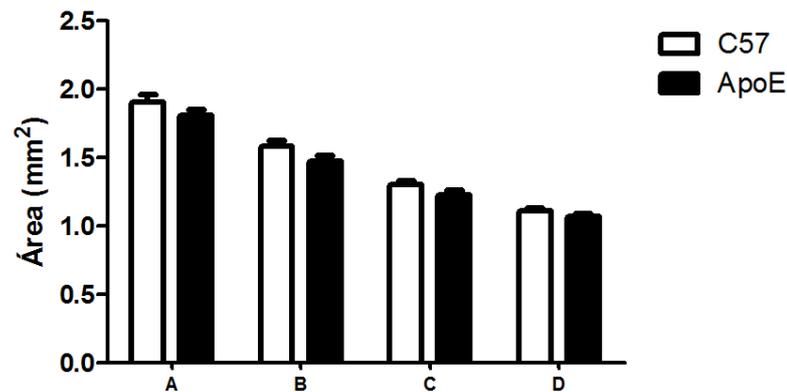


Figura 23. O gráfico de barras mostra os valores dos diâmetros internos em 4 segmentos aórticos (A, B, C, D) observados pela angiografia nos grupos de camundongos C57 (n = 24) e ApoE (n=23). Os valores indicam media± EPM, teste t de Student.

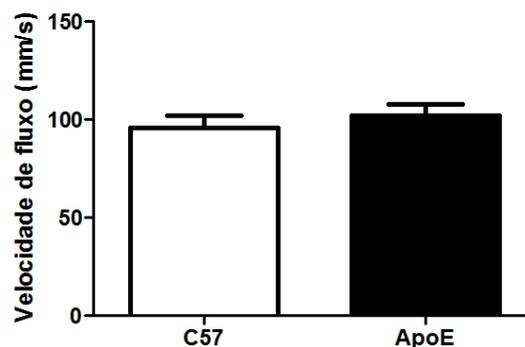


Figura 24. O gráfico de barras mostra a velocidade de fluxo (mm/s) obtida através da angiografia nos grupos de camundongos C57 (n = 21) e ApoE (n=23). Os valores indicam media± EPM, teste t de Student.

A microscopia da figura 25 demonstra os cortes transversais da aorta ascendente de animais C57 e ApoE. Ao compararmos o diâmetro interno desse segmento entre os grupos, observamos que os valores não eram diferentes (C57: 998 ± 70 vs ApoE: 1168 ± 25 mm²), mesmo diante da marcante deposição lipídica nos animais ApoE evidenciada pela coloração com Oil Red. Após a medida do diâmetro externo, encontra-se a justificativa: os animais ateroscleróticos desenvolveram um significativo remodelamento positivo (2617 ± 149 mm²) quando comparados ao grupo C57 (1396 ± 159 mm², $p < 0,001$), corroborando assim para a manutenção do diâmetro interno.

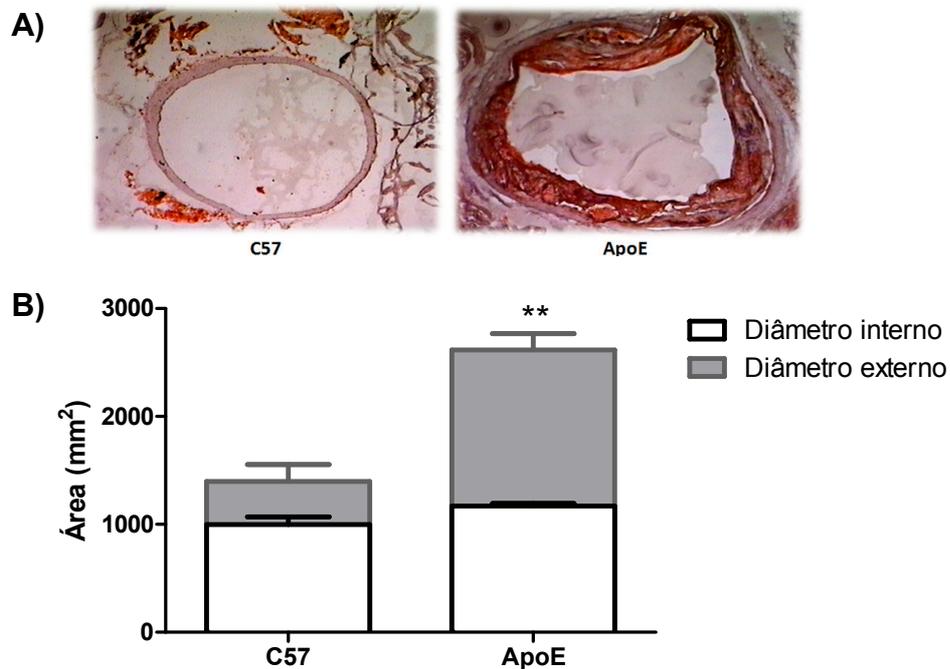


Figura 25. Avaliação de diâmetro interno e externo de aorta descendente. A) Imagens típicas de aorta ascendente (em corte transversal) de animais C57 (n=6) e ApoE (n=6) coradas com *Oil Rede* hematoxilina (40x). B) Gráfico de barras representando os diâmetros interno (branco) e externo (cinza) de ambos os grupos. Os valores indicam $\text{media} \pm \text{EPM}$, teste t de Student, $p < 0,001$.

4.2 Análises morfométricas em aorta de camundongos C57 e ApoE fêmeas e machos

No decorrer das análises bioquímicas e histológicas, observamos que a colesterolemia e o agravamento da placa aterosclerótica das aortas dos animais senis C57 e ApoE apresentavam uma evidente distinção não somente entre os modelos, mas também de acordo com o gênero (figura 26). Para confirmarmos tais evidências, optamos por segmentar os grupos em fêmeas e machos e analisarmos também através da técnica *en face*, por meio da coloração com *Oil Red* e do ensaio enzimático de senescência celular pela beta-galactosidase. Conforme a mesma figura, encontramos uma significativa progressão de deposição lipídica em ApoE machos ($0,35 \pm 0,05 \text{ cm}^2$) em comparação às fêmeas ($0,21 \pm 0,04 \text{ cm}^2$, $p < 0,05$), cujos níveis de colesterol também apresentaram diferença (ApoE machos: 650 ± 92 vs ApoE fêmeas: $336 \pm 32 \text{ mg/dL}$, $p < 0,0001$). Após 12 meses as fêmeas ovariectomizadas ApoE foram analisadas mantendo-se a diferença em relação aos ApoE machos tanto na deposição lipídica ($0,19 \pm 0,01 \text{ cm}^2$) quanto na colesterolemia ($373 \pm 39 \text{ mg/dL}$).

Quanto aos animais normocolesterolêmicos, nem a deposição lipídica dos animais C57 (macho: $0,12 \pm 0,01$ vs fêmea: $0,11 \pm 0,01 \text{ cm}^2$) nem a colesterolemia (C57 macho: $96 \pm 6,5$ vs C57 fêmea: $81 \pm 3,7 \text{ mg/dL}$) apresentaram diferença estatística. Após 12 meses as fêmeas ovariectomizadas C57 foram analisadas não apresentando qualquer diferença em relação aos C57 machos tanto na deposição lipídica ($0,01 \pm 0,007 \text{ cm}^2$) quanto na colesterolemia ($78 \pm 6 \text{ mg/dL}$).

Quanto a senescência celular (figura 26), os resultados acompanharam o mesmo perfil da deposição lipídica e colesterolemia: diferença de senescência entre os ApoE (machos: $0,19 \pm 0,08$; fêmeas: $0,025 \pm 0,02$; ovx: $0,01 \pm 0,002 \text{ cm}^2$, $p < 0,05$) e nenhuma alteração entre os C57 (machos: $0,016 \pm 0,01$; fêmeas: $0,011 \pm 0,008$; ovx: $0,007 \pm 0,002 \text{ cm}^2$).

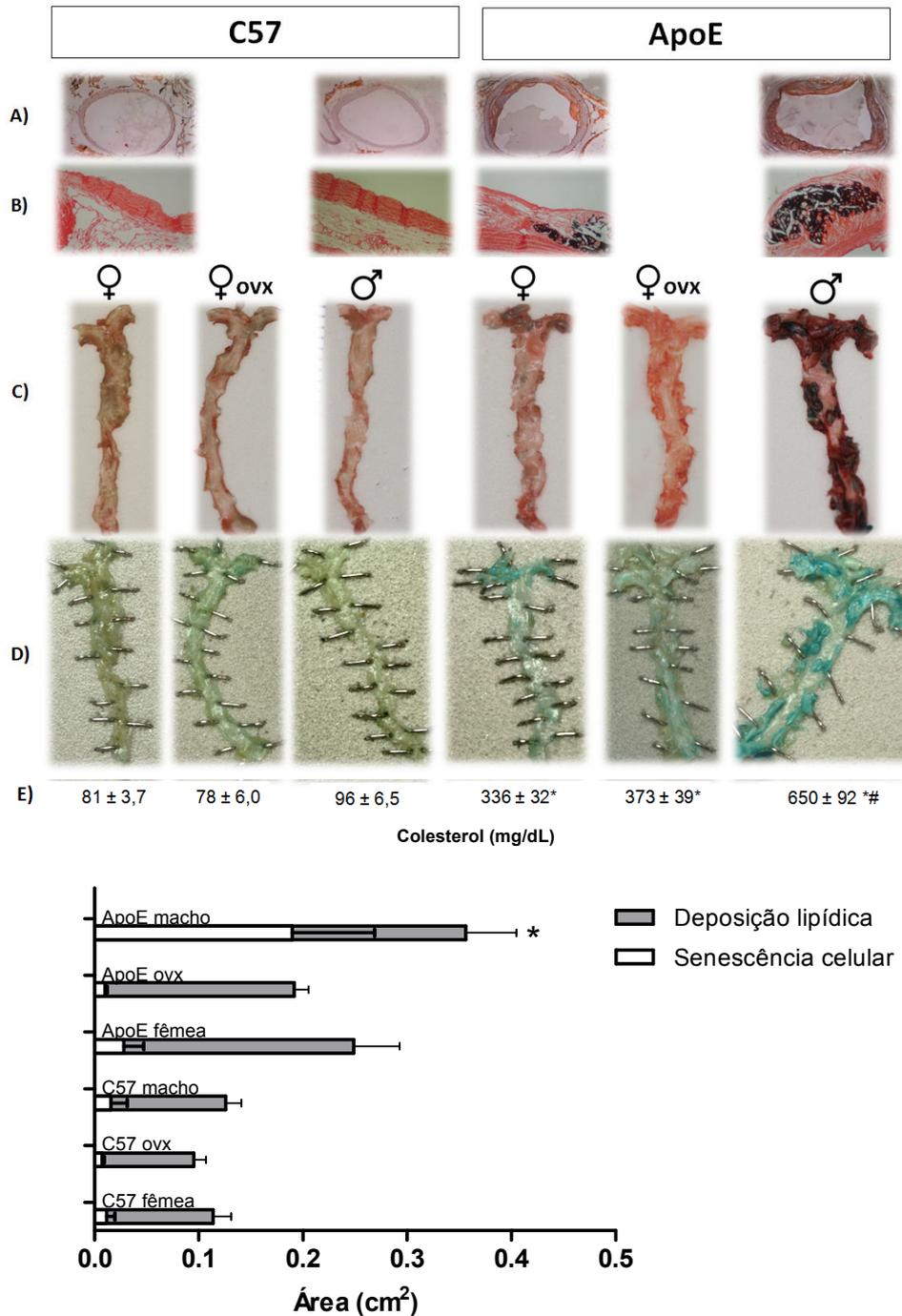


Figura 26. Aortas de camundongos C57 e ApoE fêmeas e machos submetidos: A) ao corte transversal (aumento de 40x) com coloração *Oil Red* e hematoxilina; B) corte longitudinal de aorta com coloração de Von Kossa (evidenciando depósitos de cálcio e indiretamente colesterol). Em C, D e E, com adição dos grupos ovariectomizados (ovx): C) corte longitudinal (*en face*) com coloração *Oil Red*; D) corte longitudinal (*en face*) com ensaio para senescência celular (X-Gal, pH=6,0); E) Colesterolemia dos respectivos grupos cujos valores correlacionam-se proporcionalmente com as imagens obtidas. O gráfico representa a correlação entre as áreas de deposição lipídica e senescência vascular. Os valores indicam media ± EPM, ANOVA-1 via, *p<0,001 vs C57 e # p<0,001 vs ApoE fêmea ou ApoE ovx. Os números de animais

utilizados para A, B, C, D e E respectivamente são: C57 fêmea (n=3;6;13;14;23), C57 macho (n=3;6;5;5;19), ApoE fêmea (n=3;6;9;9;16), ApoE macho (n=3;6;11;8;13), C57 ovx (n=10) e ApoE ovx (n=7).

4.3 Regurgitação aórtica (RA) em camundongos C57 e ApoE fêmeas e machos

A figura 27 mostra o gráfico de barras sobre o grau de RA em camundongos C57 fêmeas e machos, cuja diferença estatística foi observada ($0,7 \pm 0,24$ vs $3,0 \pm 0,24$ u.a. respectivamente, $p < 0,05$). Ainda que bradicárdicos diante da anestesia, os animais C57 fêmeas e machos não apresentaram diferença de frequência cardíaca (250 ± 44 vs 251 ± 28 bpm, respectivamente).

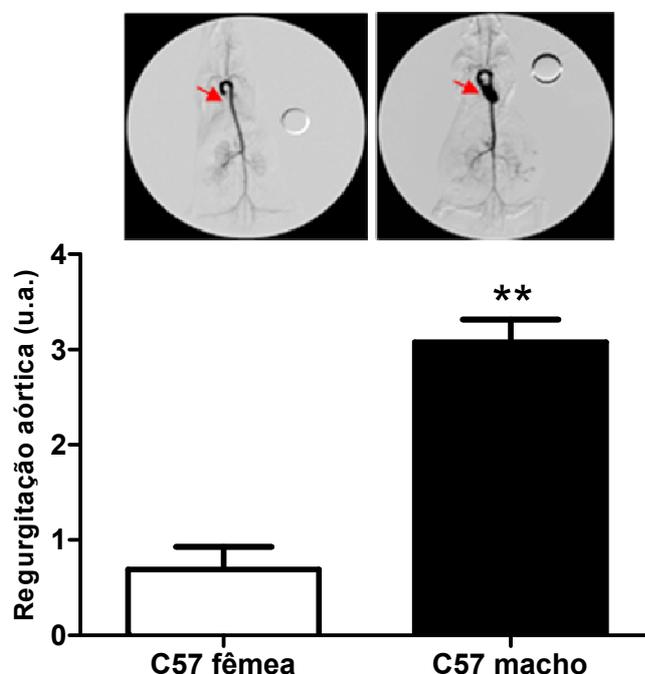


Figura 27. O gráfico de barras mostra o grau de regurgitação aórtica (RA) observado pela angiografia nos grupos de camundongos C57 fêmeas (n=13) e machos (n = 13). As imagens acima demonstram fotos típicas de camundongos C57 na ausência e na presença de regurgitação aórtica (RA). Os valores indicam media \pm EPM, ** $p < 0,01$ vs. C57 fêmea (teste t de Student).

Sabendo-se que as valvopatias podem ser agravadas pela dislipidemia e aterosclerose, surgiu a pergunta: como seria o grau de RA em animais idosos ateroscleróticos? Surpreendentemente, os animais hipercolesterolêmicos ApoE

(figura 28), apresentaram o mesmo padrão observado nos camundongos C57: as fêmeas possuíram um grau de RA menor em comparação aos ApoE machos ($0,75 \pm 0,22$ vs $2,25 \pm 0,33$ u.a., $p < 0,05$). Embora o cronotropismo negativo seja inerente ao procedimento, os animais ApoE fêmeas e machos também não apresentaram diferença de frequência cardíaca (284 ± 31 vs 254 ± 37 bpm).

