

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL DE  
CAMUNDONGOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS FÊMEAS**

**Maíne Sousa Cola**

**Mestrado em Ciências Fisiológicas**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Centro de Ciências da Saúde  
Universidade Federal do Espírito Santo**

**Vitória – ES  
2009**

MAÍNE SOUSA COLA

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL DE  
CAMUNDONGOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS FÊMEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez

Co-orientadoras:

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvana dos Santos Meyrelles

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ágata Lages Gava

**Vitória**

**2009**

**MAÍNE SOUSA COLA**

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL DE  
CAMUNDONGOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS FÊMEAS**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margareth Ribeiro Moyses  
Universidade Federal do Espírito Santo – Examinadora Interna

---

Dr<sup>a</sup>. Raquel Binda Pereira  
Examinadora Externa

---

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez  
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

Vitória, 11 de Setembro de 2009.

*Aos meus pais, César e Ocy, pela dedicação e esforço sem medida para oferecer a mim o melhor legado que poderiam me deixar: a educação.*

*À querida Luísa, por toda paciência, compreensão e companheirismo ao longo desses anos.*

*Ao Érico, pelo carinho, apoio, compreensão e motivação.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, provedor de toda sabedoria e força, por Sua infinita fidelidade e por ter sido meu refúgio e sustentador.

Ao Prof. Vasquez, pela paciência e confiança ao longo destes anos. Um grande exemplo de pesquisador, com quem aprendo a cada dia.

À Prof<sup>ª</sup>. Silvana, pelo apoio e compreensão que me deu em momentos em que muito precisei. Obrigada pela atenção e pelas palavras de conforto, foram essenciais e especiais; estarão guardadas para sempre.

À Prof<sup>ª</sup>. Ágata, pelo auxílio prático e teórico sem os quais a realização deste trabalho certamente teria sido mais difícil.

À Robéria, por me ensinar a técnica de reatividade vascular do leito mesentérico isolado com todo cuidado e meticulosidade, pelo desenho experimental inicial do estudo e por ter me incentivado quando tudo estava ainda começando.

A todos os amigos do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular: Camille, pela amizade e cumplicidade durante estes anos de convivência; Isabele, pela companhia, conselhos e dicas; Edicléia, pela ajuda nesta etapa

final do mestrado; Breno e Thiago, obrigada pelos incentivos; Bernah, Bianca, Clarissa, Fernanda, Flávia, Geovana, Leandro, Marcella, Mariana, Neila e todos que passaram pelo LTCC durante este tempo. Agradeço a todos pela parte que cada um tem na conclusão deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram, seja nos momentos de experimentos, seja com sugestões ou orações. Vocês fazem parte desta vitória!

*“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.” (Galileu Galileu)*

## RESUMO

Os efeitos da hipercolesterolemia sobre a vasomotricidade de camundongos deficientes para a apolipoproteína E (ApoE), um modelo murino que desenvolve aterosclerose espontaneamente, ainda são controversos. Os estudos prévios foram realizados majoritariamente em vasos de condutância e eles indicam que as fêmeas são mais susceptíveis à disfunção endotelial do que os machos. No presente estudo avaliamos a função endotelial de vasos de resistência de camundongos fêmeas normocolesterolêmicos C57BL/6 (C57) e hipercolesterolêmicos (ApoE) ovariectomizados em comparação aos normais. Camundongos C57 e ApoE de 5 meses de idade foram submetidos à ovariectomia (OVX) ou cirurgia fictícia (Sham) e estudados 30 dias após o procedimento. A reatividade vascular à norepinefrina (NE,  $10^{-9}$  a  $2 \times 10^{-3}$  mol/L), à acetilcolina (ACh,  $10^{-10}$  a  $10^{-3}$  mol/L) e ao nitroprussiato de sódio (NPS,  $10^{-10}$  a  $10^{-3}$  mol/L) foi avaliada no leito arteriolar mesentérico isolado através de curvas concentração-efeito. O relaxamento induzido pela ACh foi significativamente reduzido nos animais ApoE quando comparado aos C57, como indicado pela resposta máxima ( $37 \pm 4\%$  vs.  $72 \pm 1\%$ ) e pelo  $\text{LogEC}_{50}$  ( $5,67 \pm 0,18$  vs.  $6,23 \pm 0,09$  mol/L). A ovariectomia causou um prejuízo significativo no relaxamento promovido pela ACh no grupo C57 (resposta máxima:  $61 \pm 4\%$ ), mas não piorou o estado deficiente de relaxamento dos camundongos ApoE (resposta máxima:  $39 \pm 5\%$ ). O vasorelaxamento induzido pelo NPS e a vasoconstrição induzida



pela NE foram similares nos animais ApoE e C57 fêmeas. Este é o primeiro estudo a mostrar um prejuízo na função endotelial de vasos de resistência de camundongos espontaneamente ateroscleróticos (ApoE-deficientes) fêmeas em comparação com camundongos fêmeas normais (C57). A disfunção endotelial nos animais hipercolesterolêmicos foi tão marcante que a ovariectomia, que prejudicou a função endotelial em C57, não causou dano adicional nos camundongos ApoE-deficientes.

## ABSTRACT

The effects of hypercholesterolemia on vasomotricity in apolipoprotein E-deficient (ApoE) mice, a murine model of spontaneous atherosclerosis, are still controversial. The studies were mostly made on conductance vessels and they indicate that females are more susceptible than males to endothelial dysfunction. In the present study we evaluated the endothelium function of resistance vessels from normal C57BL/6 (C57) and hypercholesterolemic (ApoE) female mice in both normal and ovariectomy conditions. Five month-old C57 and ApoE mice underwent ovariectomy (OVX) or sham surgery and were studied 30 days later. The vascular reactivity to norepinephrine (NE,  $10^{-9}$  to  $2 \times 10^{-3}$  mol/L), acetylcholine (ACh,  $10^{-10}$  to  $10^{-3}$  mol/L) and sodium nitroprusside (SNP,  $10^{-10}$  to  $10^{-3}$  mol/L) was evaluated in the isolated mesenteric arteriolar bed through concentration-effect curves. ACh-induced relaxation was significantly reduced in ApoE compared to C57 animals, as indicated by both the maximal response ( $37 \pm 4\%$  vs.  $72 \pm 1\%$ ) and the  $\text{LogEC}_{50}$  ( $5.67 \pm 0.18$  vs.  $6.23 \pm 0.09$  mol/L). Ovariectomy caused a significant impairment in the ACh-induced relaxation in the C57 group (maximal response:  $61 \pm 4\%$ ) but did not worsen the deficient state of relaxation of ApoE animals (maximal response:  $39 \pm 5\%$ ). SNP-induced vasorelaxation and NE-induced vasoconstriction were similar in ApoE and C57 female mice. This is the first study to show an impairment of endothelial function in resistance vessels of spontaneously atherosclerotic (ApoE-deficient) female mice compared with

normal (C57) female mice. The endothelial dysfunction in hypercholesterolemic animals was so marked that ovariectomy, which impaired the endothelial function in C57, did not cause additional damage in ApoE-deficient mice.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	
Modificações oxidativas na aterosclerose.....	26
Figura 2	
Vaso sanguíneo.....	32
Figura 3	
Canulação da artéria mesentérica superior.....	49
Figura 4	
Curva concentração-efeito à norepinefrina.....	50
Figura 5	
Curva concentração-efeito à acetilcolina.....	51
Figura 6	
Curva concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio.....	52
Figura 7	
Esquema do protocolo de reatividade vascular.....	52

Figura 8

Níveis de estradiol plasmático nos quatro grupos estudados.....56

Figura 9

Níveis de colesterol plasmático total nos grupos estudados.....57

Figura 10

Registros típicos do vasorelaxamento à acetilcolina.....59

Figura 11

Relaxamento endotélio-dependente à acetilcolina.....60

Figura 12

Registros típicos do relaxamento ao nitroprussiato de sódio.....61

Figura 13

Relaxamento endotélio-independente ao nitroprussiato de sódio.....62

Figura 14

Registros típicos da contração à norepinefrina.....63

Figura 15

Contração concentração-dependente à norepinefrina.....64

Tabela 1

Peso corporal, peso do útero e relação peso útero/peso corporal.....55

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina

AMPC – Adenosina monofosfato cíclico

ANOVA – Análise de variância

ApoE – Apolipoproteína E

ApoE<sup>+/-</sup> – Camundongos heterozigotos para a apolipoproteína E

ApoE<sup>-/-</sup> – Camundongos homozigotos para a apolipoproteína E

C57 – Camundongo da linhagem C57BL/6

Ca<sup>2+</sup> – Íons cálcio

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O – Cloreto de cálcio di-hidratado

CCE – Curva concentração-efeito

CMLV – Células musculares lisas vasculares

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

CO – Monóxido de carbono

DCV – Doenças cardiovasculares

EDCFs – Fatores constritores derivados do endotélio

EDHFs – Fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio

EDRFs – Fatores relaxantes derivados do endotélio

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EET – Ácido epoxieicosatrienóico

ELAM-1 – Endothelial leukocyte adhesion molecule

eNOS (NOS-III) – Óxido nítrico sintase endotelial ou do tipo 3

EPM – Erro padrão da média

ET<sub>1</sub> – Endotelina 1

GMPc – Guanosina monofosfato cíclico

ICAM-1 – Intercellular adhesion molecule

IFN $\gamma$  – Interferon gama

IL-1 – Interleucina-1

IL-4 – Interleucina-4

IL-6 – Interleucina-6

iNOS (NOS-II) – Óxido nítrico sintase induzível ou do tipo 2

i.p – Intraperitoneal

IP<sub>3</sub> – Trifosfato de inositol

K<sup>+</sup> – Íons potássio

KCl – Cloreto de potássio

kD – KiloDaltons

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato de potássio monobásico

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LDLmox – Lipoproteína de baixa densidade minimamente oxidada