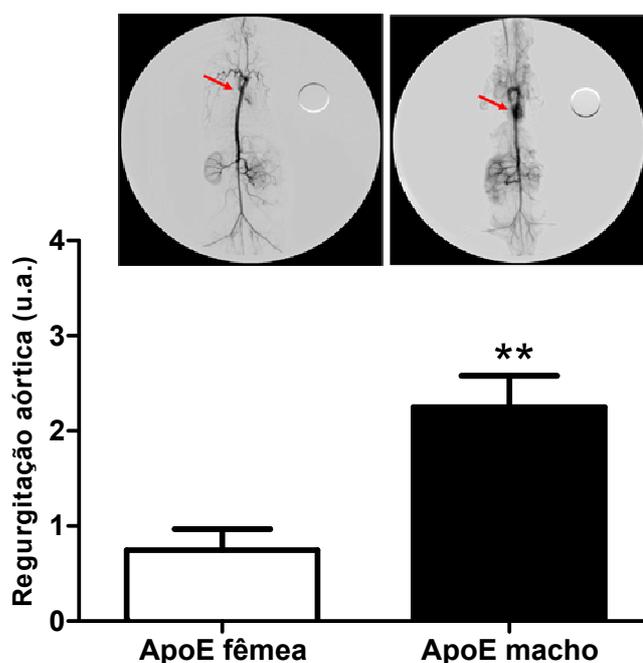


Figura 28. O gráfico de barras mostra o grau de regurgitação aórtica (RA) observado pela angiografia nos grupos de camundongos ApoE fêmeas ($n=12$) e machos ($n = 12$). As imagens acima demonstram fotos típicas de camundongos ApoE na ausência e na presença de regurgitação aórtica (RA). Os valores indicam $\text{media} \pm \text{EPM}$, ** $p < 0,01$ vs. ApoE fêmea (teste t de Student).

4.4 Análise valvar aórtica de camundongos C57 e ApoE fêmeas e machos

Para uma investigação mais detalhada da RA, as valvas aórticas de animais C57 e ApoE fêmeas e machos submetidas a cortes transversais e longitudinais foram analisadas. Medindo-se a região de maior espessura das valvas, foi possível observar transversalmente que as válvulas dos animais C57 fêmeas ($0,032 \pm 0,005$ mm) apresentavam menor espessura que as do C57 machos ($0,106 \pm 0,004$ mm). Em relação ao grupo ApoE, a diferença da espessura valvar também foi detectada (ApoE fêmea: $0,069 \pm 0,006$ vs ApoE macho: $0,186 \pm 0,003$ mm). Além da espessura quantificada, foi possível

detectar acúmulo de hemossiderina nos folhetos valvares de animais machos C57 e ApoE, contrastando com as fêmeas, conforme Figura 29. Em corte longitudinal, além da espessura foi possível observar maior severidade de lesões nos folhetos valvares dos animais ApoE (fêmeas e machos), apresentando maior intensidade de deposição de colesterol e colágeno acompanhado de acelularidade. Curiosamente, a coloração de Von Kossa não demonstrou maior calcificação nos animais ApoE (Figura 30).

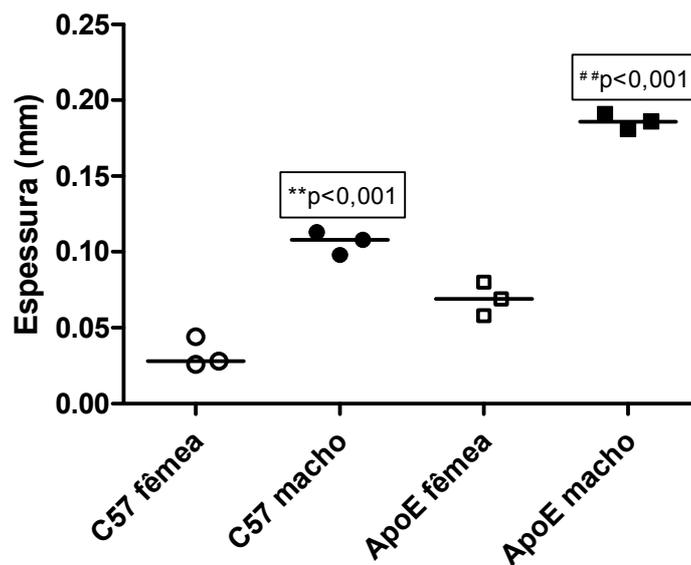
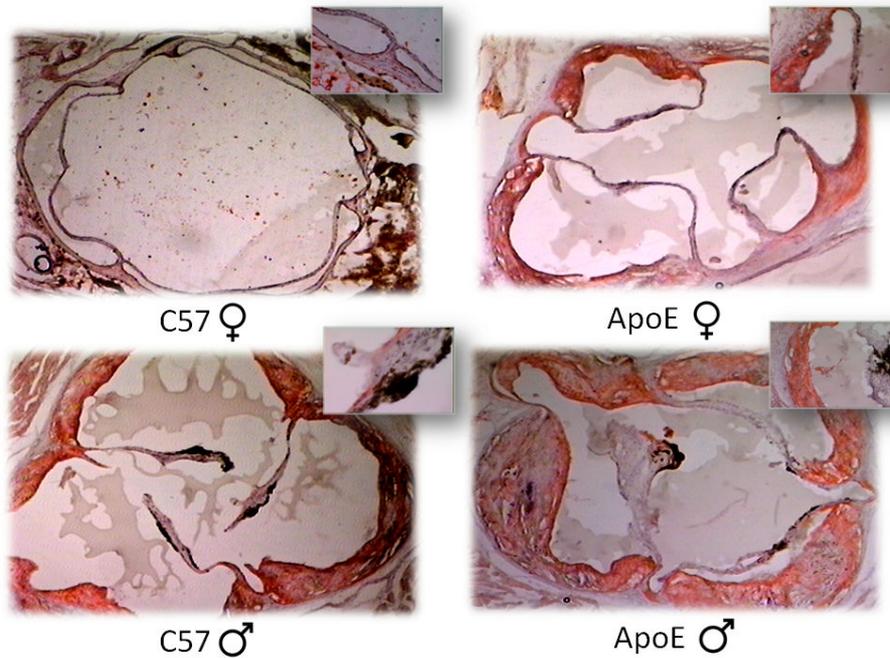


Figura 29. Análise de espessura valvar aórtica de camundongos. Acima, imagens típicas em cortes transversais de animais C57 e ApoE fêmeas e machos (em 400x, evidencia-se a espessura valvar dos respectivos animais, observando-se aumento de acelularidade e acúmulo

de hemossiderina nas valvas dos machos C57 e ApoE). O gráfico representa os valores de maior espessura dos folhetos valvares dos animais C57 fêmeas e machos (n=3 para cada grupo) e ApoE fêmeas e machos (n=3 para cada grupo), cuja comparação entre gêneros apresenta diferença estatística. A barra em preto representa a mediana.** p < 0,001 vs. C57 fêmea e ^{##} p < 0,001 vs. apoE fêmea (ANOVA-1 via). Coloração Oil Red + Hematoxilina (40x).

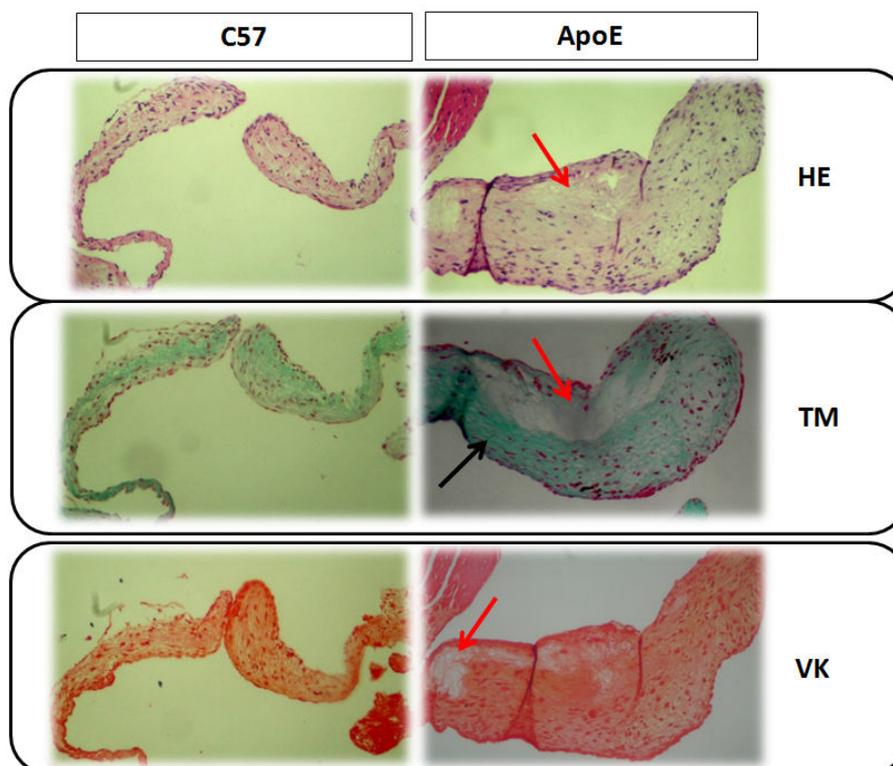


Figura 30. As imagens representam válvulas aórticas de camundongos C57 e ApoE submetidos a cortes longitudinais (aumento de 250x) com coloração Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômio de Masson (TM) e Von Kossa (VK). As setas vermelhas indicam alteração intersticial com acúmulo de glicosaminoglicanos e presença de acelularidade; as pretas indicam presença de colágeno. A marcação para VK não apresentou diferença entre animais C57 e ApoE.

4.5 Regurgitação aórtica (RA) em camundongos C57 e ApoE fêmeas ovariectomizadas

4.5.1 Camundongos C57

Os dados apresentados na tabela 05 demonstram a eficácia na obtenção de animais C57 fêmeas ovariectomizadas após 12 meses de cirurgia. A ovariectomia induziu um aumento de peso corporal ($36 \pm 2,0$ g) em comparação às fêmeas C57 ($31 \pm 0,9$ g, $p < 0,05$), além de atrofia uterina (C57 fêmea: $73 \pm 6,6$ vs C57 ovx: $23 \pm 5,3$ mg, $p < 0,05$) observada inclusive após a correção com o peso corporal dos animais (tabela 05). O nível de estradiol plasmático apresentou diferença estatística (C57 fêmea: $21,6 \pm 3,9$ pg/mL vs

C57 ovx: $4,8 \pm 2,1$ pg/mL). Apenas a colesterolemia não foi modificada entre os mesmos grupos ($81 \pm 3,7$ vs $78 \pm 6,0$ mg/dL, respectivamente).

Tabela 05. Efeitos da ovariectomia em fêmeas C57: peso uterino, níveis plasmáticos de estradiol e colesterol

Grupos	Peso corporal (g)	Peso uterino úmido (mg)	Relação peso uterino (úmido)/peso corporal(mg/g)	Relação peso uterino (seco)/peso corporal(mg/g)	Estradiol (pg/mL)	Colesterol (mg/dL)
C57 fêmea	$31 \pm 0,9$	$73 \pm 6,6$	$2,5 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,07$	$21,6 \pm 3,9$	$81 \pm 3,7$
C57 ovx	$36 \pm 2,0^*$	$23 \pm 5,3^*$	$0,7 \pm 0,1^*$	$0,2 \pm 0,08^*$	$4,8 \pm 2,1^*$	$78 \pm 6,0$

Valores expressos como média \pm EPM (teste t de Student). O número de animais utilizados para os parâmetros peso corporal, peso uterino+ correções, estradiol e colesterol respectivamente é: C57 fêmea (n=26;16;11;23) e C57 ovx (n=10;6;10;10).

A figura 31 apresenta o grau de RA em camundongos C57 fêmeas e machos em relação às fêmeas ovariectomizadas após 12 meses de cirurgia. Quando comparados, o resultado demonstrou que a ovariectomia não foi capaz de agravar a RA em relação ao grupo C57 fêmea ($0,7 \pm 0,36$ vs $0,7 \pm 0,24$ u.a. respectivamente) e além disso, a diferença entre os machos manteve-se significativa ($3,0 \pm 0,24$ u.a.). A bradicardia também presente em ovariectomizadas não apresentou diferença diante dos outros grupos C57 (fêmea: 250 ± 44 ; ovx: 217 ± 23 ; macho: 251 ± 28 bpm).

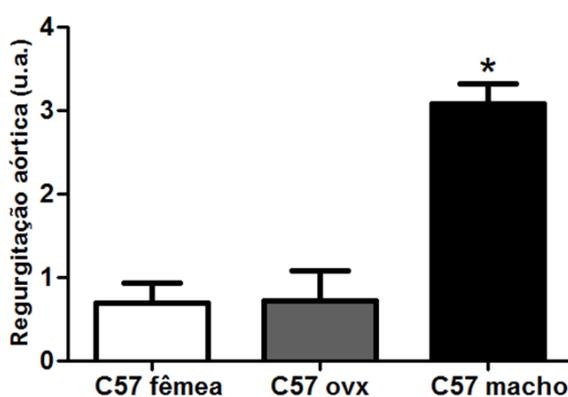


Figura 31. Grau de regurgitação aórtica (RA) observado pela angiografia em camundongos C57 ovariectomizadas (n=7) em comparação com C57 fêmeas (n=13) e machos (n = 13). Os valores indicam média \pm EPM, ** p < 0,01 vs. C57 fêmea e C57 ovx (ANOVA – 1 via).

4.5.2 Camundongos ApoE

Na tabela 06, demonstra-se a eficácia na obtenção de animais ApoE fêmeas ovariectomizadas após 12 meses de cirurgia, assim como em animais C57. A ovariectomia induziu um aumento de peso corporal ($33 \pm 0,6$ g) em comparação às fêmeas ApoE ($30 \pm 0,5$ g, $p < 0,05$), além de atrofia uterina (ApoE fêmea: $76 \pm 8,7$ vs ApoE ovx: $26 \pm 4,5$ mg, $p < 0,05$) observada inclusive após a correção com o peso corporal dos animais (tabela 06). Assim como os animais C57, o estradiol plasmático apresentou diferença estatística (ApoE fêmea: $19,1 \pm 4,5$ pg/mL vs ApoE ovx: $5,3 \pm 1,8$ pg/mL, $p < 0,05$). A colesterolemia não foi modificada entre os mesmos grupos (336 ± 32 vs 373 ± 39 mg/dL, respectivamente).

Tabela 06. Efeitos da ovariectomia em fêmeas ApoE: peso uterino, níveis plasmáticos de estradiol e colesterol

<i>Grupos</i>	<i>Peso corporal (g)</i>	<i>Peso uterino úmido (mg)</i>	<i>Relação peso uterino (úmido)/peso corporal(mg/g)</i>	<i>Relação peso uterino (seco)/peso corporal(mg/g)</i>	<i>Estradiol (pg/mL)</i>	<i>Colesterol (mg/dL)</i>
ApoE fêmea	$30 \pm 0,5$	$76 \pm 8,7$	$2,6 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,07$	$19,1 \pm 4,5$	336 ± 32
ApoE ovx	$33 \pm 0,6^*$	$26 \pm 4,5^*$	$1,0 \pm 0,2^*$	$0,3 \pm 0,11^*$	$5,3 \pm 1,8^*$	373 ± 39

Valores expressos como média \pm EPM (teste t de Student). O número de animais utilizados para os parâmetros peso corporal, peso uterino+ correções, estradiol e colesterol respectivamente é: ApoE fêmea (n= 28;15;9;16) e ApoE ovx (n=6;4;7;7).

Na figura 32, o gráfico de barras apresenta o grau de RA em camundongos ApoE fêmeas e machos em relação às fêmeas ovariectomizadas após 12 meses de cirurgia. Quando comparados, o resultado demonstrou que a ovariectomia não foi capaz de agravar a RA em relação ao grupo ApoE fêmea ($0,75 \pm 0,25$ vs $0,75 \pm 0,22$ u.a. respectivamente) e mais ainda, a diferença entre os machos manteve-se significativa ($2,25 \pm 0,33$ u.a.), evidenciando assim um comportamento padrão entre os gêneros independentemente se hiperlipidemia ausente (C57) ou presente (ApoE). A bradicardia também foi presente em ovariectomizadas ApoE, não havendo diferença diante dos outros grupos fêmeas e machos (fêmea: 284 ± 31 ; ovx: 164 ± 11 ; macho: 254 ± 37 bpm).