LDLox – Lipoproteína de baixa densidade totalmente oxidada

L-NAME – N<sup>w</sup>-nitro-L-arginina metil-éster

mg/dL – Miligramas por decilitro

mg/g – Miligramas por grama

mg/Kg – Miligramas por quilograma

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – Sulfato de magnésio hepta-hidratado



mmHg – Milímetros de mercúrio

mmol/L – Milimoles por litro

mol/L – Moles por litro

NaCl – Cloreto de sódio

NaHCO<sub>3</sub> – Bicarbonato de sódio

NE – Norepinefrina

NFκB – Fator nuclear Kappa B

nNOS (NOS-I) – Óxido nítrico sintase neuronal ou do tipo 1

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – Nitrito

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – Nitrato

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

NPS – Nitroprussiato de sódio

O<sub>2</sub> – Oxigênio

O<sup>2-</sup> – Ânion superóxido

OMS – Organização Mundial de Saúde

OVX – Ovariectomizado

PAM – Pressão arterial média

PDGF – Platelet derived growth factor

PGH<sub>2</sub> – Endoperóxidos

PGI<sub>2</sub> – Prostaciclina

pg/mL – Picogramas por mililitro

PP – Pressão de perfusão

SHR – Ratos espontaneamente hipertensos

SNP – Sodium nitroprusside

TNF $\alpha$  – Tumor necrosis factor alfa

TNG – Trinitrato de glicerila

TXA<sub>2</sub> – Tromboxano

VCAM-1 – Vascular cell adhesion molecule

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1. Aterosclerose.....	22
1.2. Camundongo ApoE <i>knockout</i> .....	27
1.3. Endotélio Vascular.....	29
1.4. 17 $\beta$ -Estradiol.....	38
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
2.1. Objetivo Geral.....	44
2.2. Objetivos Específicos.....	44
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>46</b>
3.1. Animais.....	46
3.2. Grupos Experimentais.....	46
3.3. Ovariectomia.....	47
3.4. Peso do Útero.....	47
3.5. Determinação dos Níveis de Estradiol e Colesterol Plasmáticos.....	48
3.6. Preparação do Leito Arteriolar Mesentérico.....	48
3.7. Curvas Concentração-Efeito.....	50
3.8. Análise Estatística.....	53
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
4.1. Peso do Útero.....	55
4.2. Estradiol Plasmático.....	56
4.3. Colesterol Plasmático Total.....	57
4.4. Curvas Concentração-Efeito.....	58

<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
5.1. Limitações/Perspectivas do Estudo.....	75
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>



# ***Introdução***



## 1. Introdução

A aterosclerose é uma doença progressiva e multifatorial, que resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais e que se caracteriza pelo acúmulo de elementos fibrosos na camada íntima das artérias (Ross, 1999). O modelo murino que tem deletado o gene que codifica a apolipoproteína E (ApoE), que desenvolve espontaneamente hipercolesterolemia e lesões ateroscleróticas semelhantes às encontradas em humanos (Piedrahita *et al.*, 1992; Plump *et al.*, 1992), tem contribuído de forma significativa para o entendimento desta doença. A ApoE é uma lipoproteína constitutiva da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) sintetizada pelo fígado e por outros tecidos e serve como um ligante de alta afinidade para os receptores da lipoproteína de baixa densidade (LDL) sendo, então, responsável pela captação celular de LDL (Jawień *et al.*, 2004).

Embora a disfunção endotelial seja considerada um dos primeiros estágios da aterosclerose (Ross, 1993), sua ocorrência nos camundongos ApoE *knockout* ainda é controversa. Estudos em vasos de condutância de machos e fêmeas desta linhagem de animais mostram tanto função endotelial normal (Gervais *et al.*, 2003; Villeneuve *et al.*, 2003) quanto disfunção endotelial (Deckert *et al.*, 1999; Niebauer *et al.*, 1999; d'Uscio *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2001). Por outro lado, alguns estudos mostram que a função endotelial encontra-se normal em

vasos de resistência deste modelo experimental (Arruda *et al.*, 2005; Wölfle & Wit, 2005), porém tais estudos são restritos à camundongos machos.

Encontra-se bem estabelecido o fato de que os estrógenos exercem inúmeros efeitos diretos na parede dos vasos sanguíneos (Mendelsohn, 2000; Arnal & Bayard, 2001; Tostes *et al.*, 2003; Maturana *et al.*, 2007) e que as mulheres após a menopausa apresentam elevado risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Carr *et al.*, 2000), que é reduzido pela administração exógena de 17 $\beta$ -estradiol (Chae *et al.*, 1997; Quiao *et al.*, 2008). Corroborando esta hipótese trabalhos mostram que a perda dos hormônios femininos leva ao prejuízo da função endotelial de ratas (Dantas *et al.*, 1999; Molsiri *et al.*, 2004; Stice *et al.*, 2009), mas os estudos ainda são incipientes em camundongos.

### **1.1. Aterosclerose**

A aterosclerose é a doença responsável pelo maior índice de morbidade e mortalidade no mundo. No Brasil, em 1995, 23% das mortes em todas as idades ocorreram em consequência da aterosclerose (Corrêa-Camacho *et al.*, 2007). Essa porcentagem cresce para 26,3% quando a análise é feita exclusivamente no estado de São Paulo e 32,7% no Rio Grande do Sul (Montenegro, 1999).

Desde o início do século, vários pesquisadores tiveram interesse em estabelecer a história natural da aterosclerose, pois dados de necrópsias indicaram vínculo

entre doenças arteriais ateroscleróticas e distúrbios cardiovasculares (Giannini, 2000). A aterosclerose foi primeiramente descrita por Virchow (século XIX), o qual propôs que determinadas lesões encontradas nos vasos seriam decorrentes da “insudação” de plasma para a camada íntima das artérias, resultando em um processo proliferativo localizado. Uma outra teoria, chamada teoria da “incrustação”, defende que as alterações vasculares ocorriam em virtude de pequenos trombos que, ao se organizarem, espessavam a camada íntima (Giannini, 2000). Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) define a aterosclerose como sendo doença de artérias de grande ou médio calibre, caracterizada por alterações da íntima, representadas por acúmulo de lipídeos, carboidratos complexos, componentes do sangue, células e material intercelular.

A aterosclerose primariamente afeta artérias elásticas, como a aorta, a carótida e as ilíacas, mas também pode comprometer as grandes e médias, como a coronária e as poplíteas. A doença pode começar na infância, porém os sintomas não são detectados até a idade adulta ou até a terceira idade, quando ocorrem lesões e os órgãos são afetados (Stary *et al.*, 1995). Os sintomas da doença aterosclerótica são mais freqüentes nas artérias que irrigam o coração, o cérebro, os rins, as extremidades e o intestino delgado. Infarto do miocárdio, infarto cerebral e aneurisma aórtico são as maiores conseqüências dessa doença. Além disso, a diminuição na irrigação pode levar à gangrena dos membros inferiores ou à oclusão mesentérica (Strong, 1992). A



hipercolesterolemia, a obesidade, o envelhecimento e a suscetibilidade genética individual figuram entre os fatores de risco para lesão arterial (Ross, 1999).

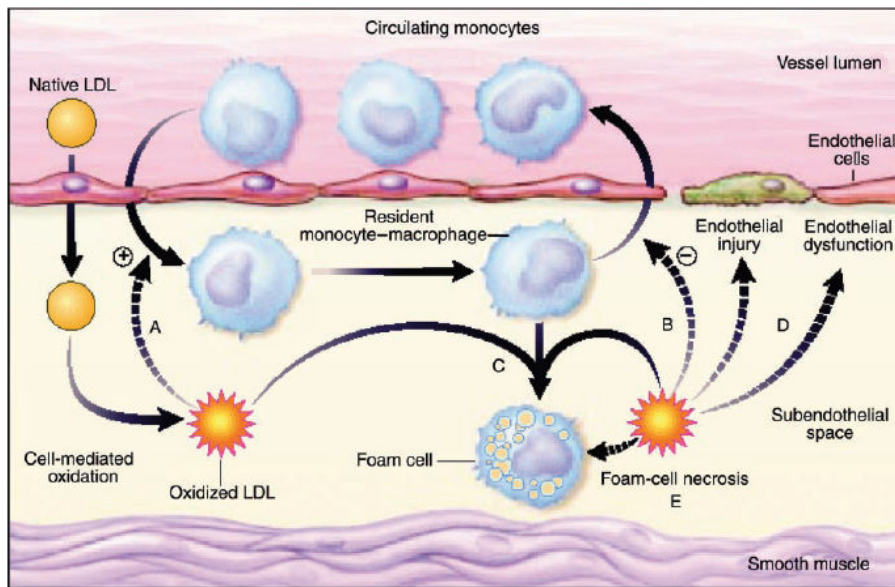
Observações fisiopatológicas em seres humanos e animais levantam a hipótese de que a aterosclerose é resultante de uma resposta do organismo à injúria tecidual, com enfoque para a disfunção endotelial, apontada como o marco inicial da doença (Quyymi, 1998; Corrêa-Camacho *et al.*, 2007). A resposta vascular à lesão induzidas pelos fatores de risco é de tipo inflamatório e envolve a interação de diversos grupos celulares, como células endoteliais, monócitos/macrófagos, linfócitos T, plaquetas e células musculares lisas vasculares (CMLV). As lesões iniciais ocorrem especialmente em locais onde o fluxo laminar sangüíneo está alterado, o que interfere na tensão de cisalhamento (*shear stress*) e nas características normais do endotélio, causando diminuição da produção de óxido nítrico (NO). A formação da placa ateromatosa (ateroma) pode ser dividida em cinco fases fundamentais, a saber: 1) disfunção endotelial; 2) penetração de LDL e leucócitos circulantes, especificamente linfócitos T e monócitos, para a região subendotelial; 3) oxidação de LDL; 4) formação de células espumosas; 5) migração e proliferação de CMLV para o espaço subendotelial e síntese de matriz extracelular; 6) lesão estrutural do endotélio, com deposição de plaquetas e formação de trombos (Luz & Uint, 2005).

A presença de disfunção resulta em aumento da permeabilidade endotelial a lipoproteínas e outros constituintes plasmáticos. A deposição de leucócitos sobre o endotélio e sua penetração é mediada por moléculas de adesão expressas no

endotélio e nas células circulantes, dentre as quais se destacam a VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule), a ICAM-1 (intercellular adhesion molecule), a ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule) e a E-selectina (Bevilacqua, 1993). Acredita-se que a secreção de moléculas de adesão é regulada por citocinas sintetizadas em pequenas concentrações pelo endotélio arterial, como a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-4 (IL-4), a interleucina-6 (IL-6), o TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor alfa) e o IFN $\gamma$  (interferon gama). Na vigência de disfunção endotelial a concentração destas se eleva, estimulando a produção de moléculas de adesão favorecendo, assim, o recrutamento e a adesão de monócitos à superfície endotelial (Gimbrone, 1994).

Em contato com células endoteliais, macrófagos ou células musculares lisas que produzem radicais livres de O<sub>2</sub>, as partículas de LDL sofrem oxidação progressiva; inicialmente, somente de seus lípidos (LDL<sub>mox</sub>, minimamente oxidada) e, depois, também de seu componente protéico (LDL<sub>lox</sub>, totalmente oxidada) (Berliner *et al.*, 1995). A partícula oxidada passa a ser reconhecida por receptores acetilados (*scavenger receptors*) e CD-36 na superfície dos macrófagos. Os macrófagos são oriundos da diferenciação de monócitos, que também penetraram na região subendotelial simultaneamente à LDL. Tais receptores acetilados não são regulados pela concentração intracelular de colesterol; assim, macrófagos incorporam grandes quantidades de partículas de LDL<sub>lox</sub> e tornam-se ricos em conteúdo lipídico. Formam-se, assim, as células espumosas (*foam cells*), características da estria gordurosa, lesão mais precoce reconhecida no início da aterosclerose. A Figura 1 a seguir ilustra as

modificações oxidativas ocorridas durante formação da placa aterosclerótica ora descritas.



**Figura 1.** Modificações oxidativas na aterosclerose. Partículas de LDL são retidas no espaço subendotelial, onde sofrem oxidação. LDLox estimula a quimiotaxia de monócitos (A), impede a saída de monócitos (B), formam as células espumosas (C) e acentua a disfunção e injúria endoteliais (D). Com o acúmulo de LDLox, as células espumosas sofrem necrose (E). (Adaptado de Stocker & Keaney, 2004)

As células musculares lisas vasculares, ao migrarem para a íntima, proliferam e passam a produzir citocinas, fatores de crescimento e matriz extracelular, constituída principalmente de colágeno e proteoglicanos (Berliner *et al.*, 1995). Há erosão endotelial induzida pela molécula de LDL oxidada, o que causa a formação de microtrombos de plaquetas, que também produzirão fatores de

crescimento derivados de plaquetas, incluindo o PDGF (platelet derived growth factor). Nesta fase, o endotélio pode apresentar lesões extensas. A interação entre plaquetas, endotélio, células musculares lisas e macrófagos determinará o grau de proliferação celular, secreção de matriz extracelular e, conseqüentemente, a extensão da placa madura (Lusis, 2000).

## **1.2. Camundongo ApoE *knockout***

Por várias décadas, utilizou-se o rato como a principal espécie nos estudos experimentais. Ultimamente, passou-se a usar o camundongo como nova ferramenta de pesquisa devido ao seu pequeno porte, menor custo de manutenção, curto período de gestação e à possibilidade de aplicação dos avanços da genética avançada para a obtenção de animais modificados geneticamente como, por exemplo, o camundongo *knockout* para a apolipoproteína E (ApoE) (Hofker *et al.*, 1998). Este modelo murino foi desenvolvido independentemente por três laboratórios distintos (Piedrahita *et al.*, 1992; Plump *et al.*, 1992, Van Ree *et al.*, 1994), que utilizaram estratégia similar para abolir a produção da apolipoproteína E. O gene que codifica a ApoE foi inativado nas células tronco embrionárias de um camundongo saudável e, em seguida, tais células foram inseridas em blastômeros de camundongos isogênicos C57BL/6 (C57). Assim, foram gerados filhotes hetero (ApoE<sup>+/-</sup>) e homozigotos (ApoE<sup>-/-</sup>) para a apolipoproteína E e, através de cruzamentos entre

as linhagens homozigotas, foi originado o camundongo *Knockout* para a ApoE (Plump *et al.*, 1992).

A ApoE é uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 34 kD que é sintetizada pelo fígado, cérebro e outros tecidos, tanto em camundongos quanto em humanos; é componente estrutural da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e sintetizada pelo fígado e por outros tecidos, servindo como um ligante de alta afinidade para os receptores da lipoproteína de baixa densidade (LDL) sendo, então, responsável pela captação celular de LDL (Jawień *et al.*, 2004).

O camundongo ApoE *Knockout* é considerado um dos mais relevantes modelos para o estudo da aterosclerose, já que os animais são hipercolesterolêmicos (apresentando níveis de colesterol plasmático aproximadamente 5 vezes maior que camundongos C57) e desenvolvem lesões arteriais espontâneas (Piedrahita *et al.*, 1992; Plump *et al.*, 1992). Esta linhagem de camundongos, ainda, permite o estudo da patogênese e da terapia da aterosclerose, visto que contém todo o espectro de lesões observado durante a aterogênese humana, sendo semelhante à hiperlipidemia do tipo III (Plump *et al.*, 1992, Jawień *et al.*, 2004).

### **1.3. Endotélio Vascular**

O endotélio é uma monocamada de epitélio pavimentoso localizada entre o sangue circulante e a camada média do músculo liso vascular, utilizando-se desta localização para manter a homeostase da parede vascular e a regulação da circulação. O endotélio recobre todos os vasos do organismo, desde o coração, grandes, médias e pequenas artérias, microartérias e capilares, bem como toda a árvore venosa, veias pós-capilares, pequenas, médias e grandes veias que conduzem o sangue de volta ao coração e aos vasos linfáticos (Luz *et al.*, 2005).

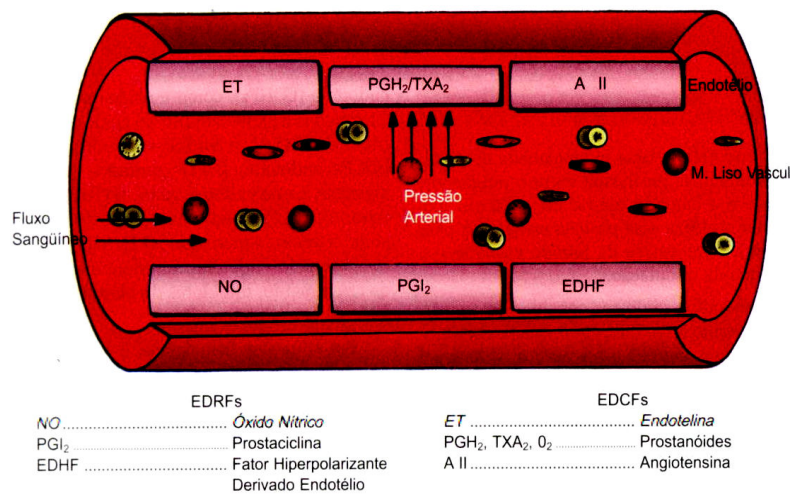
O conhecimento sobre a função da célula endotelial vascular mudou muito nas últimas três décadas, quando Furchgott e Zawadzki, em 1980, demonstraram que a célula endotelial modula o tônus vascular. A célula endotelial controla ativamente o tônus vascular, a coagulação, a trombólise, o remodelamento vascular e a resposta inflamatória e imune. A presença da célula endotelial recobrando todo o leito vascular pode significar, em um primeiro momento, que o endotélio forma uma extensa rede de proteção entre os componentes do sangue e os tecidos para permitir melhor fluidez e evitar a coagulação do sangue. Contudo, a forma pela qual é montada a estrutura e a organização da rede requer o contato íntimo entre as células endoteliais. Em qualquer situação de quebra de continuidade da rede ou perda do contato, as células se organizam e procuram, novamente, refazer a conexão intercelular.

O endotélio pode ser considerado um órgão endócrino ativo que, em resposta a estímulos humorais, neurais e mecânicos, sintetiza e libera substâncias vasoativas que modulam tônus, calibre vascular e fluxo sanguíneo, desempenhando papel fundamental na regulação da circulação. Essas substâncias vasoativas foram denominadas fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e fatores constritores derivados do endotélio (EDCFs). Dentre os EDRFs, pode-se citar: óxido nítrico – NO (Jover *et al.*, 1993; Palmer *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1988), prostaciclina – PGI<sub>2</sub>, monóxido de carbono – CO e vários fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHFs), como o ácido epoxieicosatrienóico – EET, metabólito do ácido araquidônico via P450 (Campbell *et al.*, 1996), e endocabinóides (He & Curry, 1993). São EDCFs: endotelina – ET<sub>1</sub> (Zakhary *et al.*, 1996), produtos da ciclooxigenase, como endoperóxidos – PGH<sub>2</sub> e tromboxano – TXA<sub>2</sub> (Diedrich *et al.*, 1990); e espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido – O<sup>-2</sup>. São liberados também pelo endotélio: interleucinas, fatores de crescimento, inibidores de plasminogênio e fator de Von Willebrand (Schieffer *et al.*, 1997).

Em situações fisiológicas, o endotélio desempenha papel protetor do vaso sanguíneo. Através de estímulo fisiológico como a força de arraste e o *shear stress* exercida pelo fluxo sanguíneo sobre as células endoteliais, há formação basal de NO mantendo o vaso sanguíneo num estado constante de vasodilatação (Reinhardt *et al.*, 1996), conforme pode ser visto na figura 2.