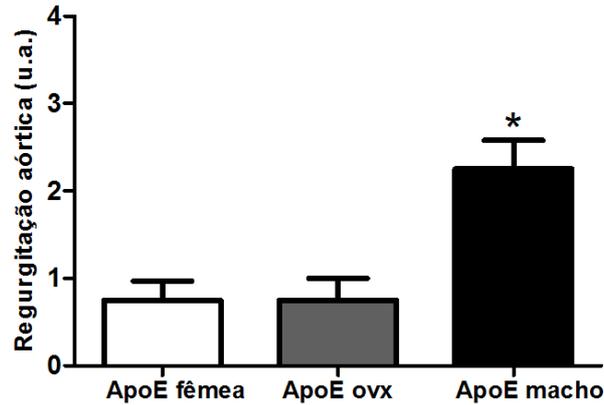


Figura 32. Grau de regurgitação aórtica (RA) observado pela angiografia em camundongos ApoE ovariectomizadas (n=4) em comparação com ApoE fêmeas (n=12) e machos (n = 12). Os valores indicam media± EPM, * p < 0,05 vs. ApoE fêmea e ApoE ovx (ANOVA – 1 via).

4.6 Investigação de repercussões fisiopatológicas em órgãos-alvo da RA

4.6.1 Camundongos C57

Todos os três grupos foram submetidos a uma investigação mais detalhada sobre possíveis conseqüências fisiológicas da RA. Entre os parâmetros avaliados, como teor de água pulmonar, relação peso cardíaco/peso corporal e área ventricular (45° e 90°), não foi observado nenhuma diferença entre os grupos, conforme a tabela 07.

Tabela 07. Parâmetros ponderais de teor de água pulmonar, peso cardíaco e área ventricular de camundongos C57

Grupos	Teor de água pulmonar (%H ₂ O)	Relação peso cardíaco (úmido)/peso corporal(mg/g)	Área ventricular 90° (mm ²)	Área ventricular 45° (mm ²)
C57 fêmea	75,7 ± 0,6	5,9 ± 0,4	0,31 ± 0,03	0,31 ± 0,03
C57 ovx	80,5 ± 2,8	5,0 ± 0,5	0,35 ± 0,02	0,33 ± 0,04
C57 macho	75,7 ± 1,2	5,7 ± 0,4	0,28 ± 0,02	0,26 ± 0,03

Valores expressos como media ± EPM (ANOVA-1 via). O número de animais utilizados para os parâmetros teor de água, peso cardíaco e área ventricular respectivamente foram: C57 fêmea (n=18;14;7), C57 ovx (n=4;7;7) e C57 macho (n=11;13;10).

Além dos parâmetros ponderais, a expressão da proteína SERCA2a do tecido cardíaco de animais C57 não apresentou diferença quando comparados C57 fêmeas e C57 machos (1,18 ± 0,21 vs 1,13 ± 0,25 u.d.o., respectivamente), conforme figura 33.

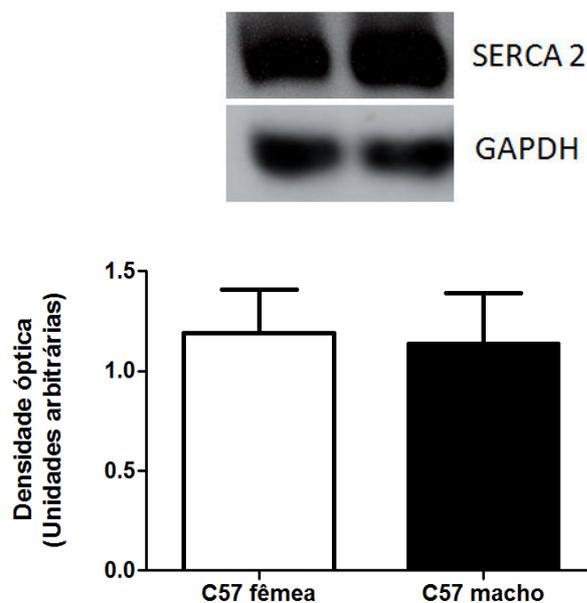


Figura 33. Expressão da proteína SERCA2a de coração de camundongos C57 fêmeas (n=7) e machos (n=5). A figura acima do gráfico de barras representa bandas típicas da expressão da SERCA2 e da proteína GAPDH (*housekeeping*). Os valores indicam $\text{media} \pm \text{EPM}$ (teste t de Student).

4.6.2 Camundongos ApoE

No intuito de avaliar possíveis conseqüências fisiológicas da RA, os três grupos ApoE também foram submetidos a mesma investigação realizada nos animais C57. Entre os parâmetros avaliados, como teor de água pulmonar, relação peso cardíaco/peso corporal e área ventricular (45° e 90°), não foi observado nenhuma diferença entre os grupos (tabela 08), sendo portanto mais um resultado que se assemelha ao perfil dos animais C57.

Tabela 08. Parâmetros ponderais de teor de água pulmonar, peso cardíaco e área ventricular de camundongos ApoE

Grupos	Teor de água pulmonar (%H ₂ O)	Relação peso cardíaco (úmido)/peso corporal(mg/g)	Área ventricular 90° (mm ²)	Área ventricular 45° (mm ²)
ApoE fêmea	75,2 ± 0,5	6,0 ± 0,4	0,35 ± 0,02	0,28 ± 0,03
ApoE ovx	77,4 ± 3,1	5,9 ± 0,5	0,35 ± 0,02	0,32 ± 0,02
ApoE macho	75,8 ± 0,9	5,9 ± 0,3	0,27 ± 0,03	0,27 ± 0,03

Valores expressos como $\text{media} \pm \text{EPM}$ (ANOVA-1 via). O número de animais utilizados para os parâmetros teor de água, peso cardíaco e área ventricular respectivamente foram: ApoE fêmea (n=19;10;7), ApoE ovx (n=6;4;3) e ApoE macho (n=13;13;11).

Além dos parâmetros ponderais, a expressão da proteína SERCA2a do tecido cardíaco de animais ApoE também não apresentou diferença quando comparados ApoE fêmeas e machos ($0,82 \pm 0,12$ vs $0,85 \pm 0,11$ u.d.o., respectivamente), conforme figura 34.

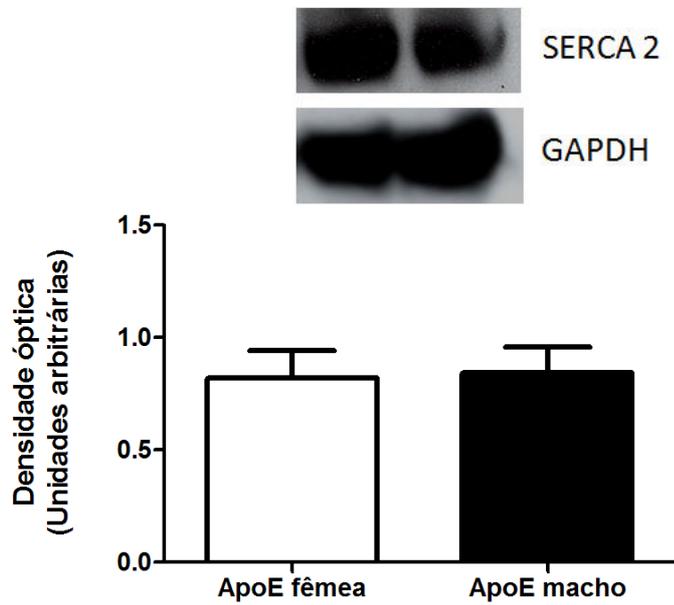


Figura 34. Expressão da proteína SERCA2a de coração de camundongos ApoE fêmeas (n=7) e machos (n=7). A figura acima do gráfico de barras representa bandas típicas da expressão da SERCA2 e da proteína GAPDH (*housekeeping*). Os valores indicam $\text{media} \pm \text{EPM}$ (teste t de Student).

Discussão

Recentemente, diversas modalidades de análises por imagem tem sido adaptadas para modelos experimentais a fim de aperfeiçoar a pesquisa de doenças relacionadas ao câncer (Gambhir, 2002), a respostas imunológicas (Hildebrandt e Gambhir, 2004), a desordens neurodegenerativas (Jack et al., 2007), a expressão de transgenes (Serganova e Blasberg, 2005) e inclusive a doenças cardiovasculares (Wiesel et al., 1997; Jaffer et al., 2006), como o presente estudo. A vantagem das análises por imagem é que quando associadas aos estudos convencionais de laboratório experimental permitem avaliações em série com um único animal (incorporando a possibilidade de identificar alterações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas simultaneamente) além de requerer menor necessidade de animais, evitando-se assim o uso de múltiplos grupos experimentais (Yamashita et al., 2002; Meir & Leitersdorf, 2004). Em nosso trabalho, conseguimos alcançar esses dois objetivos, diante de análises angiográficas concomitantes de diâmetro vascular e regurgitação aórtica, correlacionando tais resultados com ensaios bioquímicos e histológicos.

A angiografia humana adaptada aos camundongos C57 e ApoE permitiu a análise do segmento aórtico, cujos diâmetros internos variaram entre 1 a 2 mm aproximadamente. Esse dado inicial obtido contrasta os dados de Yamashita e colaboradores (2002) ao afirmarem (provavelmente de forma equivocada) que o sistema convencional de imagens por raios X só seria eficaz em leitos vasculares com 200 mm de diâmetro.

Quanto aos resultados angiográficos propriamente ditos, os diâmetros internos dos animais ApoE não foram diferentes dos camundongos normocolesterolêmicos. Conseqüentemente, duas hipóteses foram formadas: 1) a angiografia adaptada para camundongos não seria capaz de detectar a diferença entre os diâmetros aórticos dos camundongos ou 2) os animais ateroscleróticos desenvolveriam um remodelamento positivo compensatório mantendo assim a área luminal, apesar do avançado estágio de aterosclerose.

O remodelamento positivo é um importante fenômeno adaptativo às mudanças hemodinâmicas da AT com o objetivo de contrapor-se à diminuição luminal que comprometeria as artérias de grande calibre, através de um

reajuste de diâmetro com aumento da espessura da parede vascular (Birnbaum et al., 1997; Safar et al., 1998; Lutgens et al., 2001), observado tanto clinicamente (Glagov et al., 1987; Kiechl et al., 1999) como experimentalmente (Seo et al., 1997; Ward et al., 2000; Bentzon et al., 2003). Postula-se que o *shear stress*, a ativação de matriz de degradação protéica, o óxido nítrico, a disfunção endotelial e a hipertensão possam estar envolvidos nessa alteração estrutural vascular (Pasterkamp et al., 2000; Lutgens et al., 2001) embora os mecanismos que os regulem não sejam completamente elucidados, talvez pela sua multifatorialidade (Langille, 1993). Além disso, existem divergências se os mecanismos de “gatilho” pró-remodelamento seriam gerados apenas por respostas homeostáticas do endotélio a fim de manter normalizado o *shear stress* e a tensão de parede (segundo a lei de Laplace) ou por processos fisiopatológicos, modulados por fatores liberados da própria placa aterosclerótica (Ward et al., 2000; Bentzon et al., 2003; Nogueira et al., 2007).

Através da histologia da aorta ascendente em corte transversal, descartamos a primeira hipótese e concluímos que a angiografia só não detectou as diferenças luminais por que os animais ApoE desenvolveram tal resposta compensatória. Além disso, a manutenção da velocidade de fluxo (VF) entre os grupos C57 e ApoE corrobora o resultado de remodelamento (por se tratar de um parâmetro hemodinâmico inversamente proporcional à área de seção transversa vascular) e ainda apóia a inferência de que não somente a aorta ascendente, mas todos os segmentos aórticos desenvolveriam também uma resposta adaptativa de remodelamento glagoviano (Glagov et al 1987) mesmo sob severa progressão de placas ateroscleróticas visualizadas pelos ensaios histológicos.

A resposta adaptativa observada pela angiografia confirma os dados obtidos através de outra técnica não invasiva realizada por meio de ensaios de ressonância magnética nuclear. Fayad e colaboradores (1998) conseguiram mensurar o lúmen vascular, encontrando remodelamento positivo em camundongos ApoE de 36 a 84 semanas, contrastando com um grupo mais homogêneo do nosso trabalho (aproximadamente 72 semanas). Por outro lado, não há evidências de remodelamento positivo em animais de 12 a 19 semanas indicando que em recentes estágios de AT, o remodelamento positivo ainda possa não estar estabelecido (Bonhuth et al., 1997; Nogueira et al., 2007).

Provavelmente, essa resposta compensatória ocorre apenas em animais com idade superior a 20 semanas conforme resultados de Bentzon et al., 2003 e Weinreb et al., 2007, compatível com o desenvolvimento inicial de placas fibróticas e agravamento exponencial das lesões ateroscleróticas (Reddick et al., 1994; Javieñ et al., 2004; Meir e Leitersdorf, 2004) . Portanto, podemos inferir que nos recentes estágios de AT, os animais ApoE não desenvolveriam remodelamento positivo. Provavelmente, trata-se de um fenômeno adaptativo comum que se inicia durante a fase adulta (ou no início da progressão da placa) e se mantém ainda na fase senil dos animais ApoE, protegendo assim a área luminal aórtica durante toda a vida do animal.

Ao contrário da aorta, esse efeito compensatório parece não ser alcançado em artérias de menor calibre conforme observado em leitos coronarianos (dados não mostrados) ou em carótidas (Seo et al., 1997). Assim, podemos dizer que o leito aórtico de animais ApoE idosos é um segmento ideal para entendermos melhor os mecanismos envolvidos no remodelamento positivo, já que a falha no remodelamento normal em humanos possui uma elevada significância clínica (Glagov et al., 1987; Post et al., 1995; Kiechl e Willeit, 1999; Pasterkamp et al., 2002).

Ainda que o remodelamento positivo mantenha o lúmen aórtico nos animais ApoE, não poderíamos esperar que esse leito estivesse isento de severas influências da AT com possíveis conseqüências sistêmicas. Aliás, ainda que a aorta seja um leito de grande calibre, não se trata de um condutor passivo, mas sim de um vaso de condutância hábil para transformar um fluxo intermitente (característico do ciclo cardíaco) em um fluxo praticamente contínuo (não pulsátil) na maioria dos leitos vasculares distais (Safar et al., 1998; Nogueira et al., 2007). Em 2000, Wang e colaboradores demonstraram em camundongos ApoE idosos (13 meses) um aumento da velocidade de onda de pulso aórtico cujo parâmetro estaria envolvido diretamente com o enrijecimento aórtico. Aliado a isso, foram mostrados fragmentações da lâmina elástica e diminuição de resposta máxima ao NO, culminando em um prejuízo da resposta vasodilatadora.

As análises angiográficas em artérias de menor calibre seriam também excelentes alvos de análises por constituírem leitos de maior similitude com a fisiopatologia aterosclerótica humana. Entretanto, tal investigação somente

pode ser conseguida através da microangiografia. Em 2002, Yamashita e colaboradores foram pioneiros nessa identificação, ao observar obstruções em artérias carótidas, coronárias, braquiais e braquiocefálicas de camundongos ApoE idosos (15 meses) correlacionando tais imagens com ensaios histológicos apenas para comprovação da qualidade das análises angiográficas. Apesar dessa única publicação ter sido realizada há 7 anos, não houve como alvo de estudo o leito aórtico (nem em outras discretas investigações microangiográficas posteriores), sem qualquer menção ao remodelamento. Portanto, podemos afirmar que nossos resultados pela primeira vez descrevem o remodelamento positivo aórtico em animais ApoE através da angiografia.

Convém salientar que os diâmetros internos da aorta ascendente observados pela angiografia e pela histologia não apresentaram diferença relativa entre os grupos C57 e ApoE, apesar de existir em números absolutos. Tal diferença de valores não minimiza o poder do dado, uma vez que já se espera o encolhimento vascular que ocorre durante a preparação histológica sob variações de espessura ou orientação planar dos cortes obtidos (Fayad et al, 1998). Entretanto, tais diferenças de valores devem ser analisadas de forma mais minuciosa em algumas situações. Por exemplo, quando Javieñ e colaboradores (2004) afirmaram que o diâmetro aórtico não ultrapassaria 1 mm (utilizando inclusive como justificativa por que os animais ApoE não possuíam ruptura de placa), seus parâmetros provavelmente foram baseados em dados *in vitro* e não *in vivo*, uma vez que nossos achados angiográficos relatam diâmetro interno aórtico maior que 1mm em toda a extensão aórtica.