Considerando-se os principais agentes vasoativos, o NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, por ação de uma família de enzimas NO sintase (NOS). Três isoformas distintas da NOS têm sido identificadas, produtos de três genes diferentes. Estas isoformas receberam as seguintes nomenclaturas: nNOS (NOS-I), isoforma predominante em tecido neuronal; iNOS (NOS-II), isoforma induzível numa variedade de células e tecidos, como macrófagos, leucócitos polimorfonucleares, endotélio, músculo liso vascular, fígado e baço; e eNOS (NOS-III), a qual foi primeiramente encontrada na célula endotelial. A molécula do NO é um radical livre (pois apresenta um elétron desemparelhado na última camada) em estado gasoso (Kojda *et al.*, 1999). O NO é livremente difusível e cruza membranas celulares, natureza esta que confere a esta molécula a capacidade de reagir com outros radicais livres ou com o oxigênio molecular (que é um di-radical). Dentre os produtos de oxidação do NO, o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) são os seus principais metabólitos fisiológicos em meio aquoso e podem ser mensurados como índices da produção de NO em um determinado sistema biológico (Fakuto & Wink, 1999; Augusto *et al.*, 2002).





**Figura 2.** Vaso sanguíneo com fatores relaxantes (EDRFs) e contráteis (EDCFs) derivados do endotélio. (Luz *et al.*, 2005)

O NO (derivado do endotélio) medeia ativamente muitas das funções protetoras exercidas pelo endotélio intacto e, em conjunto com a PGI<sub>2</sub>, o NO exerce potente efeito antiaterogênico e tromborresistente, prevenindo adesão e agregação plaquetárias (Zakhary *et al.*, 1996; Furchgott, 1988). Além disso, o NO também influencia a contratilidade do miocárdio (Brady *et al.*, 1993). Estudos *in vivo* têm demonstrado claramente que o NO e a ET, agindo em sentidos opostos, regulam o tônus vascular e a pressão arterial. Perda da integridade funcional do endotélio ou disfunção endotelial, em que há desequilíbrio entre produção diminuída de NO e aumentada de ET<sub>1</sub>, parece estar associada com a maioria dos fatores de risco cardiovasculares, como a hipertensão arterial, hipercolesterolemia, diabetes, aterosclerose, menopausa, tabagismo e envelhecimento. Há aumento das respostas vasoconstritoras, proliferação e

migração das células do músculo liso vascular, adesão de plaquetas e monócitos e aumento na expressão de moléculas de adesão (Carvalho *et al.*, 1997; Sader *et al.*, 2001).

O alvo fisiológico do NO é a guanilato ciclase solúvel, um heterodímero que contém o grupo heme e que sintetiza guanosina monofosfato cíclico, o GMPc (McGuire *et al.*, 2001). A atividade basal da guanilato ciclase é baixa, mas quando o NO se liga à porção heme a atividade aumenta acima de 400 vezes. O aumento da concentração intracelular de GMPc estimula proteínas quinases dependentes de GMPc. Subsequentemente, três proteínas são fosforiladas (fosfolambam, IRAG-1,4,5 trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>), receptor associado a substrato quinase GMPc e canal de K<sup>+</sup>cálcio-dependente, resultando numa diminuída concentração de Ca<sup>2+</sup> e conseqüente vasodilatação (Gewaltig *et al.*, 2002).

A prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) pode ser considerada como um EDRF devido à sua atividade vasodilatadora e sua origem primariamente endotelial (Moro *et al.*, 1996). A via da PGI<sub>2</sub>, sintetizada pela ciclooxygenase, ativa a adenil ciclase e aumenta a concentração de Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPc), o que leva à redução da concentração de cálcio intracelular nas células dos músculos lisos vasculares (Girardi *et al.*, 2006). O efeito relaxante da PGI<sub>2</sub> é aditivo ao do NO. No que diz respeito à agregação plaquetária, o NO e a prostaciclina são

sinérgicos e, quando administrados concomitantemente, causam inibição intensa da agregação plaquetária (Radomski *et al.*, 1993).

Em vários vasos sanguíneos, o relaxamento dependente do endotélio pode ser acompanhado por hiperpolarização das células do músculo liso dependente do endotélio (Nigro *et al.*, 1997). Este relaxamento dependente do endotélio e hiperpolarização podem ser parcial ou totalmente resistentes à inibidores da ciclooxigenase e de óxido nítrico sintases (Gathwaite *et al.*, 1988; Nakaki *et al.*, 1990) e podem ocorrer sem aumento dos níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos nas células do músculo liso (Moncada *et al.*, 1986). Portanto, a existência de uma via adicional que envolve hiperpolarização do músculo liso foi sugerida e atribuída a um fator endotelial não caracterizado chamado fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Mombouli *et al.*, 1992). Em geral, a hiperpolarização do músculo liso produz relaxamento por reduzir tanto a probabilidade de abertura de canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem quanto a taxa de renovação de fosfatidilinositol intracelular, diminuindo assim a concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ . A contribuição das respostas mediadas por EDHF, como um mecanismo de relaxamento dependente do endotélio, aumenta com a diminuição do calibre do vaso, exceto em leitos coronarianos e renais nos quais o EDHF tem um papel importante mesmo em artérias de condução (Fortes *et al.*, 1992; Radomski *et al.*, 1987). Em camundongos, as respostas mediadas por EDHF em vasos de resistência são tão importantes quanto as respostas induzidas por NO-vasodilatador derivado do endotélio, pois nem a deleção do gene que codifica a eNOS nem a inibição de NOS atenuam a resposta

vasodilatadora induzidas por agonistas tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Brandes *et al.*, 2000; Weiner *et al.*, 1994).

Em suma, diversos mecanismos vasoativos dependentes do endotélio representam um sistema orquestrado que efetua uma regulação de primeira ordem no tônus vasomotor de artérias de condutância, bem como na modulação do fluxo em vasos de resistência e ajustes distributivos entre diferentes camadas do órgão. Estes efeitos têm papel fisiológico essencial e participam da gênese e das adaptações a condições patológicas vasculares constituindo-se, nesses casos, em alvos primários de intervenções terapêuticas (Luz *et al.*, 2005). Em contrapartida, a disfunção endotelial parece desempenhar um papel patogênico no desenvolvimento inicial da aterosclerose (Ross, 1993; Choen, 1995) e das síndromes coronarianas instáveis (Okumura *et al.*, 1992), sendo associada aos fatores de risco para a doença aterosclerótica (Clarkson *et al.*, 1997; Woo *et al.*, 1997), estando presente mesmo antes de o comprometimento vascular ser evidente (Caramori & Zago, 2000).

A disfunção endotelial pode ser determinada pela redução da disponibilidade de vasodilatadores derivados do endotélio, por um aumento local na concentração de substâncias antagonistas destes vasodilatadores ou por uma associação desses dois fatores (Caramori & Zago, 2000). Redução na síntese ou na disponibilidade local de NO tem sido freqüentemente imputada como a principal responsável pela disfunção endotelial em diversas situações clínicas. A

liberação de NO derivado do endotélio está diminuída em indivíduos com fatores de risco para doença arterial coronariana (Celermajer *et al.*, 1992; Vita *et al.*, 1990; Sorensen *et al.*, 1994), assim como em pacientes com aterosclerose coronariana estabelecida (Ludmer *et al.*, 1986; Vita *et al.*, 1989). Uma redução na disponibilidade vascular de NO determina prejuízo na vasodilatação endotélio-dependente, aumento da agregação plaquetária e da adesão de monócitos ao endotélio e influencia a proliferação de células musculares lisas vasculares, provavelmente contribuindo para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose. Em modelos animais de hipercolesterolemia, como o camundongo *knockout* para a ApoE, a inibição farmacológica da óxido nítrico sintase acelera a aterosclerose (Cayatte *et al.*, 1994), enquanto que um aumento na disponibilidade de NO reduz a progressão da doença com possível indução de regressão (Cooke *et al.*, 1992; De Meyer *et al.*, 1995).

A inativação do óxido nítrico endotelial por radicais livres derivados de oxigênio pode ser um importante fator no desenvolvimento da disfunção endotelial (Gryglewski *et al.*, 1986). Estudos experimentais sugerem que os agentes antioxidantes possam restabelecer a função endotelial (Keaney *et al.*, 1993; Keaney *et al.*, 1995). A vitamina C, potente antioxidante *in vivo* e *in vitro* que inibe a peroxidação de lipídios mediada pelo ânion superóxido (Frei, 1994), melhora a função endotelial da artéria braquial em pacientes com doença arterial coronariana (Levine *et al.*, 1996), com *diabetes mellitus* (Ting *et al.*, 1997) e em tabagistas (Heitzer *et al.*, 1996).

Um aumento nos inibidores endógenos da síntese de NO também pode estar envolvido na gênese da disfunção endotelial. Na insuficiência renal, os níveis plasmáticos de análogos metilados da arginina (dimetilarginina assimétrica) estão significativamente aumentados, podendo competir com a L-arginina como substrato na síntese de NO (Vallance *et al.*, 1992). Foi também demonstrado que a dimetilarginina assimétrica está elevada em indivíduos jovens com hipercolesterolemia e que este aumento é associado à disfunção vasomotora endotélio-dependente (Boger *et al.*, 1998).

Outro mecanismo de disfunção vasomotora endotelial que tem sido freqüentemente observado é o aumento de endotelina-1. Concentrações plasmáticas elevadas de ET<sub>1</sub> têm sido relatadas no infarto do miocárdio, no choque cardiogênico, na angina instável, na doença arterial coronariana em geral, na insuficiência cardíaca e na hipertensão essencial (Cernacek *et al.*, 1989; Shichiri *et al.*, 1990). Em estados de disfunção endotelial, como na aterosclerose, a ação da ET<sub>1</sub>, sem a oposição do NO, tende a promover vasoconstrição e proliferação de células musculares lisas vasculares (Lopez *et al.*, 1990).