Apesar de exaustivas evidências da literatura sobre as diferenças de comprometimento vascular e cardíaco de acordo com a idade, o impacto do gênero associado a senilidade carecem de maiores delineamentos (Wei et al., 1984; Lakatta, 1987; Forman et al., 1997) já que grande parte dos estudos sobre as alterações cardiovasculares gênero-dependentes (morfológicas ou funcionais) são feitos em adultos jovens (Cabral et al., 1988; Krumholz et al., 1993). Dessa forma, explorar as diferenças relacionadas ao gênero no envelhecimento trata-se de um tema de alta relevância porque nos auxilia a tentar entender a maior longevidade das mulheres e fêmeas na maioria dos mamíferos (Forman et al., 1997).

Os ensaios bioquímicos e histológicos foram realizados com os mesmos animais submetidos a angiografia. No decorrer das análises, notamos que havia diferença entre a colesterolemia dos animais senis machos e fêmeas ApoE seguido da intensidade das lesões ateroscleróticas observadas. Desse modo, optamos por segmentá-los em grupos distintos, fazendo também o mesmo procedimento com os camundongos C57 (embora esses não apresentassem diferença significativa entre lesões e colesterolemia). Portanto, após estudos de diâmetro interno, todas as análises bioquímicas, histológicas e de regurgitação aórtica foram divididas entre grupos C57 e ApoE, com subdivisões entre machos e fêmeas. Posteriormente, a fim de elucidarmos possíveis participações de hormônios femininos na progressão da AT, adicionou-se o grupo das fêmeas C57 e ApoE ovariectomizadas.

Existem dois principais métodos comuns para quantificação de lesões ateroscleróticas em modelos murinos. Normalmente, tais procedimentos utilizam o leito aórtico como objeto de observação (Paigen et al., 1987), empregando-se técnicas como cortes transversais e longitudinais em regiões previamente padronizadas (podendo ser observadas lesões intimais ou subintimais) ou aplicando-se a técnica *en face* a qual determina na totalidade a área de lesão. Ao analisarmos os animais de 72 semanas por todas as formas citadas, percebemos que os resultados encontrados para cada grupo se complementavam, existindo uma forte correlação entre o grau de deposição lipídica, deposição cálcica e extensão da lesão analisadas. As técnicas histológicas utilizadas permitiram observar a distinta progressão aterosclerótica em machos ApoE senis, cuja diferença apresenta proporcionalidade com a expressiva hipercolesterolemia em comparação aos outros grupos idosos ApoE fêmea e obviamente aos grupos C57.

Raramente observa-se estudos relacionados a AT em camundongos ApoE em avançado estágio de senilidade, justificado em muitos casos pelo aparecimento precoce de placas inclusive sob dieta hiperlipídica (Plump et al., 1992; Javién et al., 2004; Meir e Leitersdorf, 2004). Quanto à minoria dos resultados existentes em animais ainda adultos (ou no início da senilidade) as dosagens de colesterol plasmático demonstram maiores níveis em machos embora sem diferença significativa (McRobb et al., 2009). Portanto, podemos afirmar que os distintos valores observados na fase senil de acordo com o

gênero são relatadas na literatura pela primeira vez. Apesar do ineditismo, os valores absolutos encontrados encontram-se compatíveis com o modelo ApoE (Plump et al., 1992; Reddick et al., 1994).

Algumas evidências tem sugerido que ao contrário dos humanos, os camundongos machos desenvolveriam menos lesões que fêmeas (Bourassa et al., 1996; Xu, 2006). As pioneiras comparações entre gêneros que geraram essa observação foram descritas por Paigen e colaboradores (1987) em camundongos jovens C57 (3 meses) sob dieta hiperlipídica. Em animais ApoE foi observado um padrão semelhante (4 a 6 meses) também sob dieta hiperlipídica (Qiao et al., 1994; Van Ree, 1994; Bourassa et al., 1996). Apesar de uma estratégia aceitável para aceleração do desenvolvimento das placas ateroscleróticas, a utilização de modelos “jovens” sob dietas hiperlipídicas nem sempre podem evidenciar condições fisiopatológicas semelhantes aos humanos (Weiss et al., 2006; Aikawa et al., 2007), apresentando maior variabilidade na área de lesão do que os modelos sem dieta (Meir e Leitersdorf, 2004). Dessa forma, nossos dados aparentemente contraditórios poderiam ser esclarecidos mediante a diferença das idades dos animais estudados e a isenção da influência da dieta hiperlipídica. Em busca desses trabalhos com animais idosos, em nenhum deles há uma comparação entre machos e fêmeas. Quando utilizam os dois gêneros, machos e fêmeas estão ainda bem abaixo da idade senil (34 semanas - McRobb et al., 2009) ou estão alocados num mesmo grupo em comparação com outro modelo experimental, como o trabalho de Reddick e colaboradores (1994) que acompanha a progressão da AT no modelo ApoE em relação ao C57 sem distinção entre machos e fêmeas.

Desde 1966, após a observação de que as mulheres após a menopausa aumentavam a incidência de DCV (Tracy, 1966) criou-se um dogma de que os hormônios sexuais femininos seriam fatores de proteção em relação as DCV (Jeanes et al., 2007). Inclusive, em estudos clínicos e experimentais posteriores, muitos detectaram efeitos benéficos do estrógeno diante da AT, por aumentar a expressão de receptores para LDL (Ma et al., 1986; Walsh e Schiff, 1991), diminuir a lipogênese (Bhatia e Wade, 1991), aumentar a atividade da lipase lipoprotéica (Liu et al., 1994) e possuir atividade anti-inflamatória (Xing et al., 2009). Apesar dessas clássicas evidências, tal hipótese atualmente possui dificuldade de uma boa fundamentação, uma vez

que o tratamento com estrógeno em menopausadas não reduzem a incidência de DCV (Stocker e Keaney, 2003). Nossos resultados reforçam essa idéia, pois não podemos afirmar que a diferença de hipercolesterolemia e a progressão da placa entre machos e fêmeas seja pelo estrógeno, uma vez que fêmeas ovariectomizadas durante 12 meses apresentaram níveis semelhantes de colesterol e nenhuma alteração de placa conforme figura XX. Nossos dados corroboram os de Bourassa e colaboradores (1996) ao afirmarem que a participação do estrogênio endógeno em camundongos não seria responsável pelo efeito protetor, mas que apenas sob tratamento crônico com 17-beta estradiol em doses supra-fisiológicas poderia haver alguma contribuição para diminuição da lesão aórtica e VLDL plasmático em ApoE ovariectomizadas. Revisões recentes que revelam a discrepância de resultados em relação aos hormônios sexuais e AT salientam a importância de possíveis influências genéticas que predisponham a AT, havendo a necessidade de novas investigações (Eckardstein e Wu, 2003; McGrath et al., 2008).

Para concluirmos sobre possível participação androgênica no agravamento das lesões ateroscleróticas e na hipercolesterolemia, precisaríamos da adição dos grupos machos castrados ou tratados com testosterona. Convém lembrar que até mesmo os estudos que avaliam apenas a participação androgênica, esses têm se mostrado contraditórios na literatura, em que muitos exercem efeitos benéficos ou neutros (em coelhos e camundongos) e outros deletérios (em camundongos, aves e macacos) (Li et al., 2003; Eckardstein e Wu, 2003). Vale ressaltar que dos modelos murinos estudados, todos foram realizados com o modelo ApoE onde apenas um deles descreve efeitos pró-aterogênicos (von Dehn et al., 2001; McGrath et al., 2008).

Dados recentes de McRobb e colaboradores (2009) fazem com que os efeitos androgênicos pró-aterogênicos não sejam descartados visto que tanto ApoE machos quanto ApoE fêmeas (34 semanas) tratadas com testosterona e dihidrotestosterona por 8 semanas apresentaram maior grau de calcificação além de maior área de placa no sino aórtico e artéria *innominata*. Dessa forma, além do fator “idade”, a perceptível diferença de deposição cálcica poderia ser potencializada pela ação androgênica (Allison et al., 2005). Um dos questionamentos desse trabalho seria a suplementação androgênica supra-fisiológica como estratégia de observação, cujos dados não poderiam ser

extrapolados para a ação androgênica endógena. Assim, nossos resultados poderiam preencher essa lacuna na literatura, visto que se não houve progressão de placa aterosclerótica em ApoE ovariectomizadas, a influência androgênica sobre a AT não pode ser descartada.

Além da hipercolesterolemia detectada e as hipóteses sobre a participação dos hormônios sexuais, investigamos outro possível mecanismo que possa contribuir para o início e progressão da AT em ApoE machos - a senescência celular (SC), diante da forte correlação entre esses dois fenômenos fisiopatológicos (Fenton et al., 2001; Erusalimsky e Kurz, 2005).

Uma das melhores técnicas para avaliação indireta de senescência celular (Kurz et al, 2000; Erusalimsky e Kurz, 2005) é o ensaio enzimático da β -Galactosidase (β gal) em pH=6,0. Trata-se de uma hidrolase presente em lisossomos que cliva ligações glicosídicas do tipo β 1-4 de vários resíduos galactosil como gangliosídios, glicoproteínas e também de outros substratos artificiais. O seu pH ótimo é aproximadamente entre 4.0 a 4.5, compatível com o pH lisossomal, podendo ter sua atividade mensurada através do substrato X-gal. Entretanto, em pH próximo de 6.0, a atividade da β gal bem como a expressão de seu respectivo RNAm foi encontrada elevada apenas em tecidos senescentes como culturas de fibroblastos humanos, queratinócitos e endotélio (Erusalimsky e Kurz, 2005; Minamino e Komuro, 2007). Ainda, dados recentes mostram uma relação direta dessa técnica com expressão aumentada de proteínas inibidoras de replicação como p53 e p21 (Kunieda et al., 2006; Minamino & Komuro, 2007).

Nossos resultados de SC confirmam os dados de Kunieda e colaboradores (2006) os quais mostraram um avançado grau de senescência vascular em animais ateroscleróticos ApoE em comparação aos normocolesterolêmicos. Adicionalmente, constatamos um significativo aumento de SC em ApoE machos em comparação às fêmeas cujo resultado é mostrado pela primeira vez na literatura. Portanto, se pela influência estrogênica não encontramos evidências e pela ação androgênica sejam apenas especulações, nossos resultados de SC reforçam a idéia dos elos que existem entre a progressão da placa aterosclerótica, colesterolemia e a senescência vascular propriamente dita (Erusalimsky e Kurz, 2005; Minamino e Komuro, 2007).

Como observado nas fotos ilustrativas (fig.XX), tanto a área de SC quanto a de AT apresentam-se preferencialmente na região do arco aórtico e secundariamente em áreas de bifurcação das artérias renais e ilíacas, onde o fluxo sanguíneo é prevalentemente turbilhonar (Hartley et al., 2000). Como as lesões são mais severas em ApoE machos, essas evidências podem apoiar os achados de McRobb e colaboradores (2009) ao sugerirem que as forças hemodinâmicas por não serem equivalentes em toda a extensão aórtica permitem que nem todas as células vasculares sofram o mesmo grau de estresse. Portanto, se a SC não é equivalente entre os gêneros, podemos inferir que o grau de estresse mecânico é diferente entre machos e fêmeas, contribuindo assim para um maior dano vascular em machos, alterando sua idade cronológica natural. Nessa ótica, poderíamos inferir que a AT contribuiu para maior senescência vascular (Erusalimsky e Kurz, 2005). Como o método *en face* não discrimina quais tipos de células estariam senescentes, podemos inferir que tanto células endoteliais quanto musculares lisas apresentavam SC devido ao grau avançado das lesões ateroscleróticas (Bennett et al., 1998; Minamino et al., 2003; Minamino e Komuro, 2007).

A relação causa-consequência da SC e AT também pode ser analisada pelo lado oposto já que células endoteliais senescentes podem superexpressar substâncias como IL-1a (Maier et al., 1990), ICAM-1 (Maier et al., 1993), PAI-1 (Shelton et al., 1999; Grilalri et al., 2000), diminuir a expressão de NOS (Matsushita et al., 2001) e apresentar danos oxidativos no DNA (Minamino e Komuro, 2007) culminando com maior atividade pró-inflamatória e pró-trombótica. Além disso, pode induzir a menor degradação de lipoproteínas aterogênicas, sugerindo assim uma reduzida capacidade de metabolizar os lipídeos aterogênicos (Vasile et al., 2001; Erusalimsky e Kurz, 2005). Diante desse dado, podemos especular que a hipercolesterolemia em machos poderia ser proporcionada, em parte, pelo elevado grau de senescência vascular, diante do diminuto *up-take* de colesterol. Além disso, Shi e colaboradores (2007) mostram que a senescência vascular pode estar aumentada em primatas sob dieta hiperlipídica. Em suma, podemos concluir que os fatores AT e SC retroalimentam-se de forma positiva, conquanto suas origens sejam distintas.

Em 2007, Folkmann e colaboradores demonstraram que o dano oxidativo no DNA de aorta em animais ApoE fêmeas idosas (70 semanas) eram semelhantes aos dos animais C57 da mesma idade, justificando inclusive que os danos de SC poderiam ser tecido-dependentes. Esse resultado embora aparentemente contraditório ao que encontramos induz o esclarecimento de um possível equívoco: talvez esse fenômeno encontrado não seria “tecido dependente” mas sim “gênero dependente”, uma vez que os autores não utilizaram animais machos ApoE da mesma idade como fator de comparação. Se assim o fizessem, poderiam encontrar uma resposta correlata a nossa de SC.

Há anos que trabalhos mostram grande correlação entre o estresse oxidativo e as doenças vasculares (Griendling et al.,1994; Cai et al., 2000; Touyz, 2004; Madamanchi et al., 2005; Miller et al.,2007). Também existem recentes evidências de que o gênero e/ou os hormônios sexuais possam influenciar o estresse oxidativo, uma vez que fêmeas ovariectomizadas e machos apresentam níveis de ROS maiores que fêmeas, em condições saudáveis, hipertensivas ou sob indução AT (Miller et al., 2007). Por mais que a evidência anti-oxidante do estrógeno seja possível, ainda são necessários mais estudos para esclarecermos se esse fator é de fato preponderante. De acordo com os nossos achados, não poderíamos apoiar tal hipótese. Além de nosso trabalho, outros autores justificam o estresse oxidativo por outras formas estrogênio-independentes: Powers e colaboradores (2002), por exemplo, encontraram diferentes concentrações de homocisteína (um agente pró-oxidante) entre homens e mulheres, justificando sua possível participação no desenvolvimento precoce de injúria celular.

Convém acrescentar que além dos danos oxidativos, a SC também possui uma importante relação com o encurtamento telomérico, cujas seqüências repetidas de DNA possuem a função de mediar a proteção das extremidades cromossômicas a cada divisão celular (Campisi et al.,2001; Minamino e Komuro, 2007). Para evitar o encurtamento progressivo dos telômeros a cada mitose com perda da informação genética, periodicamente os segmentos de DNA não duplicados são recuperados, o que depende de um complexo enzimático chamado telomerase. Trata-se de uma DNA-polimerase RNA-dependente que sintetiza as repetições teloméricas de DNA,

estabelecendo bases moleculares para um potencial proliferativo ilimitado. Em 2004, Nawrot e colaboradores observaram um maior encurtamento telomérico em homens do que em mulheres, atribuindo essa diferença a uma proteção proporcionada pelo cromossomo X. Diante dessa especulação, poderíamos afirmar que se a SC possui grande potencial de progressão em machos, provavelmente essa diferença não ocorra apenas por fatores endócrinos, mas também por um forte componente genético, contribuindo assim para a progressão da AT (Chang e Harley, 1995; Erusalimsky e Kurz, 2005).