#### 1.4. 17 $\beta$ -Estradiol

As doenças cardiovasculares (DCV) constituem, tanto em países desenvolvidos (Wenger *et al.*, 1993) quanto no Brasil (Mansur *et al.*, 2001), a principal causa de morbimortalidade em mulheres. Diversas evidências epidemiológicas sugerem que a privação estrogênica que acontece com o climatério, e ainda mais com a menopausa, aumenta o risco de DCV. Estas evidências apontam para a possível influência dos hormônios sexuais femininos no sistema vascular. Em mulheres na pré-menopausa, a doença coronária e as complicações gerais das DCV são extremamente raras, mesmo em grupos de alto risco. Depois da menopausa, este risco reduzido começa a desaparecer, de forma que existe um atraso na manifestação clínica de DCV, que acontece 10 a 15 anos mais tarde. O estudo de Framingham (Gordon *et al.*, 1978) demonstrou que a incidência de DCV era menor em mulheres na pré-menopausa quando comparada com homens da mesma idade, e que esta incidência tornava-se semelhante na sétima e oitava décadas de vida. Este aumento de incidência em mulheres era mais evidente quando a menopausa acontecia precocemente ou era induzida cirurgicamente. Outro estudo longitudinal demonstrou que quanto mais precocemente acontece a menopausa, maior a incidência de DCV (van der Shouw *et al.*, 1996). Na faixa etária de maior probabilidade de instalação da menopausa, isto é, por volta de 50 anos, diversas alterações ocorrem nos fatores de risco, criando um perfil que predispõe ao desenvolvimento da doença arterial coronária. Observa-se

elevação do colesterol total e LDL-colesterol, aumento dos níveis de fibrinogênio e fator VII plasmático e diminuição do potencial fibrinolítico (Gebara *et al.*, 1995).

As mulheres podem ser consideradas hemodinamicamente mais jovens do que homens da mesma idade, e esta diferença permanece até a idade da menopausa, quando o perfil hemodinâmico se aproxima ao masculino (van der Shouw *et al.*, 1996). A capacidade vasodilatadora, dependente ou não da presença do endotélio, é maior na pré-menopausa. Quando um grupo de mulheres na pré-menopausa é comparado com mulheres que foram submetidas à ovariectomia, observa-se que estas últimas apresentam disfunção na função vasodilatadora endotelial, que é revertida com a administração terapêutica de reposição hormonal (Stampfer *et al.*, 1991).

Apenas três estrogênios estão presentes em quantidades significativas no plasma da mulher:  $17\beta$ -Estradiol (estradiol), estrona e estriol. Na mulher “não-grávida” normal, os estrogênios são secretados em quantidades significativas apenas pelos ovários, embora quantidades mínimas também sejam secretadas pelos córtices adrenais. O principal estrogênio secretado pelos ovários é o estradiol, visto que sua potência estrogênica é em torno de 12 vezes a da estrona e 80 vezes a do estriol. O estradiol possui vários efeitos metabólicos e cardiovasculares importantes. Parece ser responsável, em parte, pela manutenção da estrutura e função normal da pele e dos vasos sanguíneos. Também diminui a taxa de reabsorção óssea ao promover a apoptose dos



osteoclastos e ao antagonizar os efeitos osteoclastogênicos e pró-osteoclásticos do hormônio paratireoidiano e da interleucina-6; estimula a produção de leptina pelo tecido adiposo e, em parte, é responsável pelos níveis mais elevados desse hormônio nas mulheres, em comparação com os homens (Guyton & Hall, 2006).

O estradiol, ainda, diminui os níveis plasmáticos de LDL, aumenta os níveis de HDL e de triglicérides. O significado clínico do aumento de triglicérides provavelmente é mínimo, uma vez que essa elevação ocorre à custa de partículas grandes, de baixa densidade, que são rapidamente retiradas de circulação e não se decompõem em outras partículas mais aterogênicas (Walsh *et al.*, 1991). Estudos demonstraram que a velocidade de oxidação das partículas de LDL diminui com a reposição hormonal com estrogênios (Sack *et al.*, 1994). O LDL moderadamente oxidado é importante fator aterogênico que também estimula a produção do inibidor do ativador do plasminogênio tecidual, modulador do sistema fibrinolítico endógeno. Dessa forma, o estradiol, além de reduzir os níveis de LDL, também impede sua oxidação, o que confere proteção contra o processo aterogênico.

Os receptores de estrogênio são encontrados nas células musculares lisas e no endotélio das artérias. Os receptores estrogênicos alfa e beta são considerados homólogos e, assim como todos os receptores de hormônios esteróides, alteram a expressão genética quando ativados (Kuiper *et al.*, 1996). Tais receptores podem ser ativados pela ligação de estrogênio ou por fatores de crescimento.

Quando ativados, os receptores de estrogênio atuam sobre o NO, moléculas de adesão de células vasculares lisas, células musculares lisas e macrófagos (Power *et al.*, 1991). Os efeitos dos receptores podem ser classificados em: rápidos (não-genômicos) ou tardios (genômicos). Os efeitos rápidos ou não-genômicos dos receptores de estrogênio atuam sobre os canais de íons e sobre o NO. Em concentrações fisiológicas, o estrogênio estimula a abertura dos canais de potássio ativados por cálcio, levando ao relaxamento das células musculares lisas e, conseqüentemente, à vasodilatação (Wellman *et al.*, 1996). Em culturas de células concentrações fisiológicas de estrogênio causam a liberação rápida de NO sem alterar a expressão genética (Wellman *et al.*, 1996, Caulin-Glaser *et al.*, 1997). Esse efeito rápido pode ser mediado por um receptor estrogênico não-identificado ou por um receptor conhecido, atuando por uma via desconhecida. As evidências sugerem que a liberação rápida de NO através de estímulo estrogênico possa ser feita por um receptor de estrogênio já conhecido. Essa afirmativa é reforçada pela observação de que a atividade da NOS sobre as células endoteliais pode ser inibida através de antagonistas específicos dos receptores de estrogênio. Em se tratando dos efeitos tardios ou genômicos, o estradiol aumenta a expressão genética de importantes enzimas vasodilatadoras, como a prostaciclina sintase e a óxido nítrico sintase. Inclusive alguns dos efeitos rápidos do estradiol podem ser devidos ao aumento em longo prazo dessas enzimas no tecido vascular.

Levando-se em consideração o que foi exposto ao longo deste tópico, conclui-se que o estradiol exerce importantes efeitos sobre a vasculatura, especialmente células endoteliais e musculares lisas, tendo impacto através da atuação em diversos mecanismos responsáveis pela homeostasia.

---

---

## ***Objetivos***

---

---

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

- Avaliar a função endotelial de vasos de resistência de camundongos normais (C57BL/6) e hipercolesterolêmicos (ApoE *knockout*) submetidos ou não à ovariectomia.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Em camundongos C57BL/6 e ApoE *knockout*:

- Mensurar os níveis de colesterol total e estradiol plasmático;
- Quantificar o peso do útero tanto dos animais ovariectomizados quanto dos seus respectivos controles;
- Avaliar a resposta vasoconstritora à norepinefrina;
- Avaliar o relaxamento vascular mediado pelo endotélio;
- Verificar como se encontra a função do músculo liso vascular.

***Metodologia***

### **3. Metodologia**

#### **3.1. Animais**

Os experimentos foram realizados em camundongos fêmeas da linhagem C57 BL/6 (C57) e ateroscleróticos por deficiência genética da apolipoproteína E (ApoE), entre 5 e 6 meses de idade, oriundos do Biotério do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram alimentados com dieta normal e água *ad libidum*. Os procedimentos realizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais Experimentais (CEUA) da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia (EMESCAM).

#### **3.2. Grupos Experimentais**

Os animais de ambas as linhagens foram divididos em dois grupos experimentais (controle e ovariectomizado), resultando em quatro grupos, a saber:

Grupo 1 – C57 controle (C57 Sham)

Grupo 2 – C57 ovariectomizado (C57 OVX)

Grupo 3 – ApoE controle (ApoE Sham)

Grupo 4 – ApoE ovariectomizado (ApoE OVX)

### **3.3. Ovariectomia**

Aos 5 meses de idade os animais dos grupos 2 (C57 OVX) e 4 (ApoE OVX) foram submetidos à cirurgia de retirada dos ovários (ovariectomia). Para tanto, os mesmos foram anestesiados com uma mistura de ketamina com xilazina (9:1, 100 mg/Kg, i.p.) e após incisão abdominal bilateral os ovários foram isolados do tecido conjuntivo circundante, pinçados e removidos (Dantas *et al.*, 1999). Finalmente, os animais foram suturados e recolocados em suas gaiolas.

Os animais dos grupos 1 (C57 Sham) e 3 (ApoE Sham) foram submetidos à cirurgia fictícia, que correspondia aos mesmos procedimentos acima descritos, exceto pela remoção dos ovários.

### **3.4. Peso do Útero**

O peso úmido e seco (em estufa, durante 24 horas) do útero dos animais estudados foi medido para a constatação da eficácia da cirurgia de ovariectomia.