Quanto à análise da regurgitação aórtica (RA), os dados obtidos foram surpreendentes não somente pela visualização incidental com as análises angiográficas, mas principalmente pela oportunidade de observarmos uma maior incidência de RA em machos idosos independentemente se normo ou hipercolesterolêmicos. Após as primeiras observações, adaptamos um *score* de insuficiência aórtica humana (Pujadas, 1980) para o modelo murino a fim de que pudessemos estratificar os graus de regurgitação detectados.

Em 2002, através da técnica de Doppler com mapeamento de fluxo de cores, Patten e colaboradores descreveram um fenômeno casual de RA em camundongos C57 machos idosos (12 meses) cuja observação foi justificada apenas pela senilidade do animal. Corroborando esse relato de Patten, nossos achados complementam tal observação de “fenômeno casual” ao detectarmos uma excelente correlação entre a RA (observada pela angiografia) e a espessura dos folhetos valvares aórticos apenas em camundongos machos (através da histologia). Como indicador de insuficiência, a análise da espessura dos folhetos valvares tem sido usada por outros autores como um importante parâmetro de RA, normalmente acompanhados de testes *in vivo* como ecocardiografia (Gustafsson et al., 2005; Droogmans et al., 2007 e 2009).

As valvopatias hipercolesterolêmicas ocorrem principalmente do lado esquerdo, acometendo principalmente a valva aórtica. Normalmente, o primeiro sinal clínico é o espessamento dos folhetos que geralmente manifestam a RA. Posteriormente, através do processo de calcificação, a estenose pode ocorrer (Cotran et al., 2000; Kawaguchi et al., 2003; Tanaka et al., 2005). Se com dois fatores de risco associados (senilidade e gênero) observamos a RA nos machos C57, esperaríamos uma maior conseqüência em animais hipercolesterolêmicos machos (Wilmshurst et al., 1997) uma vez que sob

hiperlipidemia, o endotélio valvar possuiria maior estresse oxidativo, maior infiltração de macrófagos, proliferação de miofibroblastos e *up-regulation* de proteínas osteogênicas – sinais característicos de esclerose valvar (Otto et al., 1994; Tanaka et al., 2005; Rajamannan, 2009). Entretanto, nossos resultados de RA em machos apoE apresentaram padrão fisiológico semelhante aos animais C57 havendo apenas uma importante alteração morfológica dos folhetos valvares ainda sem sinal de calcificação ou estenose. Portanto, concluímos que na fase senil de 72 semanas, nem os camundongos hipercolesterolêmicos apresentam sinais de estenose valvar, apenas a RA. Através da ecocardiografia, Tanaka e colaboradores (2005) relatam RA em animais apoE de 68 semanas, com presença de calcificação valvar somente em animais de 88-97 semanas, corroborando nossos achados.

Além da espessura valvar, nossas análises histológicas revelaram presença intensa de hemossiderina nos folhetos valvares de machos C57 e ApoE, confirmando assim provavelmente a presença de infiltrado de macrófagos nos folhetos acometidos. Trata-se de um fenômeno comum da resposta inflamatória valvar, característico desde o processo inicial de espessamento valvar (Otto et al., 1994; Kawaguchi et al., 2003).

A observação da RA em machos normocolesterolêmicos reforça a hipótese de que nem sempre as lesões valvares são desencadeadas paralelamente ao curso de desenvolvimento da AT, mas sim por fatores intrínsecos da senilidade (Lebowitz et al., 2000; Droogmans et al., 2009) ou do gênero conforme nossa proposta, apoiada pelas observações em humanos por Singh e colaboradores (1999). Tais fatores podem contribuir para maior acúmulo de glicosaminoglicanos e colágeno os quais são responsáveis pelo espessamento valvar do tipo mixóide na camada intermediária das válvulas (*spongiosa*), culminando em disfunção valvar (McDonald et al., 2002; Van Camp et al., 2003; Horvath et al., 2004; Gustafsson et al., 2005; Droogmans et al., 2009). De forma iatrogênica, recentemente foram identificados anorexígenos (fenfluramina), antiparkinsonianos (pergolida) e antidepressivos (paroxetina) que também poderiam acelerar tal espessamento, culminando em RA (Gustafsson et al., 2005). Inclusive, baseado nessa observação é que Droogmans e colaboradores (2007) ao desenvolverem com ratos um modelo experimental *in vivo* de RA por pergolida (um agonista dopaminérgico e de

receptores 5-HT_{2b}), encontraram o mesmo padrão de espessamento mixóide, sem qualquer influência da AT.

O resultado de manutenção da proteção valvar em fêmeas ovariectomizadas, independentemente da hipercolesterolemia, reforça a idéia de que características genéticas ou a influência nociva da testosterona possam interferir na RA. Para descartamos a influência androgênica, deveríamos utilizar o mesmo protocolo da análise vascular. A importância de desenvolver uma ovariectomia tão precoce seria para certificar de que a falta da exposição estrogênica durante toda a vida adulta e senil pudesse produzir as maiores alterações esperadas. Não havendo alteração, temos também a segurança de que o comprometimento da ação dos hormônios femininos durante sua vida não comprometeria a função valvar nem a morfologia vascular. Quanto a possíveis falhas na ovariectomia, descartamos tal possibilidade diante da significativa diferença entre os parâmetros de peso corporal, uterino e de estradiol plasmático.

Sabe-se que os fármacos utilizados na anestesia podem exercer efeitos hemodinâmicos e cardíacos, diminuindo a fração de encurtamento ventricular (Patten et al., 2002; Droogmans et al., 2008) podendo influenciar diretamente a RA. Mesmo assim, a contribuição absoluta da ketamina e xilazina na RA não poderia ser determinada devido sua indispensável importância para manter os animais imobilizados desde sua cateterização até a obtenção otimizada das imagens. Esta associação foi preferida aos barbituratos devido menor risco de depressão respiratória embora sua associação apresente efeito crono e inotrópico negativo (Collins et al., 2003; Hildebrandt et al., 2008). A ketamina é um dos anestésicos mais comumente utilizados na área veterinária devido a sua segurança e compatibilidade com outros fármacos (Hau e Van Hoosier, 2003). É altamente lipossolúvel e por isso atravessa rapidamente a barreira hematoencefálica. Sua meia-vida é de 10-15 minutos. Entretanto, por ser dotada de efeitos simpatomiméticos indiretos tal ação pode ser minimizada com o sedativo xilazina (agonista alfa 2 central), cuja meia-vida é de 1-2h. Tipicamente, na proporção escolhida, a associação de ketamina + xilazina produz anestesia por 20 a 30 minutos e seu efeito hipnótico-sedativo pode ser estendido por até 2 horas (Flecknell, 1996).

Para melhor controle dos efeitos da anestesia, todos os animais cateterizados foram submetidos a medida de frequência cardíaca antes da angiografia os quais não apresentaram diferença entre os grupos. Portanto, como todos os animais foram anestesiados pelo mesmo procedimento, podemos deduzir que tal interferência anestésica não foi significativa, pois ao contrário, todos os animais submetidos a angiografia apresentariam RA.

Em consequência a RA, diante de uma possível sobrecarga de volume crônica em machos C57 e ApoE, investigamos também prováveis sinais de insuficiência cardíaca através dos parâmetros de medida de área ventricular, peso cardíaco e edema pulmonar. Ao detectarmos a manutenção da área ventricular e peso cardíaco associado a nenhuma alteração de teor de água pulmonar em grupos C57 ou ApoE machos podemos descartar a hipótese de uma alteração funcional valvar aórtica com repercussões fisiológicas severas. Recentemente, Droogmans e colaboradores (2009) ao detectarem RA em ratos machos com 58 semanas também apresentam semelhante questionamento, embora sem investigações dos parâmetros ponderais como o nosso trabalho.

Apesar de paradoxal, esse comportamento fisiopatológico apresenta perfil semelhante aos humanos, já que em estudos longitudinais confirma-se que a RA crônica por ser uma doença de progressão muito lenta pode ser bem tolerada (Tornos et al., 1995). Além disso, há evidências que pacientes acometidos por RA podem permanecer assintomáticos por décadas antes de um desenvolvimento descompensado ou patente de insuficiência cardíaca (IC) (Tornos et al., 1995; Kawaguchi et al., 2003; Bekeredjian et al., 2005). Em 2004, Plante e colaboradores inclusive justificam a dificuldade de detecção da prevalência/incidência de RA em humanos devido sua silenciosidade sintomática, a qual poderia se manifestar ao longo de anos ou décadas.

Embora não haja alteração nos parâmetros ponderais, o decréscimo do desempenho de células cardíacas de machos poderia também ser determinado por alterações bioquímicas intracelulares. Para essa análise a SERCA2a foi a escolhida por 2 motivos: 1) por ser uma proteína que invariavelmente encontra-se menos expressa em corações insuficientes (Arai et al., 1994) e 2) por sua expressão diminuir com o envelhecimento (Lakatta & Sollott, 2002). Como a análise por *Western blotting* não encontrou diferença de expressão de SERCA2a, podemos concluir que o quadro de RA encontrado em machos C57

e ApoE com 18 meses não apresenta nem sinais patognomônicos ou moleculares de IC ou resposta compensatória. Além disso, podemos concluir que a RA detectada é do tipo “idade-dependente”, mas que progride de forma associada ao gênero, sem participação direta dos hormônios sexuais femininos.

Sabemos que apenas a expressão da SERCA2a poderia não determinar sua real funcionalidade uma vez que a atividade da SERCA2a encontra-se sob controle direto do fosfolambam (PLB), sendo portanto necessária análise da razão PLB/SERCA2 como nos trabalhos recentes de Wiegerinck et al., 2009. Outra proteína que seria importante para complementar nossas avaliações moleculares seria o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ sendo a proteína mais importante na extrusão de Ca^{++} pelo sarcolema (Lu et al., 2002; Mace et al., 2003). Alguns trabalhos na literatura têm demonstrado que na IC este trocador estaria mais expresso tanto em animais experimentais (Hattem et al., 1994; Lu et al. 2002) quanto em humanos (Studer et al., 1994) colaborando assim para a diminuição do conteúdo sarcoplasmático de Ca^{++} e função sistólica. Entretanto, alguns trabalhos não encontram alterações na expressão desse trocador (Hasenfuss et al., 1999) ou até mesmo *down regulation* (Yao et al., 1998). Diante de tantos resultados díspares, maiores estudos sobre essas proteínas envolvidas na contratilidade podem ser excelentes alvos de exploração, principalmente em modelos senis murinos diante das fisiopatologias previamente apresentadas.

Em conclusão, afirmamos que há diferença entre fêmeas e machos na intensidade das lesões cardiovasculares na fase senil as quais se agravam com a hipercolesterolemia. Além disso, observamos que a proteção cardiovascular observada em fêmeas (normo ou hipercolesterolêmicas) indica não ser proveniente dos hormônios sexuais femininos. Por fim, justificamos a hipótese de que não apenas fatores externos sejam importantes para o desencadeamento de distúrbios cardiovasculares, mas também componentes endógenos ou genéticos relacionados ao gênero. Esses dados podem ser importantes para conclusões futuras sobre influências do gênero na senilidade, as quais ainda carecerão de muitos esclarecimentos, principalmente em relação as questionáveis terapias de reposição hormonal amplamente utilizadas em humanos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Accad M, Smith SJ, Newland DL, Sanan DA, King LE Jr, Linton MF, Fazio S, Farese RV Jr (2000). Massive xanthomatosis and altered composition of atherosclerotic lesions in hyperlipidemic mice lacking acyl CoA: cholesterol acyltransferase 1. *Journal Clinical of Investigation* 105, 711–719.
2. Agmon Y, Khandheria BK, Meissner I, Sicks JR, O'Fallon WM, Wiebers DO, Whisnant JP, Seward JB, Tajik AJ (2001). Aortic valve sclerosis and aortic atherosclerosis: different manifestations of the same disease? Insights from a population-based study. *Journal of the American College of Cardiology*,38(3): 827-834.
3. Aikawa E, Nahrendorf M, Sosnovik D, Lok VM, Jaffer FA, Aikawa M, Weissleder R (2007). Multimodality Molecular Imaging Identifies Proteolytic and Osteogenic Activities in Early Aortic Valve Disease, *Circulation*, 115:377-386.
4. Allison MA, Wright CM (2005). Age and gender are the strongest clinical correlates of prevalent coronary calcification. *International Journal of Cardiology* 98:325–330.
5. Allison MA, Cheung P, Criqui MH, Langer RD, Wright CM (2006). Mitral and aortic annular calcification are highly associated with systemic calcified atherosclerosis. *Circulation*. 2006;113:861– 866.
6. *American Heart Association* (2004). Heart disease and stroke statistics: 2004 update.<http://www.americanheart.org/downloadable/heart/1079736729696HDSStats2004UpdateREV3-19-04.pdf>
7. Akishita M, Ouchi Y, Miyoshi H, Kozaki M, Inoue S, Ishikawa M, Eto M, Toba K, Orimo H(1997). Estrogen inhibits cuff-induced intimal thickening of rat femoral artery: Effects on migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 130: 1–10.
8. Arai M, Matsui H, Periasamy M (1994). Sarcoplasmic Reticulum Gene Expression in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Circulation Research*, 74:555-564.
9. Arnlöv J, Pencina MJ, Amin S, Nam BH, Benjamin EJ, Murabito JM, Wang TJ, Knapp PE, D'Agostino RB Sr, Bhasin S, Vasan RS (2006). Endogenous

- sex hormones and cardiovascular disease incidence in men. *Annals of Internal Medicine*, 145:176–184.
10. Assmann, G., Cullen, P., Jossa, F., Lewis, B. e Mancini, M (1999). Coronary heart disease: reducing the risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Bioogy*. 19, 1819–1824.
 11. Balke CW, Shorofsky, SR (1998). Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovascular Research*, London, 37: 290-299.
 12. Barreto SM, Passos VMA, Cardoso ARA, Lima-Costa MF (2003). Quantificando o Risco de Doença Coronariana na Comunidade. Projeto Bambuí. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 81: 549-555.
 13. Barrett-Connor E and Bush TL (1991). Estrogen and coronary heart disease in women. *Journal of the American Medical Association*, 265:1861–1867.
 14. Bhatia AJ, Wade GN (1991). Effects of pregnancy and ovarian steroids on fatty acid synthesis and uptake in Syrian hamsters. *American Journal of Physiology*, 260(1 Pt 2):R153-158.
 15. Beaghole R, Saracci R, Panico S (2001). Cardiovascular diseases: causes, surveillance and prevention. *International Journal of Epidemiology* 30:1-4.
 16. Bekerredjian R, Grayburn PA (2005). Valvular Heart Disease Aortic Regurgitation. *Circulation*, 112:125-134.
 17. Bennett MR, Macdonald K, Chan SW, Boyle JJ, Weissberg PL (1998). Cooperative interactions between RB and p53 regulate cell proliferation, cell senescence, and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques. *Circulation Research*, 82, 704–712.
 18. Bentzon JF, Pasterkamp G, Falk E (2003). Expansive remodeling is a response of the plaque-related vessel wall in aortic roots of apoE-deficient mice: an experiment of nature. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 23:257e262
 19. Berry (2006). Lessons from the european heart survey. *Circulation*, 113:f25-f28
 20. Birnbaum Y, Fishbein MC, Luo H, Nishioka T, Siegel RJ (1997). Regional remodeling of atherosclerotic arteries: a major determinant of clinical manifestations of disease. *Journal of the American College of Cardiology* 30:1149–1164.

21. Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA, Lamping KG, Faraci FM (1997). Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 17:2333-2340.
22. Botham (2008). Oxidation of chylomicron remnants and vascular dysfunction. *Atherosclerosis Supplements*, 9(2): 57-61.
23. Bourassa PK, Milos PM, Gaynor BJ, Breslow JL, Aiello RJ (1996). Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America*, 93: 10022-10027.
24. Braunwald E, Zipes DP (2005). *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 7th ed. Philadelphia, Pa; London: Saunders.
25. Bronzino JD, Smith VH, Wade ML (1990). Medical technology and society: an interdisciplinary perspective. *Cambridge, Mass., MIT Press*
26. Brown MS, Goldstein JL (1983). Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. *Journal Clinical of Investigation*, 72(3); 743-747.
27. Burger, HG (2001). Physiological principles of endocrine replacement: estrogen. *Hormone Research*. 56(Suppl. 1): 82–85.
28. Cabral AM, Vasquez EC, Moyses MR, Antonio A (1988). Sex hormone modulation of ventricular hypertrophy in sinoaortic denervated rats. *Hypertension*, 11 Suppl I:I-7.
29. Cai H, Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. *Circulation Research*, 87: 840–844.
30. Campisi J, Kim SH, Lim CS, Rubio M (2001). Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Experimental Gerontology*. 36:1619 – 1637.
31. Campisi J (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*, 120:513–522.
32. Caplan BA, Schwartz CJ (1973). Increased endothelial cell turnover in areas of in vivo Evans blue uptake in the pig aorta. *Atherosclerosis* 17, 401–417.

33. Carmo EH, Barreto ML, Silva Jr ML (2003) Mudanças nos padrões de morbimortalidade da população brasileira: os desafios para um novo século. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 12(2): 63-75.
34. Carr AC and Frei B (1999). Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69: 1086–1107.
35. Caseli G, Lopez AD (1996). Health and mortality among the elderly: issues for assessment. International studies. Demography: health and mortality among the elderly: issues for assessment. New York: Oxford University Press Inc., p. 3-20.
36. Chance B, Sies H, and Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* 59: 527–605.
37. Chang e Harley (1995). Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America*, 92(24):11190-11194.
38. Channon KM, Guzik TJ (2002). Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 53: 515-524.
39. Choi BG, McLaughlin MA (2007). Why men's hearts break: Cardiovascular effects of sex steroids. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, 36:365–377.
40. Claessens F, Verrijdt G, Schoenmakers E, Haelens A, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W (2001). Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormonespecific gene regulation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 76: 23– 30.
41. Clempus RE, Griendling KK (2006). Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Research*, 71: 216–225.
42. Collins KA, Korcarz CE, Lang RM (2003). Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice. *Physiological Genomics*, 13: 227–239.
43. Colucci WS (1997). Molecular and cellular mechanisms of myocardical failure. *American Journal of Cardiology*, 80 (11A): 15L-25L.
44. Cotran RS, Kumar V, Collins T (2000). Robbins: patologia estrutural e funcional. Editora: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro; 6ª Ed.: 13, 508-509.

45. Curtiss LK, Boisvert WA (2000). Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, 11:243–251.
46. Czubryt MP, Espira L, Lamoureux L, Abrenica B (2006). The role of sex in cardiac function and disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 84: 93–109.
47. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, and Gustafsson JA (2006). International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacological Reviews* 58:773–781.
48. Dash R, Kadambi V, Schmidt AG, Tepe NM, Biniakiewicz D, Gerst MJ, Canning AM, Abraham WT, Hoit BD, Liggett SB, Lorenz JN, Dorn GW, Kranias EG (2001). Interactions between phospholamban and beta-adrenergic drive may lead to cardiomyopathy and early mortality. *Circulation*, 103(6): 889-896.
49. Daugherty A and Rateri D (2006). A Handbook of Mouse Models of Cardiovascular Disease, 5:53-66
50. Deshpande SS, Qi B, Park YC, Irani K (2003). Constitutive activation of rac1 results in mitochondrial oxidative stress and induces premature endothelial cell senescence. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 23:e1–e6.
51. Dhalla NS, Dixon IMC, Beamish RE (1991). Biochemical basis of heart function and contractile failure. *Journal of Applied Cardiology* , 6:7-30.
52. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G , Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelji I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America*, 92: 9363-9367.
53. Drobnik J, Dabrowski R, Szczepanowska A, Giernat L, Lorenc J (2000). Response of aorta connective tissue matrix to injury caused by vasopressin - induced hypertension or hypercholesterolemia. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 51: 521-533.
54. Droogmans S, Franken PR, Garbar C, Weytjens C, Cosyns B, Lahoutte T, Caveliers V, Pipeleers-Marichal M, Bossuy A, Schoors D, Camp GV (2007). In vivo model of drug-induced valvular heart disease in rats: pergolide-

- induced valvular heart disease demonstrated with echocardiography and correlation with pathology. *European Heart Journal*, 28: 2156–2162.
55. Droogmans S, Lauwers R, Cosyns B, Roosens B, Franken PR, Weytjens C, Bossuyt A, Lahoutte T, Schoors D, Van Camp G (2008). Impact of anesthesia on valvular function in normal rats during echocardiography. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 34(10):1564-1572.
56. Droogmans S, Roosens B, Cosyns B, Hernot S, Weytjens C, Degallier C, Garbar C, Caveliers V, Pipeleers-Marichal M, Franken PR, Bossuyt A, Lahoutte T, Schoors D, Van Camp G (2009). Echocardiographic and histological assessment of age-related valvular changes in normal rats. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 35(4):558-565.
57. Duriez P, Dallongeville J, Fruchart JC (1996). Lipoprotein(a) as a marker for coronary heart disease. *British Journal of Clinical Practice Supplement*, 77A: 54-61.
58. Eckardstein AV, Wu FCW (2003). Testosterone and atherosclerosis. *Growth Hormone & IGF Research*, 13:S72-S84.
59. Elgelhorn CA, Engelhorn AL, Lourenço MA, Pullig R, Ribas E, Miranda Jr F, Burihan E (2002). Acurácia da imagem ultrassonográfica expandida no diagnóstico das obstruções arteriais do segmento infra-inguinal. *Jornal Vascular Brasileiro*, 1(1): 55-64
60. Ellington AA e Kullo IJ (2008). Atherogenic lipoprotein subprofiling. *Advances in clinical chemistry*, 46:295-317.
61. Engler MM, Engler MB, Malloy MJ, Chiu EY, Schloetter MC, Paul SM, Stuehlinger M, Lin KY, Cooke JP, Morrow JD, Ridker PM, Rifai N, Miller E, Witztum JL, Mietus-Snyder M (2003). Antioxidant vitamins C and E improve endothelial function in children with hyperlipidemia: Endothelial Assessment of Risk from Lipids in Youth (EARLY) Trial. *Circulation*, 108: 1059-1063.
62. English KM, Mandour O, Steeds RP, Diver MJ, Jones TH, Channer KS (2000). Men with coronary artery disease have lower levels of androgens than men with normal coronary angiograms. *European Heart Journal*. 2000;21:890–894.
63. Erusalimsky JD, Kurz DJ (2005). Cellular senescence in vivo: Its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Experimental Gerontology*, 40:634-642.

64. Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Striegl G, Jurgens G (1990). Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chemical Research in Toxicology*, 3: 77–92.
65. Faggiotto A, Ross R (1984). Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis*, 4:341-356.
66. Faragher RG, Kipling D (1998). How might replicative senescence contribute to human ageing? *Bioessays*, 20:985–991.
67. Fayad ZA, Fallon JT, Shinnar M, Wehrli S, Dansky HM, Poon M, Badimon JJ, Charlton SA, Fisher EA, Breslow JL, Fuster V (1998). Noninvasive In Vivo High-Resolution Magnetic Resonance Imaging of Atherosclerotic Lesions in Genetically Engineered Mice. *Circulation*, 98:1541-1547.
68. Fenton M, Barker S, Kurz DJ, Erusalimsky JD (2001). Cellular senescence after single and repeated balloon catheter denudations of rabbit carotid arteries. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 21, 220–226.
69. Flecknell PA (1996). *Laboratory Animal Anesthesia*. San Diego: Academic Press.
70. Folkmann JK, Loft S, Møller P (2007). Oxidatively damaged DNA in aging dyslipidemic ApoE^{-/-} and wild-type mice. *Mutagenesis*, 22(2):105–110.
71. Forman DE, Cittadini A, Azhar G, Douglas PS, Wei JY (1997). Cardiac Morphology and Function in Senescent Rats: Gender-Related Differences. *Journal of the American College of Cardiology*, 30:1872–1877.
72. Forte P, Kneale BJ, Milne E, Chowienczyk PJ, Johnston A, Benjamin N, Ritter JM (1998). Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. *Hypertension*, 32: 730–734.
73. Fossel (1998). Telomerase and the aging cell: implications for human health. *Journal of the American Medical Association*, 279(21):1732-1735.
74. Freeman RV, Otto CM (2005). Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation*, 111:3316 –3326.
75. Gambhir SS (2002). Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nature Reviews Cancer*, 2:683-693.
76. George J, Afek A, Shaish A, Levkovitz H, Bloom N, Cyrus T, Zhao L, Funk CD, Sigal E, Harats D (2001). 12/15-Lipoxygenase gene disruption

- attenuates atherogenesis in LDL-receptor-deficient mice. *Circulation*, 104(14): 1646-1650.
77. Gerhard, GT e Duell, PB (1999). Homocysteine and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, 10, 417–429.
78. Gerrity RG (1981). The role of the monocyte in atherogenesis. I. Transition of blood - borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *American Journal of Pathology*, 103: 181-190.
79. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ (1987). Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *New England Journal of Medicine*, 316:1371–1375.
80. Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN (1988). Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 112, 1018–1031.
81. Goldbourt, U, Neufeld HN (1988). Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis* 6, 357–377.
82. Goldstein J, Sites CK, Toth M (2004). Progesterone stimulates cardiac muscle protein synthesis via receptor-dependent pathway. *Fertility and Sterility*, 82: 430–436.
83. Griending KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 74: 1141–1148.
84. Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, Stimpel M, Karas RH, Vetter H, Neyses L (1997). Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Letters*., 416: 107–112.
85. Guo X, Razandi M, Pedram A, Kassab G, Levin ER (2005). Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase signaling to nitric oxide and estrogen receptors alpha and beta. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 19704–19710.
86. Gustafsson BI, Tommeras K, Nordrum I, Loennechen JP, Brunsvik A, Solligard E, Fossmark R, Bakke I, Syversen U, Waldum H (2005). Long-term serotonin administration induces heart valve disease in rats. *Circulation*, 111:1517–1522.
87. Haas E, Meyer MR, Schurr U, Bhattacharya I, Minotti R, Nguyen HH, Heigl A, Lachat M, Genoni M, and Barton M (2007). Differential effects of 17 β -

- estradiol on function and expression of estrogen receptor , estrogen receptor β , and GPR30 in arteries and veins of patients with atherosclerosis. *Hypertension*, 49:1358–1363.
88. Hak AE, Witteman JC, de Jong FH, Geerlings MI, Hofman A, Pols HA (2002). Low levels of endogenous androgens increase the risk of atherosclerosis in elderly men: The Rotterdam study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87:3632–3639.
89. Hartley CJ, Reddy AK, Madala S, Martin-McNulty B, Vergona R, MARK E. Sullivan ME, Halks-Miller M, Taffet GE, Michael LH, Entman ML, Wang Y (2000). Hemodynamic changes in apolipoprotein E-knockout mice. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 279: H2326–H2334.
90. Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H (1999). Relationship between $\text{Na}^+\text{-Ca}^{+2}$ exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation*, 99(5): 641-648.
91. Hatem SN, Sham JS, Morad M (1994). Enhanced $\text{Na}^+\text{-Ca}^{+2}$ -exchange activity in cardiomyopathic Syrian hamster. *Circulation Research*, 74(2):253-261
92. Hau J, Van Hoosier GL (2003). Handbook of Laboratory Animal Science. Boca Raton: CRC Press.
93. Heart Protection Study Collaborative Group (2002). MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 360: 23–33.
94. Hendrix SL, Wassertheil-Smoller S, Johnson KC, Howard BV, Kooperberg C, Rossouw JE, Trevisan M, Aragaki A, Baird AE, Bray PF, Buring JE, Criqui MH, Herrington D, Lynch JK, Rapp SR, Torner J, WHI Investigators (2006). Effects of conjugated equine estrogen on stroke in the Women's Health Initiative. *Circulation*, 113:2425–2434.
95. Hildebrandt IJ, Gambhir SS (2004). Molecular imaging applications for immunology. *Clinical Immunology* ,111:210-224.
96. Hildebrandt IJ, Su H, Weber WA (2008). Anesthesia and other considerations for in vivo imaging of small animals. *ILAR Journal*, 49(1):17-26.

97. Hirata S, Shoda, T, Kato J, Hoshi K (2003). Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 14: 124–129.
98. Hofker MH, Van Vlijmen BJM, Havekes LM (1998). Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 137: 1–11
99. Hoppe G, O'Neil J, Hoff HF (1994). Inactivation of lysosomal proteases by oxidized low density lipoprotein is partially responsible for its poor degradation by mouse peritoneal macrophages. *Journal Clinical of Investigation* 94: 1506–1512.
100. Horvath J, Fross RD, Kleiner-Fisman G, Lerch R, Stalder H, Liaudat S, Raskoff WJ, Flachsbarth KD, Rakowski H, Pache JC, Burkhard PR, Lang AE (2004). Severe multivalvular heart disease: a new complication of the ergot derivative dopamine agonists. *Movement Disorders*, 19:656–662.
101. Hu H, Pierce GN, Zhong G (1999). The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to *Chlamydia pneumoniae*. *Journal Clinical of Investigation*, 103: 747–753.
102. Hurst JW (1985). History of cardiac catheterization. In: King SB III, Douglas JS Jr, eds. *Coronary Arteriography and Angioplasty*. New York, NY McGraw-Hill :1–9.
103. Hayflick L, Moorhead PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25:585– 621.
104. Hayflick L (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37:614–636.
105. Ide T, Tsutsui H, Ohashi N, Hayashidani S, Suematsu N, Tsuchihashi M, Tamai H, Takeshita A (2002). Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 22: 438–442.
106. Ignarro LJ, Balestrieri ML, Napoli C (2007). Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: An update. *Cardiovascular Research*, 73(2): 326-340.
107. Ignatowski AC (1908). Influence of animal food on the organism of rabbits. *S Peterb Izviest Imp Voyenno-Med. Akad*, 16: 154-173.

108. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J (1993). Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *Journal Clinical of Investigation*, 92:883–893.
109. Isidori AM, Giannetta E, Pozza C, Bonifacio V, Isidori A (2005). Androgens, cardiovascular disease and osteoporosis. *Journal of Endocrinological Investigation*, 28:73–79.
110. Jaffer FA, Sosnovik DE, Nahrendorf M, Weissleder R (2006). Molecular imaging of myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 41:921-933.
111. Javień J, Nastalek P, Korbut R (2004). Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 55(3) 503-517.
112. Jeanes H, Newby D, Gray GA (2007). Cardiovascular risk in women: the impact of hormone replacement therapy and prospects for new therapeutic approaches. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 8:279–288.
113. Jialal I, Devaraj S (1996). The Role of Oxidized Low Density Lipoprotein in Atherogenesis. *The Journal of Nutrition*, 126: 1053S-1057S.
114. Johnson F, Giulivi C (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine* 26:340 –352.
115. Jormsjö S, Wuttge DM, Sirsjö A, Whatling C, Hamsten A, Stemme S, Eriksson P (2002). Differential expression of cysteine and aspartic proteases during progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *American Journal of Pathology*, 161(3): 939-945.
116. Jousilahti P, Vartiainen E, Tuomilehto J, Puska P (1999). Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease. A prospective follow-up study of 14 786 middle-aged men and women in Finland. *Circulation*, 99: 1165–1172.
117. Kajinami K, Takekoshi N, Brousseau ME, Schaefer EJ (2004). Pharmacogenetics of HMG-CoA reductase inhibitors: exploring the potential for genotype-based individualization of coronary heart disease management. *Atherosclerosis* 177, 219–234.
118. Kalin MF, Zumoff B (1999). Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids*, 55:330–52.

119. Kauser K, Rubanyi GM (1994). Gender difference in bioassayable endothelium derived nitric oxide from isolated rat aortae. *American Journal of Physiology*, 267: H2311–2317.
120. Kawaguchi A, Yutani C, Yamamoto A (2003). Hypercholesterolemic Valvulopathy: An Aspect of Malignant Atherosclerosis. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 7(4):439–443.
121. Kiechl S, Willeit J (1999). The natural course of atherosclerosis II: Vascular remodeling. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 19:1491-1498.
122. Kiss E, Ball NA, Kranias EG, Walsh RA (1995). Differential changes in cardiac phospholamban and sarcoplasmic reticular Ca²⁺-ATPase protein levels. Effects on Ca²⁺ transport and mechanics in compensated pressure-overload hypertrophy and congestive heart failure. *Circulation Research*, 77(4): 759-764.
123. Klangkalya B e Chan A (1988). The effects of ovarian hormones on beta-adrenergic and muscarinic receptors in rat heart. *Life Sciences*, 42: 2307–2314.
124. Knot HJ, Lounsbury KM, Brayden JE, Nelson MT (1999). Gender differences in coronary artery diameter reflect changes in both endothelial Ca²⁺ and ecNOS activity. *American Journal of Physiology*, 276: H961–969.
125. Kugiyama K, Ota Y, Takazoe K, Moriyama Y, Kawano H, Miyao Y, Sakamoto T, Soejima H, Ogawa H, Doi H, Sugiyama S, Yasue H (1999). Circulating levels of secretory type II phospholipase A2 predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 100, 1280–1284.
126. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, and Gustafsson JA (1996) .Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America.*, 93:5925–5930.
127. Kunieda T, Minamino T, Nishi J, Tateno K, Oyama T, Katsuno T, Miyauchi H, Orimo M, Okada S, Takamura M, Nagai T, Kaneko S and Komuro I (2006). Angiotensin II Induces Premature Senescence of Vascular Smooth Muscle Cells and Accelerates the Development of Atherosclerosis via a p21-Dependent Pathway. *Circulation* 114;953-960.

128. Kobayashi S, Hori M, Dono K, Nagano H, Umeshita K, Nakamori S, Sakon M, Osuga K, Umetani K, Murakami T, Nakamura H, Monden M (2004). In vivo real-time microangiography of the liver in mice using synchrotron radiation. *Journal Hepatology* 40:405-408.
129. Krause DN, Duckles SP, Pelligrino DA (2006). Influence of sex steroid hormones on cerebrovascular function. *Journal of Applied Physiology*, 101: 1252–1261.
130. Kronenberg F, Kronenberg MF, Kiechi S, Trenkwalder E, Santer P, Oberhollenzer F, Egger G, Utermann G, Willeit J (1999). Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation*, 100: 1154–1160.
131. Krumholz HM, Larson M, Levy D (1993). Sex differences in cardiac adaptation to isolated systolic hypertension. *American Journal of Cardiology*, 72:310 –313.
132. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD (2000). Senescence-associated b-galactosidase reflects an increase in lysosomal. *Journal of Cell Science*, 113: 3613-3622.
133. Lakatta EG (1987). Cardiac muscle changes in senescence. *Annual Review of Physiology*, 49:519 –31.
134. Lakatta EG, Sollott SJ (2002). The heartbreak of older age. *Molecular Interventions*, 2(7):431-446.
135. Lakatta EG, Levy D (2003). Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises. Part I: Aging arteries: a “set up” for vascular disease. *Circulation*, 107:139 –146.
136. Langille BL, Reidy MA, Kline RL (1986). Injury and repair of endothelium at sites of flow disturbances near abdominal aortic coarctations in rabbits. *Arteriosclerosis* 6, 146–154.
137. Langille BL (1993). Remodeling of developing and mature arteries: endothelium, smooth muscle, and matrix. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 21(suppl 1):S11–S17.
138. Lebowitz NE, Bella JN, Roman MJ, Liu JE, Fishman DP, Paranicas M, Lee ET, Fabsitz RR, Welty TK, Howard BV, Devereux RB (2000). Prevalence and correlates of aortic regurgitation in American Indians: the Strong Heart Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 36:461– 467.

139. Le Goff, Guerin M, Chapman MJ (2004). Pharmacological modulation of cholesteryl ester transfer protein, a new therapeutic target in atherogenic dyslipidemia. *Pharmacology & therapeutics*, 101(1):17-38.
140. Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, Hirai T, Yu ZX, Ferrans VJ, Howard BH, Finkel T (1999). Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, 274:7936–7940.
141. Li J, Li W, Su J, Liu W, Altura BT, Altura BM (2003). Hydrogen peroxide induces apoptosis in cerebral vascular smooth muscle cells: Possible relation to neurodegenerative diseases and strokes. *Brain Research Bulletin*, 62: 101–106.
142. Liu MS, Jirik FR, Lebouef RC, Henderson H, Castellani LW, Lusis AJ, Ma Y, Forsythe I, Zhang H, Kirk E, Brunzell J & Hayden (1994). Alteration of lipid profiles in plasma of transgenic mice expressing human lipoprotein lipase. *Journal of Biological Chemistry* 15; 269(15):11417-11424.
143. Liu HW, Iwai M, Takeda-Matsubara Y, Wu L, Li JM, Okumura M, Cui TX, Horiuchi M (2002). Effect of estrogen and AT1 receptor blocker on neointima formation. *Hypertension*, 40: 451–457.
144. Liu PY, Death AK, Handelsman DJ (2003). Androgens and Cardiovascular disease. *Endocrine Reviews*, 24:313–340.
145. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Beiser A, Levy D (1999). Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet*, 353: 89–92.
146. Lu L, Mei DF, Gu AG, Wang S, Lentzner B, Gutstein DE, Zeas D, Homma S, Yi GH, Wang J (2002). Exercise training normalizes altered calcium handling proteins during development of heart failure. *Journal of Applied Physiology*, 92(4):1524-1530.
147. Luft, FC (1988). Molecular genetics of human hypertension. *Journal of Hypertension*. 16, 1871–1878.
148. Lusis AJ, Weinreb A, Drake TA (1998) in Textbook of Cardiovascular Medicine (ed. Topol, E. J.) 2389–2413 (Lippincott-Raven, Philadelphia).
149. Lusis AJ (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407:233-241.
150. Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC (2004). Genetic Basis of Atherosclerosis: Part I New Genes and Pathways. *Circulation*, 110:1868-1873

151. Lutgens E, de Muinck ED, Heeneman S, Daemen MJAP (2001). Compensatory enlargement and stenosis develop in apoE^{-/-} and apoE^{-/-} Leiden transgenic mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 21;1359-1365.
152. Ma PT, Gil G, Südhof TC, Bilheimer DW, Goldstein JL, Brown MS (1986). Mevinolin, an inhibitor of cholesterol synthesis, induces mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of hamsters and rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov;83(21):8370-8374.
153. Mace LC, Palmer BM, Brown DA, Jew KN, Lynch JM, Glunt JM, Parsons TA, Cheung JY, Moore RL (2003). Influence of age and run training on cardiac Na/Ca exchange. *Journal of Applied Physiology*, 95(5): 1994-2003.
154. Madamanchi NR, Hakim ZS, Runge MS (2005). Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis. The disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* - 2005; 3: 254–267.
155. Mäkinen J, Järvisalo MJ, Pöllänen P, Perheentupa A, Irjala K, Koskenvuo M, Mäkinen J, Huhtaniemi I, Raitakari OT (2005). Increased carotid atherosclerosis in andropausal middleaged men. *Journal of the American College of Cardiology*, 45:1603–1608.
156. Martin GM (2005). Genetic modulation of senescent phenotypes in Homo sapiens. *Cell*, 120:523–532.
157. Masucci-Magoulas L, Goldberg IJ, Bisgaier CL, Serajuddin H, Francone OL, Breslow JL, Tall AR (1997). A mouse model with features of familial combined hyperlipidemia. *Science* 275:391– 394.
158. Manka DR, Gilson W, Sarembock I, Ley K, Berr SS (2000). Noninvasive in vivo magnetic resonance imaging of injury-induced neointima formation in the carotid artery of the apolipoprotein-E null mouse. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 12: 790–794.
159. Marks AR (2000). Cardiac intracellular calcium release channels: role in heart failure. *Circulation research*, 87(1): 8-11.
160. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A (2000) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *Journal Clinical of Investigation*, 1106:1521– 1530.

161. Matsushita H, Chang E, Glassford AJ, Cooke JP, Chiu CP, Tsao PS (2001). eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: preservation by hTERT immortalization. *Circulation Research*, 89:793–798.
162. McDonald PC, Wilson JE, Gao M, McNeill S, Spinelli JJ, Williams OD, Harji S, Kenyon J, McManus BM (2002). Quantitative analysis of human heart valves: Does anorexigen exposure produce a distinctive morphological lesion? *Cardiovascular Pathology*, 11:251–262.
163. McGrath K-CY, McRobb LS, Heather AK (2008). Androgen therapy and atherosclerotic cardiovascular disease. *Vascular Health and Risk Management*, 4(1) 11–21.
164. McMahan CA, Gidding SS, Fayad ZA, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP, McGill HC Jr (2005). Risk scores predict atherosclerotic lesions in young people. *Archives of Internal Medicine*, 65:883–890.
165. McRobb L, Handelsman DJ, Heather AK (2009). Androgen-Induced Progression of Arterial Calcification in Apolipoprotein E-Null Mice Is Uncoupled from Plaque Growth and Lipid Levels. *Endocrinology*, 150(2):841-848.
166. Meir K S., Leitersdorf E (2004). Atherosclerosis in the Apolipoprotein E–Deficient Mouse: A Decade of Progress. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 24:1006-1014.
167. Mendelsohn ME, Karas RH (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *New England Journal of Medicine*, 340:1801–1811.
168. Mendez JI, Nicholson WJ, Taylor WR (2005). SOD isoforms and signaling in blood vessels: evidence for the importance of ROS compartmentalization. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 25:887– 888.
169. Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G (1995). Alterations of Sarcoplasmic Reticulum Proteins in Failing Human Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*, 92(4):778-784.
170. Meyer MR, Haas E, Barton M (2008). Need for Research on Estrogen Receptor Function: Importance for Postmenopausal Hormone Therapy and Atherosclerosis. *Gender Medicine*, Vol. 5 (Suppl. A): S19-S33.

171. Miller AA, Drummond GR, Schmidt HHHW, Sobey CG (2005). NADPH oxidase activity and function are profoundly greater in cerebral versus systemic arteries. *Circulation Research*, 97: 1055–1062.
172. Miller AA, Silva TM, Jackman KA, Sobey CG (2007). Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34, 1037–1043.
173. Miller AA, Drummond GR, Mast AE, Schmidt HHHW, Sobey CG (2007). Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression and function in the cerebral circulation: Role of estrogen. *Stroke*, 38: 2142–2149.
174. Miller VM, Duckles SP (2008). Vascular Actions of Estrogens: Functional Implications, *Pharmacological Reviews*, 60:210–241.
175. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I (2002). Endothelial Cell Senescence in Human Atherosclerosis Role of Telomere in Endothelial Dysfunction. *Circulation*, 105:1541-1544.
176. Minamino T, Yoshida T, Tateno K, Miyauchi H, Zou Y, Toko H, Komuro I (2003). Ras induces vascular smooth muscle cell senescence and inflammation in human atherosclerosis. *Circulation*, 108(18):2264-2269.
177. Minamino T, Komuro I (2007). Vascular Cell Senescence: Contribution to Atherosclerosis. *Circulation Research*, 100: 15-26.
178. Mohler ER III (2004). Mechanisms of aortic valve calcification. *American Journal of Cardiology*, 94:1396 –1402.
179. Montague CR, Hunter MG, Gavrilin MA, Phillips GS, Goldschmidt-Clermont PJ, Marsh CB (2006). Activation of estrogen receptor-alpha reduces aortic smooth muscle differentiation. *Circulation Research*, 99: 477–484.
180. Monteiro RH (2003). Videografias do coração. Um estudo etnográfico do cateterismo cardíaco. *Cardiologia Intervencionista* (parte 1) acesso: www.facom.unicamp.br/tcvc/llave/c378/monteira.pdf
181. Moore RE, Kawashiri MA, Kitajima K, Secreto A, Millar JS, Pratico D, Arder DJ (2003). Apolipoprotein A-I deficiency results in markedly increased atherosclerosis in mice lacking the LDL receptor, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 23(10):1914-1920.

182. Muller M, Van den Beld AW, Bots ML, Grobbee DE, Lamberts SW, van der Schouw YT (2004). Endogenous sex hormones and progression of carotid atherosclerosis in elderly men. *Circulation*, 109: 2074–2079.
183. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 14: 133–140.
184. Nair GV, Herrington DM (2000) The ERA trial: findings and implications for the future. *Climacteric* 3:227–232.
185. Nakajima M, Hashimoto M, Wang F, Yamanaga K, Nakamura N, Uchida T, Yamanouchi K (1997). Aging decreases the production of PGI₂ in rat aortic endothelial cells. *Experimental Gerontology*, 32:685– 693.
186. Nathan L and Chaudhuri G (1997). Estrogens and atherosclerosis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37, 477–515.
187. Nawrot TS, Staessen JA, Gardner JP, Aviv A (2004). Telomere length and possible link to X chromosome. *Lancet*, 363:507-510.
188. Nelson DL & Cox MM (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4 ed, cap 10: 343-368 e 17:631-653.
189. Neubert K, Haberland A, Kruse I, Wirth M, Schimke I (1997). The ratio of formation of prostacyclin/thromboxane A₂ in HUVEC decreased in each subsequent passage. *Prostaglandins*, 54:447– 462.
190. Nogueira BV, Peotta VA, Meyrelles SS, Vasquez EC (2007). Evaluation of Aortic Remodeling in Apolipoprotein E-deficient Mice and Renovascular Hypertensive Mice. *Archives of Medical Research*, 38:816-821.
191. Ohashi R, Mu H, Yao Q, Chen C (2004). Cellular and Molecular Mechanisms of Atherosclerosis with Mouse Models. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 14(5) 187-190.
192. Okumura M, Iwai M, Ide A, Mogi M, Ito M, Horiuchi M (2005). Sex difference in vascular injury and the vasoprotective effect of valsartan are related to differential AT₂ receptor expression. *Hypertension*, 46: 577–583.
193. Olsson M, Thyberg J, Nilsson J (1999). Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 19:1218-1222.

- 194.Orshal JM, Khalil RA (2004). Gender, sex hormones, and vascular tone. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286: R233–249.
- 195.Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD (1994). Characterization of the early lesion of “degenerative” valvular aortic stenosis: histological and immunohistochemical studies. *Circulation*, 90: 844–853.
196. Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P. (1985).Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis* 57:65– 73.
- 197.Paigen B, Morrow. A., Holmes P, Mitchell D, Williams R (1987). Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*; 68: 231–240.
- 198.Palakodeti V, Oh S, Oh B-H, Mao L, Hongo M, Peterson KL, Ross J Jr (1997). Force-frequency effect is a powerful determinant of myocardial contractility in the mouse. *American Journal of Physiology*, 273:H1283–H1290.
- 199.Paravicini TM, Chrissobolis S, Drummond GR, Sobey CG (2004). Increased NAD(P)H-oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NAD(P)H in vivo. *Stroke*, 35:584–589.
- 200.Paravicini TM, Touyz RM (2008). NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension:Clinical implications and therapeutic possibilities, *Diabetes Care* 31 (Suppl. 2):S170–S180.
- 201.Pasterkamp G, De Kleijn DPV, Borst C (2000). Arterial remodeling in atherosclerosis, restenosis and after alteration of blood flow: potential mechanisms and clinical implications. *Cardiovasc Research*.45:843– 852.
- 202.Pasterkamp G, Smits PC (2002). Imaging of atherosclerosis. Remodelling of coronary arteries. *Journal of Cardiovascular Risk*, 9(5):229-235.
- 203.Paszty C, Maeda N, Verstuyft J, Rubin EM (1994). Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency - induced atherosclerosis in mice. *Journal Clinical of Investigation*, 94: 899-903.
- 204.Patten RD , Aronovitz MJ, Bridgman P, Pandian NG (2002) Use of Pulse Wave and Color Flow Doppler Echocardiography in Mouse Models of

- Human Disease. *Journal of the American Society of Echocardiography*, 15(7):708-714.
205. Pepine CJ, Nichols WW, Pauly DF (2006). Estrogen and different aspects of vascular disease in women and men. *Circulation Research*, 99:459–461.
206. Piedrahita JA, Zhang SH, Hagan JR, Oliver PM, Maeda N (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America*, 89:4471–4475.
207. Plante E, Lachance D, Gaudreau M, Drolet MC, Roussel E, Arsenault M, Couet J (2004). Effectiveness of beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation. *Circulation*, 110:1477–1483.
208. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 71: 343–353.
209. Portes LA, Tucci PJF (2006). O Treinamento físico por natação atenua o remodelamento miocárdico e congestão pulmonar em ratas wistar com insuficiência cardíaca secundária a infarto do miocárdio. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 87 (1): 54-59.
210. Post MJ, Borst C, Pasterkamp G, Haundenschild CC (1995). Arterial remodeling in atherosclerosis and restenosis: a vague concept of a distinct phenomenon. *Atherosclerosis*, 118: S115–S123.
211. Powers RW, Majors AK, Lykins DL, Sims CJ, Lain KY, Roberts JM (2002). Plasma homocysteine and malondialdehyde are correlated in an age- and gender-specific manner. *Metabolism*, 51: 1433–1438.
212. Prencipe M, Ferretti C, Casini AR, Santini M, Giubilei F, Culasso F (1997). Stroke, disability, and dementia: Results of a population survey. *Stroke*, 28: 531–536.
213. Pujadas G (1980) Coronary angiography: in the medical and surgical treatment of ischemic heart disease, *New York, Mc Graw-Hill*
214. Qiao JH, Xie PZ, Fishbein MC, Kreuzer J, Drake TA, Demer LL, Lusis AJ (1994). Pathology of atheromatous lesions in inbred and genetically engineered mice genetic determination of arterial calcification. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 14:1480-1497.