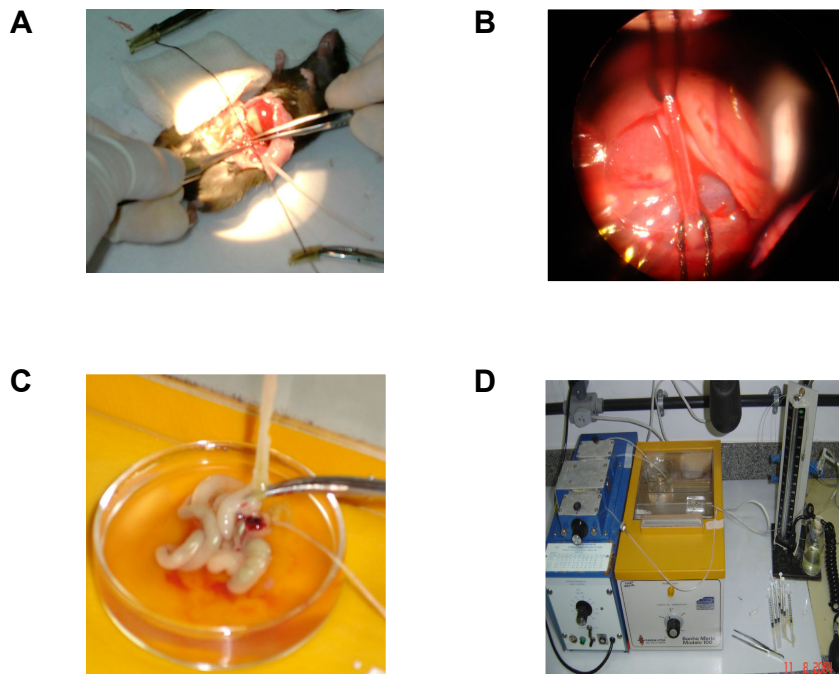
### **3.5. Determinação dos Níveis de Estradiol e Colesterol Plasmáticos**

Amostras de sangue foram coletadas do plexo retro-orbital dos animais anestesiados através de um capilar heparinizado. O nível de estradiol do plasma de cada animal foi obtido por método de quimioluminescência (Laboratório Marcos Daniel, Vitória, Espírito Santo, Brasil). Os níveis de colesterol total foram mensurados colorimetricamente usando kit comercial (Bioclin, São Paulo, Brasil). As amostras do plasma foram armazenadas à -20°C até a mensuração.

### **3.6. Preparação do Leito Arteriolar Mesentérico**

Trinta dias após a ovariectomia, os animais foram anestesiados (ketamina/xilazina, 91.0/9.1 mg/Kg, *i.p.*) e, estando os mesmos na fase estro do ciclo estral (para o caso dos sham-operados), a artéria mesentérica superior canulada (Figura 3A e 3B) e o mesentério isolado das alças intestinais (Figura 3C). O leito vascular mesentérico superior foi perfundido com solução de Krebs modificada (em mmol/L: NaCl 130; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4,7; NaHCO<sub>3</sub> 14,9; EDTA 0,026; glicose 11,1) a um fluxo constante de 2 mL/min com auxílio de uma bomba de perfusão peristáltica (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), conforme pode ser visto na figura 3D. A solução de Krebs modificada foi borbulhada com uma mistura carbogênica na proporção de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> e mantida à temperatura constante de

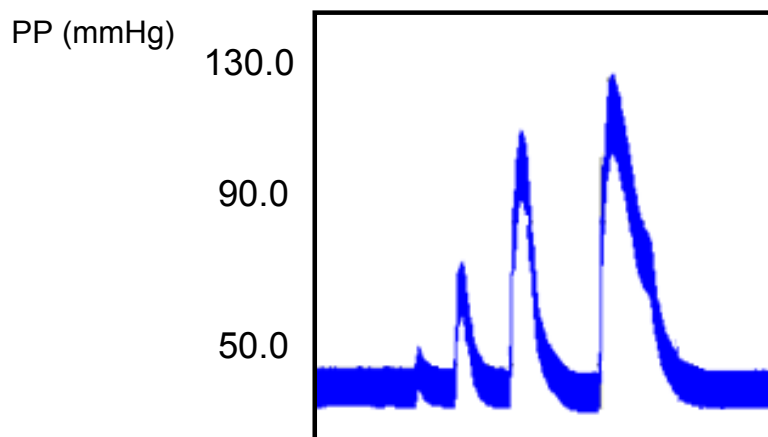
37°C, utilizando-se um banho-maria (FANEM LTDA, Brasil). As alterações na pressão de perfusão foram detectadas por transdutor de pressão (Cobe Laboratories, Lakewood, CO, USA) conectado a um amplificador de pressão e registradas por um sistema de aquisição de dados (BioPac Systems, Holliston, MA, USA).



**Figura 3.** Em (A) e (B), canulação da artéria mesentérica superior, em (C) isolamento do mesentério das alças intestinais e em (D) bomba de perfusão e banho-maria.

### 3.7. Curvas Concentração-Efeito

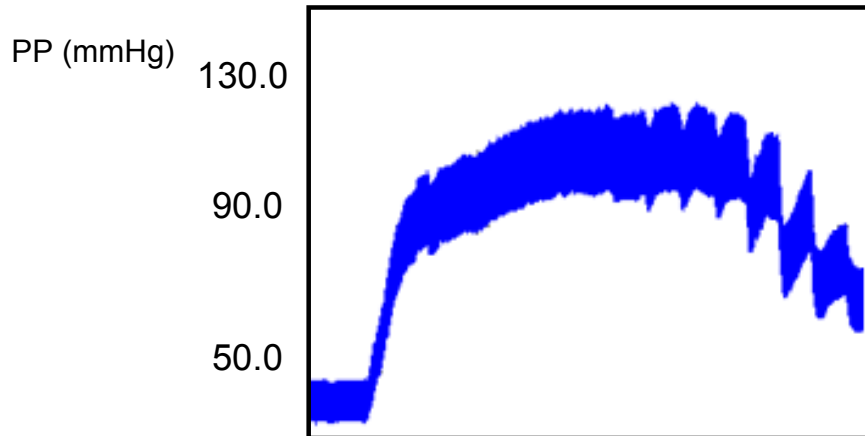
Curvas concentração-efeito (CCE) foram realizadas no leito arteriolar mesentérico após período de estabilização (30 minutos). Primeiramente, o leito recebeu concentrações *in bolus* sequenciais e crescentes do agente vasoconstritor norepinefrina (NE, Sigma Chemical Co. Saint Luis, MO, USA,  $10^{-9}$  a  $2 \times 10^{-3}$  mol/L). A figura 4 a seguir mostra um registro típico de uma CCE à norepinefrina.



**Figura 4.** Ilustração de curva concentração-efeito à norepinefrina em animal do grupo C57 Sham.

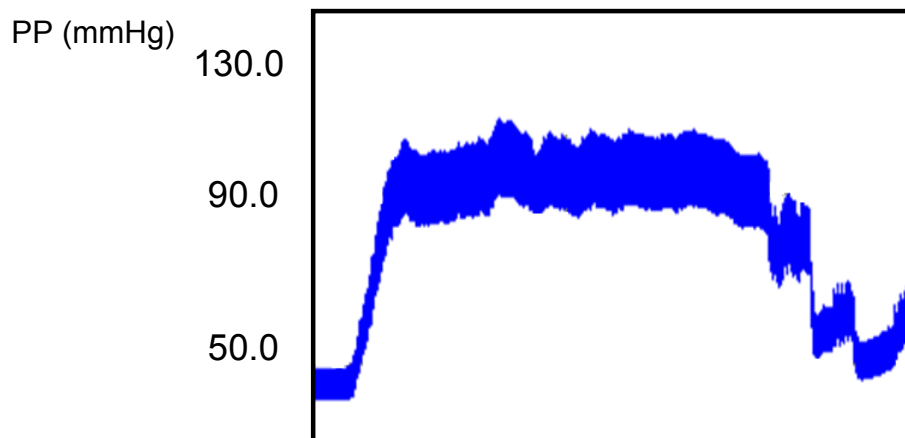
Ao fim desta CCE foi realizado um novo período de estabilização (30 minutos) seguido por pré-contração induzida por NE diluída em Krebs ( $5 \times 10^{-6}$  M). Foram realizadas então injeções *in bolus* do vasodilatador dependente do endotélio acetilcolina (ACh, Sigma,  $10^{-10}$  a  $10^{-3}$  mol/L), a fim de avaliar a função endotelial

dos animais. A seguir (figura 5) pode-se observar um registro típico de uma curva concentração efeito à acetilcolina.



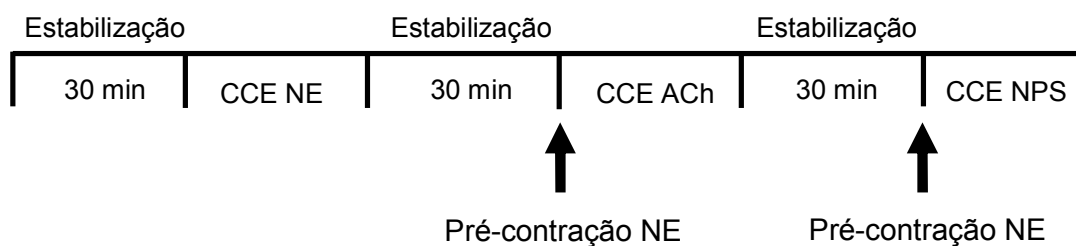
**Figura 5.** Ilustração de curva concentração-efeito à acetilcolina em animal do grupo C57 OVX.

Após novo período de estabilização com Krebs puro, foi realizada uma nova pré-contracção para o estudo da função do músculo liso vascular através de injeções *in bolus* de nitroprussiato de sódio (NPS, Sigma,  $10^{-9}$  a  $10^{-3}$  mol/L). Na figura 6 pode-se observar um registro típico de uma curva concentração efeito a este vasodilatador.



**Figura 6.** Ilustração de curva concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio em animal do grupo ApoE Sham.

O esquema representado na Figura 7 resume o protocolo de estudo da reatividade vascular do leito mesentérico através do uso dos três agentes vasoativos, conforme descrito.



**Figura 7.** Esquema representativo do protocolo de reatividade vascular realizado no presente estudo.

Os dados foram avaliados através das variações absolutas na pressão de perfusão para a CCE à NE e das variações percentuais na pressão de perfusão para as CCE à ACh e ao NPS.