215. Quinn MT, Parthasarathy S, and Steinberg D (1985). Endothelial cell-derived chemotactic activity for mouse peritoneal macrophages and the effects of modified forms of low density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America*, 82: 5949–5953.
216. Quintão (1994). Statins in hypercholesterolemia treatment. *Rev Assoc Med Bras*, 40(1):50-58.
217. Quintão (1995). Is reverse cholesterol transport a misnomer for suggesting its role in the prevention of atheroma formation? *Atherosclerosis*, 116(1): 1-14.
218. Rajamannan NM (2009). Calcific Aortic Stenosis - Lessons Learned From Experimental and Clinical Studies. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 29:162-168.
219. Reckelhoff JF (2005). Sex steroids, cardiovascular disease, and hypertension: Unanswered questions and some speculations. *Hypertension*, 45:170–174.
220. Reddick RL, Zhang SH, Maeda N (1994). Atherosclerosis in Mice Lacking Apo E
Evaluation of Lesional Development and Progression *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 14:141-147.
221. Reis NB (1986). Evolução Histórica da Cardiologia no Brasil (1986). *Arquivos . Brasileiros de Cardiologia*. 46(6): 371-386.
222. Reiser SJ (1978). *Medicine and the reign of technology*. Cambridge, Cambridge University Press.
223. Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, and Willett WC (1993). Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *New England Journal of Medicine*, 328: 1450–1456.
224. Ryan TJ (2002). The Coronary Angiogram and Its Seminal Contributions to Cardiovascular Medicine Over Five Decades. *Circulation*, 106:752-756.
225. Roeters van Lennep JE, Westerveld HT, Erkelens DW, van der Wall EE (2002). Risk factors for coronary heart disease: implications of gender. *Cardiovascular Research*. 53: 538–549.
226. Rosenfeld ME, Tsukada T, Chait A, Bierman EL, Gown AM, Ross R (1987). Fatty streak expansion and maturation in Watanabe heritable hyperlipidemic

- and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis*, 7: 24-34.
227. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*, 288:321–333.
228. Ruggeri RB (2008). Cholesteryl ester transfer protein: pharmacological inhibition for the modulation of plasma cholesterol levels and promising target for the prevention of atherosclerosis, *Current topics in medicine chemistry*, 5(3): 257-264.
229. Sabine JR, James MJ (1976). The intracellular mechanism responsible for dietary feedback control of cholesterol synthesis. *Life Sciences*, 18(11):1185-1192.
230. Safar ME, London GM, Asmar R, Frohlich ED (1998). Recent advances on large arteries in hypertension. *Hypertension*, 32:156 -161.
231. Sanz J e Fayad SA (2008). Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature*, 21;451(7181):953-957.
232. Sato I, Morita I, Kaji K, Ikeda M, Nagao M, Murota S (1993). Reduction of nitric oxide producing activity associated with in vitro aging in cultured human umbilical vein endothelial cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 195:1070 –1076.
233. Sehayek E, Shefer S, Nguyen LB, Ono JG, Merkel M, Breslow JL (2000). Apolipoprotein E regulates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol excretion: studies in C57BL/6 apolipoprotein E knockout mice. *ings of the National Academy of Sciences the United States of America*, 97:3433–3437.
234. Seo HS, Lombardi DM, Polinsky P, Powell-Braxton L, Bunting S, Schwartz SM, Rosenfeld ME (1997). Peripheral vascular stenosis in apolipoprotein E-deficient mice: potential roles of lipid deposition, medial atrophy, and adventitial inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 17:3593–3601.

235. Serganova I, Blasberg R (2005). Reporter gene imaging: Potential impact on therapy. *Nuclear Medicine and Biology*, 32:763-780.
236. Shaw LJ, Bairey Merz CN, Pepine CJ, Reis SE, Bittner V, Kelsey SF, Olson M, Johnson BD, Mankad S, Sharaf BL, Rogers WJ, Wessel TR, Arant CB, Pohost GM, Lerman A, Quyyumi AA, Sopko G, WISE Investigators (2006). Insights from the NHLBI Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) Study: Part I: Gender differences in traditional and novel risk factors, symptom evaluation, and gender-optimized diagnostic strategies. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(Suppl 3):S4-S20.
237. Shi Q, Hubbard GB, Kushwaha RS, Rainwater D, Thomas CA, Leland M, VandeBerg JL, Wang XL (2007). Endothelial senescence after high-cholesterol, high-fat diet challenge in baboons. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 292: H2913-H2920.
238. Shufelt CL, Merz CNB (2009). Contraceptive Hormone Use and Cardiovascular Disease, *Journal of the American College of Cardiology*, 53:221-231.
239. Schwinger RH, Munch G, Bolck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E (1999). Reduced Ca²⁺ sensitivity of SERCA2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 31(3): 479-491.
240. Sies H (1991) *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. London: Academic.
241. Singh JP, Evans JC, Levy D, Larson MG, Freed LA, Fuller DL, Lehman B, Benjamin EJ (1999). Prevalence and clinical determinants of mitral, tricuspid, and aortic regurgitation (the Framingham Heart Study), *The American Journal of Cardiology*, 83: 897-902. [published correction appears in *Am J Cardiol*. 1999;84:1143].
242. Smith JK (2001). Exercise and Atherogenesis. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 29(2), 49-53.
243. Sones FM, Jr. (1959). Acquired heart disease: symposium on present and future of cineangiography. *The American Journal of Cardiology*, 3: 710.

- 244.Sones FM (1962). Cine coronary angiography. *Modern Concepts of Cardiovascular Disease*, 31:735–738.
- 245.Song L, Leung C, Schindler C (2001). Lymphocytes are important in early atherosclerosis. *Journal Clinical of Investigation*, 108(2):251-259.
- 246.Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FAH, Bertolami MC (2007). IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 88 (1): 2-19
- 247.Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull WJ, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 15: 1512–1531.
- 248.Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL (1989) Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New England Journal of Medicine*, 320: 915–924.
- 249.Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, Kitzman DW, Otto CM (1997). Clinical factors associated with calcific aortic valve disease: Cardiovascular Health Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 29: 630–634.
- 250.Stirone C, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V (2005). Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Molecular Pharmacology*, 68: 959–965.
- 251.Stocker R e Keaney Jr JF (2003). Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiological Reviews* , 84:1381-1478.
- 252.Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Groché C, Laufs K, Bohm M, Nickenig G (2003). Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circulation Research*. 2003; 93: 170–177.
- 253.Strippoli GF, Craig JC (2009). Sunset for Statins after AURORA? *New England Journal of Medicine*, 360(14):1455-1457.
- 254.Strong JP (1992). Atherosclerotic lesions: natural history, risk factors, and topography. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 116:1268-1275.

- 255.Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Bohm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H (1994). Gene expression of the cardiac $\text{Na}^+\text{-Ca}^{++}$ exchanger in end-stage human heart failure. *Circulation Research*, 75(3): 443-453.
- 256.Tall (2008). Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *Journal of internal medicine*, 263(3): 256-273.
- 257.Tanaka K, Sata M, Fukuda D, Suematsu Y, Motomura N, Takamoto S, Hirata Y, Nagai R (2005). Age-associated aortic stenosis in Apolipoprotein E- deficient mice. *Journal of the American College of Cardiology*, 46(1): 134-141.
- 258.Thompson JS (1969). Atheromata in an inbred strain of mice. *Journal of Atherosclerosis Research* 10: 113–122.
- 259.Thompson KV, Holliday R (1983). Genetic effects on the longevity of cultured human fibroblasts. II. DNA repair deficient syndromes. *Gerontology*, 29:83– 88.
- 260.Thum T e Borlak, J (2002). Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. *FASEB Journal*, 16: 1537–1549.
- 261.Tivesten A, Mellström D, Jutberger H, Fagerberg B, Lernfelt B, Orwoll E, Karlsson MK, Ljunggren O, Ohlsson C (2007). Low serum testosterone and high serum estradiol associate with lower extremity peripheral arterial disease in elderly men. The MrOS Study in Sweden. *Journal of the American College of Cardiology*, 50:1070–1076.
- 262.Tornos MP, Olona M, Permanyer-Miralda G, Herrejon MP, Camprecios M, Evangelista A, Garcia del Castillo H, Candell J, Soler-Soler J (1995). Clinical outcome of severe asymptomatic chronic aortic regurgitation: a long-term prospective follow-up study. *American Heart Journal*. 1995;130:333–339.
- 263.Touyz RM (2004). Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*, 44(3):248-252.
- 264.Tracy RE (1966). Sex differences in coronary disease: two opposing views. *Journal Chronic Diseases*, 19:1245–1251.
- 265.Tsuda M, Iwai M, Li JM, Li HS, Min LJ, Ide A, Okumura M, Suzuki J, Mogi M, Suzuki H, Horiuchi M (2005). Inhibitory effects of AT1 receptor blocker,

- olmesartan, and estrogen on atherosclerosis via anti-oxidative stress. *Hypertension*, 45: 545–551.
- 266.Unterluggauer H, Hampel B, Zwerschke W, Jansen-Durr P(2003). Senescence associated cell death of human endothelial cells: the role of oxidative stress. *Experimental Gerontology*, 38:1149 –1160.
- 267.Upston JM, Kritharides L, Stocker R (2003). The role of vitamin E in atherosclerosis. *Progress in Lipid Research*, 42: 405–422.
- 268.Valenta DT, Bulgrien JJ, Banka CL, Curtiss LK (2006). Overexpression of human ApoA1 transgene provides long-term atheroprotection in LDL receptor-deficient mice. *Atherosclerosis*, 189(2):255-263.
- 269.Van Camp G, Flamez A, Cosyns B, Goldstein J, Perdaens C, Schoors D (2003). Heart valvular disease in patients with Parkinson's disease treated with high-dose pergolide. *Neurology*, 61:859–861.
- 270.Van Ree JH, Van Den Broek WJ, Dahlmans VE, Groot PH, Vidgeon-Hart M, Frants RR, Wieringa B, Havekes LM, Hofker MH (1994). Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*, 111(1):25-37.
- 271.von Dehn G, von Dehn O, Völker W, Langer C, Weinbauer GF, Behre HM, Nieschlag E, Assmann G, von Eckardstein A (2001). Atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice is decreased by the suppression of endogenous sex hormones. *Hormone and Metabolic Research*, 33:110–4.
- 272.Vasile E, Tomita Y, Brown, LF, Kocher O, Dvorak HF (2001). Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis. *FASEB Journal*, 15, 458–466.
- 273.Véniant MM, Withycombe S, Young SG (2001). Lipoprotein size and atherosclerosis susceptibility in ApoE^{-/-} and LDL^{-/-} Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 21: 1567-1570.
- 274.Yamashita T, Kawashima S, Ozaki M, Namiki M, Hirase T, Inoue N, Hirata K, Umetani K, Sugimura K, Yokoyama M (2002). Mouse Coronary Angiograph Using Synchrotron Radiation Microangiography. *Circulation*, 105: 3-4
- 275.Yamashita T, Kawashima S, Ozaki M, Namiki M, Shinohara M, Inoue N, Hirata K, Umetani K; Yokoyama M (2002). In Vivo Angiographic Detection of

- Vascular Lesions in Apolipoprotein E-Knockout Mice Using a Synchrotron Radiation Microangiography System. *Circulation Journal*, 66: 1057–1059.
276. Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnkar V, Sacks FM (1991). Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *New England Journal of Medicine*, 24;325(17):1196-1204.
277. Wang YX Halks-Miller M, Vergona R, Sullivan ME, Fitch R, Mallari C, Martin-McNulty B, Da Cunha V, Freay A, Rubanyi GM, Kauser K (2000). Increased aortic stiffness assessed by pulse wave velocity in apolipoprotein E-deficient mice. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 278: H428–H434.
278. Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C (2000). Arterial remodeling: mechanisms and clinical implications. *Circulation*, 102:1186-1191.
279. Wassmann K, Wassmann S, Nickenig G (2005). Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. *Circulation Research*, 97: 1046–54.
280. Wei JY, Spurgeon HA, Lakatta EG (1984). Excitation-contraction in rat myocardium: alterations with adult aging. *American Journal of Physiology*, 246:H784–91.
281. Weinreb DB, Aguinaldo JGS, Jonathan E. Feig, Fisher EA, Fayad ZA (2007). Non-invasive MRI of mouse models of atherosclerosis. *NMR in Biomedicine*, 20:256-264.
282. Weiss RM, Ohashi M, Miller JD, Young SG, Heistad DD (2006). Calcific Aortic Valve Stenosis in Old Hypercholesterolemic Mice. *Circulation*, 114:2065-2069.
283. Wenger NK, Speroff L, Packard B (1993) Cardiovascular health and disease in women. *New England Journal of Medicine*, 329:247–256.
284. Wiegerinck RF, Cojoc A, Zeidenweber CM, Ding G, Shen M, Joyner RW, Fernandez JD, Kanter KR, Kirshbom PM, Kogon BE, Wagner MB (2009). Force frequency relationship of the human ventricle increases during early postnatal development. *Pediatric Research*, 65(4): 414-419.
285. Wiesel P, Mazzolai L, Nussberger J, Pedrazzini T (1997). Two-Kidney, One Clip and One-Kidney, One Clip Hypertension in Mice. *Hypertension*, 29: 1025-1030.

286. Wilkinson M, Siau M, Horackova M (1995). Modulation of cardiac M2 muscarinic receptor binding by progesterone-related steroids. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 27: 1831–1839.
287. Wilkinson I, Cockcroft JR (2007). Cholesterol, lipids and arterial stiffness. *Advances in cardiology*, 44:261-277.
288. Wilmshurst PT, Stevenson RN, Griffiths H, Lord JR (1997). A case—control investigation of the relation between hyperlipidaemia and calcific aortic valve stenosis. *Heart*, 78:475– 9.
289. Wisloff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen O (2002). Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 54(1): 162-174.
290. Wright HP (1968). Endothelial mitosis around aortic branches in normal guinea pigs. *Nature* 220, 78–79.
291. Xing D, Nozell S, Chen Y-F, Hage F, Oparil S (2009). Estrogen and Mechanisms of Vascular Protection. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 29:289-295.
292. Xu Q (2006). *A Handbook of Mouse Models of Cardiovascular Disease*, St George's University of London, London, UK, p.53-64; 255-269.
293. Yang S, Bae L, Zhang L (2000). Estrogen increases eNOS and NO_x release in human coronary artery endothelium. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 36: 242–247.
294. Yao A, Su Z, Nonaka A, Zubair I, Spitzer KW, Bridge JH, Muelheims G, Ross JJ, Barry WH (1998). Abnormal myocyte Ca²⁺ homeostasis in rabbits with pacing- induced heart failure. *The American Journal of Physiology*, 275(4): 1441-1448
295. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 258: 468–471.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)