### **3.8. Análise Estatística**

Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Para análise estatística foi realizada análise de variância (ANOVA) de 1 e 2 vias, seguidas pelo teste *post hoc* de Tukey/Kramer. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando  $*p < 0,05$  e  $**p < 0,01$ .



## ***Resultados***



## 4. Resultados

### 4.1. Peso do Útero

O peso corporal, o peso do útero e a relação peso do útero/ peso corporal estão sumarizados na tabela 1. Trinta dias após a ovariectomia, o peso corporal não foi alterado, porém o peso uterino foi significativamente menor nos animais dos grupos ovariectomizados, sem diferenças entre as linhagens C57 e ApoE. Conseqüentemente, a relação peso do útero/peso corporal foi diminuída em cerca de 80% nos grupos OVX quando comparados ao respectivo grupo Sham.

**Tabela 1.** Peso corporal, peso do útero e relação peso útero/peso corporal dos grupos de animais C57 e ApoE.

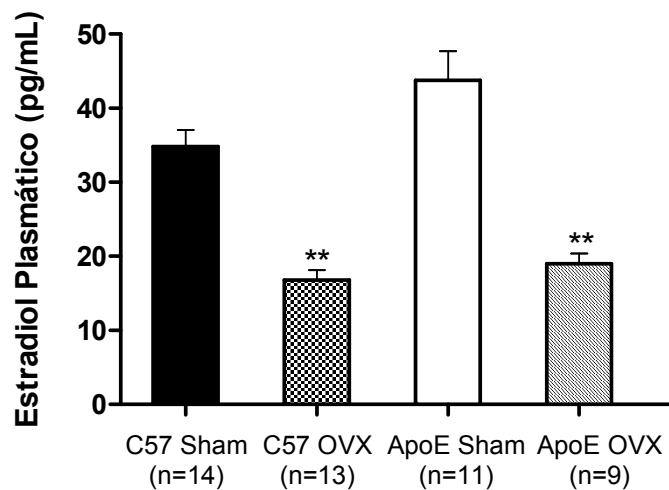
Parâmetros	C57		ApoE	
	Sham	OVX	Sham	OVX
Peso corporal (g)	25,9±0,5 (n=22)	26,8±0,6 (n=22)	26,3±0,6 (n=12)	25,5±0,7 (n=12)
Peso útero (mg)	30,3±1,8 (n=22)	5,4±0,7** (n=22)	36,2±1,6 (n=12)	5,9±1,3†† (n=12)
Peso útero/peso corporal (mg/g)	1,18±0,10 (n=22)	0,20±0,02** (n=22)	1,38±0,07 (n=12)	0,23±0,05†† (n=12)

Os valores estão expressos como média±EPM do número de animais indicado em parênteses. \*\*p<0,01 vs. C57 Sham; ††p<0,01 vs. ApoE Sham



## 4.2. Estradiol Plasmático

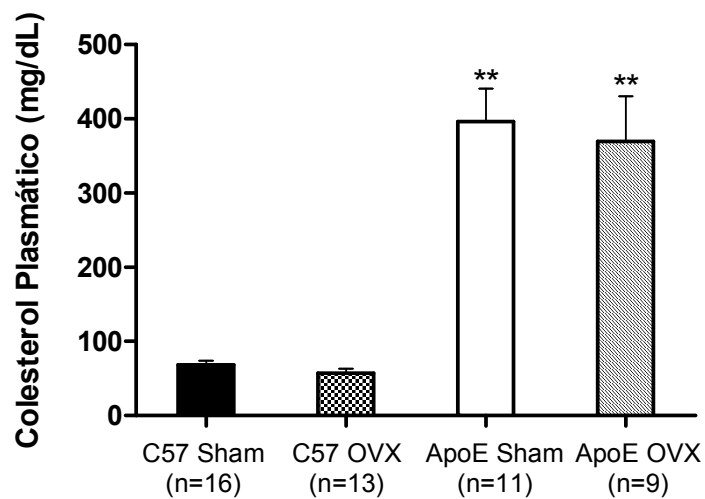
O sucesso da cirurgia de ovariectomia foi também confirmado pela análise bioquímica dos níveis de  $17\beta$ -estradiol plasmático, que mostrou ser significativamente menor nos grupos OVX (2-vezes,  $p < 0,01$ ) tanto nos animais C57 (Sham:  $34,8 \pm 2,3$  vs. OVX:  $16,8 \pm 1,4^{**}$  pg/mL) quanto nos ApoE (Sham:  $43,8 \pm 4,0$  vs. OVX:  $18,9 \pm 1,4^{**}$  pg/mL). Este resultado pode ser observado na Figura 8.



**Figura 8.** Níveis de estradiol plasmático nos quatro grupos estudados, em pg/mL.  $^{**}p < 0,01$  vs. grupo Sham.

### 4.3. Colesterol Plasmático Total

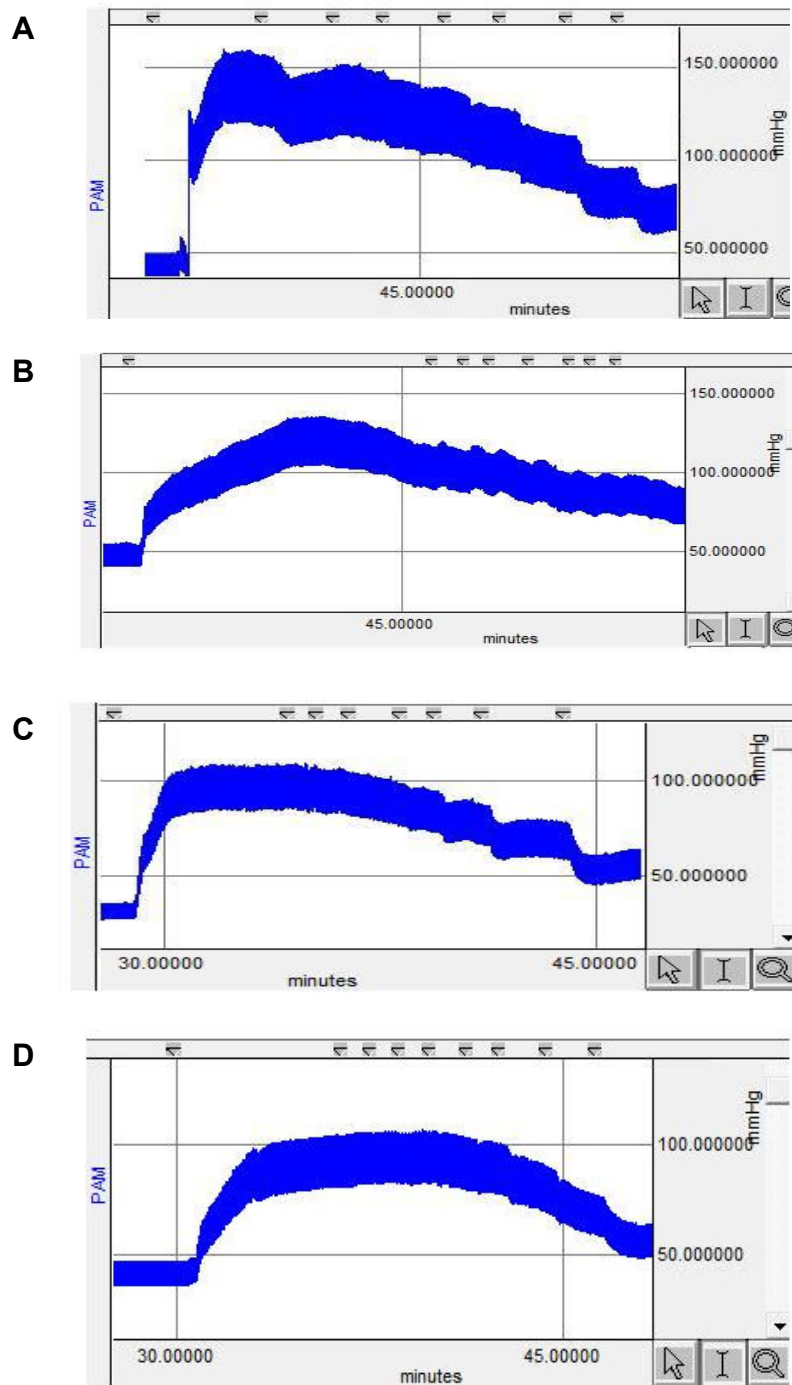
A Figura 9 mostra os valores de colesterol plasmático dos grupos comparados. Como esperado, os níveis de colesterol plasmático foram significativamente maiores (6,5-vezes) nos camundongos ApoE do que nos C57. Entretanto, a ovariectomia não alterou este perfil em ambas as linhagens.



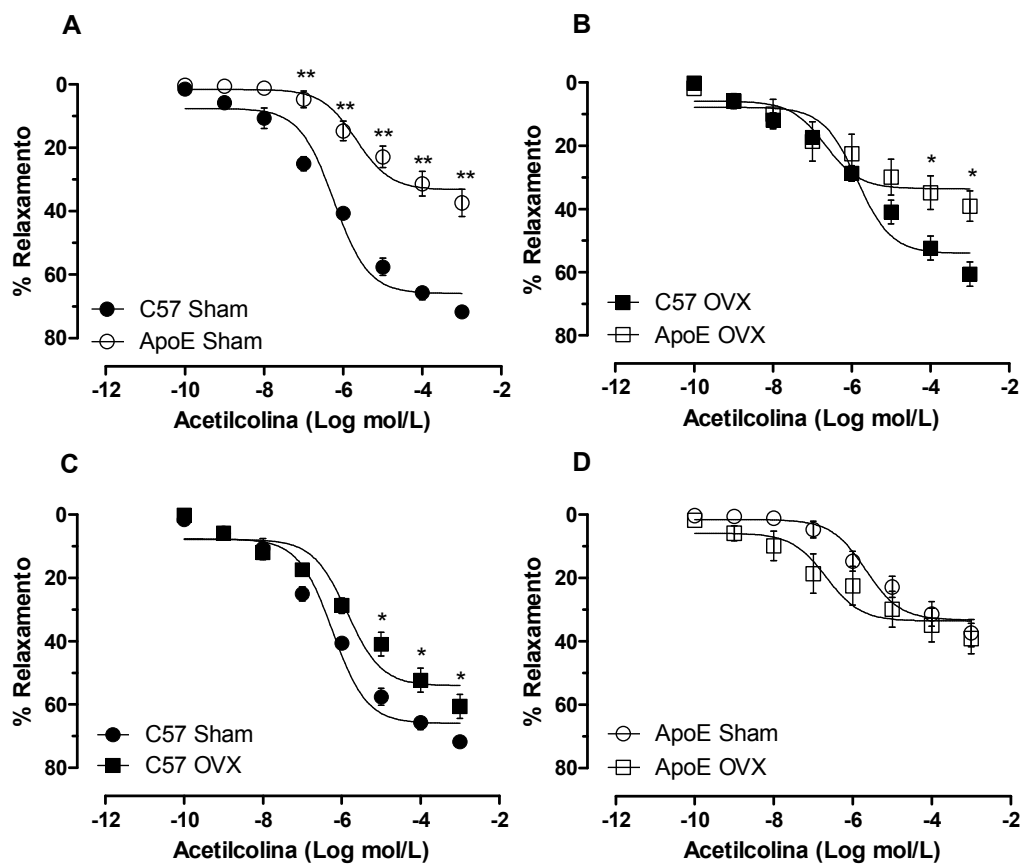
**Figura 9.** Níveis de colesterol plasmático total nos diferentes grupos estudados, em mg/dL. Os valores indicam média±EPM. \*\*p<0,01 vs. o respectivo grupo C57.

#### 4.4. Curvas Concentração-Efeito

A vasodilatação endotélio-dependente do leito arteriolar mesentérico isolado em resposta à ACh está mostrada nas figuras 10 e 11, em que estão representados registros típicos e as curvas concentração-efeito nos quatro grupos de animais estudados, respectivamente. A resposta vascular à ACh foi significativamente reduzida nos animais ApoE quando comparados aos C57, como indicado pela resposta máxima ( $37 \pm 4\%$  vs.  $72 \pm 1\%$ ,  $p < 0,01$ ) e pelo  $\text{LogEC}_{50}$  ( $5,67 \pm 0,18$  vs.  $6,23 \pm 0,09$  mol/L,  $p < 0,05$ , figura 11A). A ovariectomia causou um prejuízo significativo no relaxamento induzido pela ACh no grupo C57 (figura 11C) mas não piorou o estado deficiente de relaxamento dos animais ApoE (figura 11D). Conseqüentemente, mesmo após a ovariectomia, o relaxamento induzido pela ACh ainda estava significativamente diminuído nos camundongos ApoE comparados aos C57 (resposta máxima:  $39 \pm 5\%$  vs.  $61 \pm 4\%$ ,  $p < 0,01$ , figura 11B).

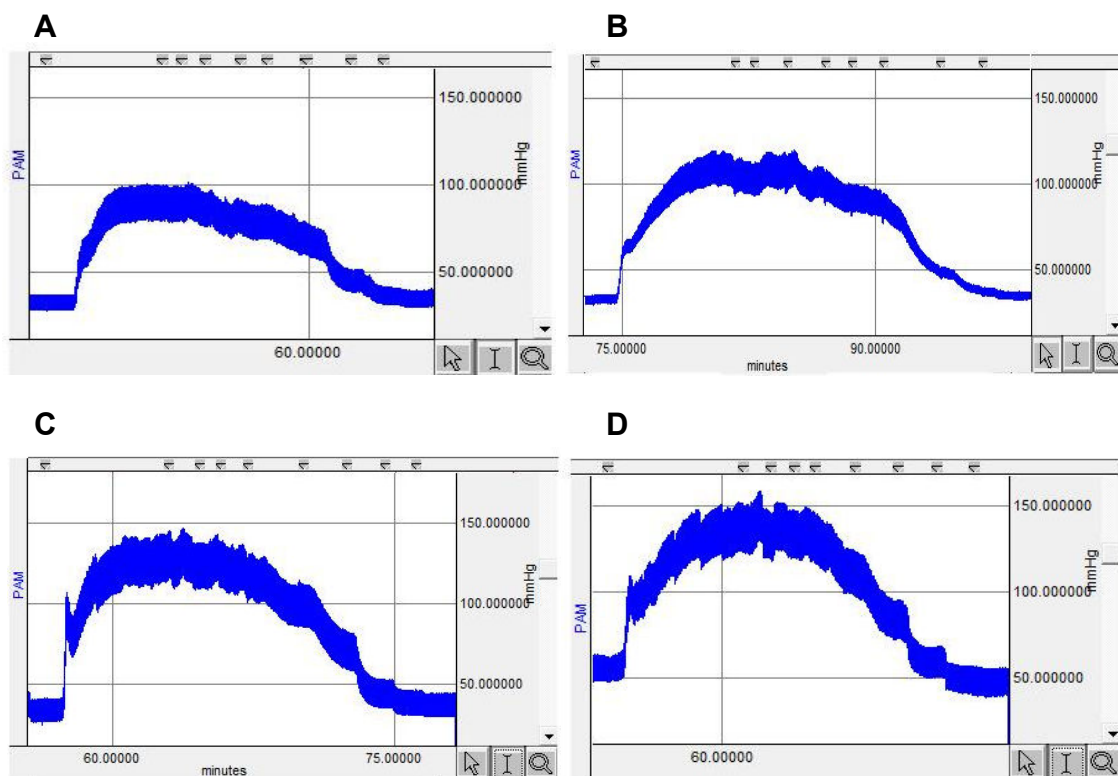


**Figura 10.** Registros típicos do vasorelaxamento endotélio-dependente em resposta às concentrações crescentes de acetilcolina em artérias mesentéricas de camundongos C57 Sham (A), ApoE Sham (B), C57 OVX (C) e ApoE OVX (D) após pré-contração com norepinefrina.

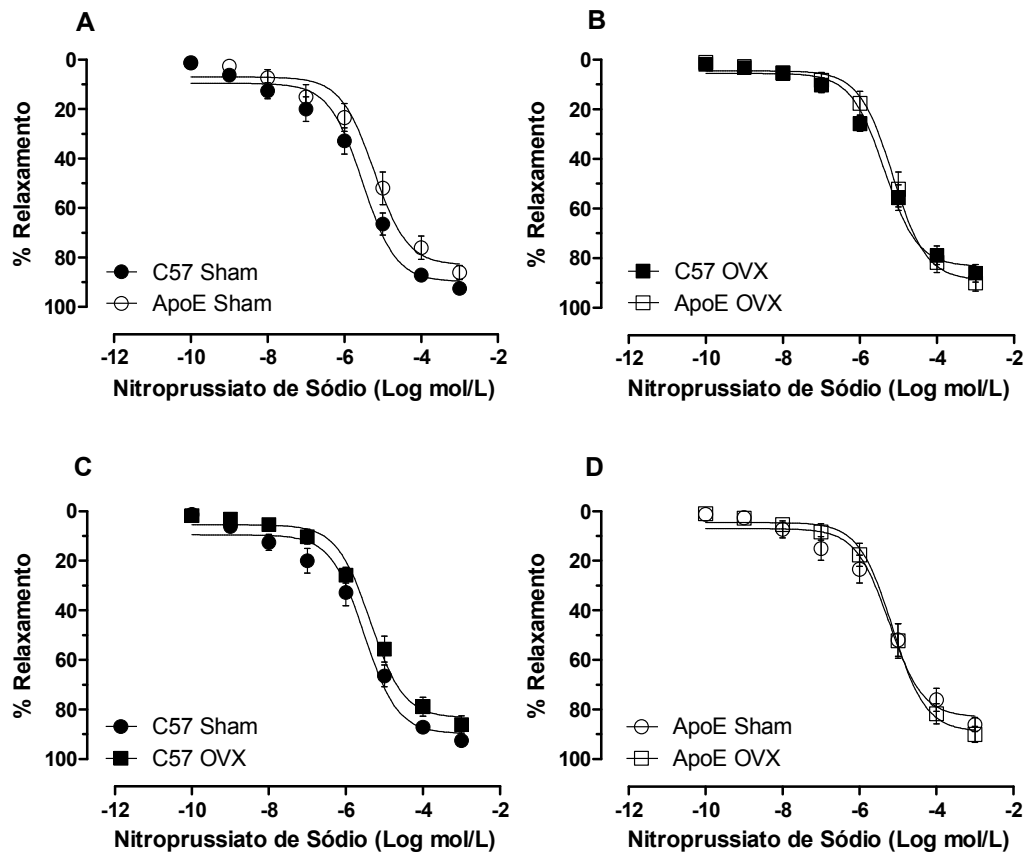


**Figura 11.** Relaxamento endotélio-dependente à acetilcolina em artérias mesentéricas de camundongos C57 e ApoE 30 dias após cirurgia de ovariectomia (OVX) ou controle (Sham). As respostas estão expressas como porcentagem de relaxamento relativo à pré-contrações induzidas por NE. A: comparação entre C57 Sham e ApoE Sham. B: comparação entre C57 OVX e ApoE OVX. C and D: efeitos da ovariectomia no relaxamento induzido pela acetilcolina em camundongos C57 e ApoE, respectivamente. Os valores indicam média±EPM (n= 8 a 10 por grupo). \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. respectivo controle.

As figuras 12 e 13 resumam o relaxamento independente do endotélio do músculo liso vascular a um doador de óxido nítrico. As curvas concentração-efeito ao NPS dos camundongos ApoE foram estatisticamente similares às dos C57, tanto em animais intactos quanto em ovariectomizados.

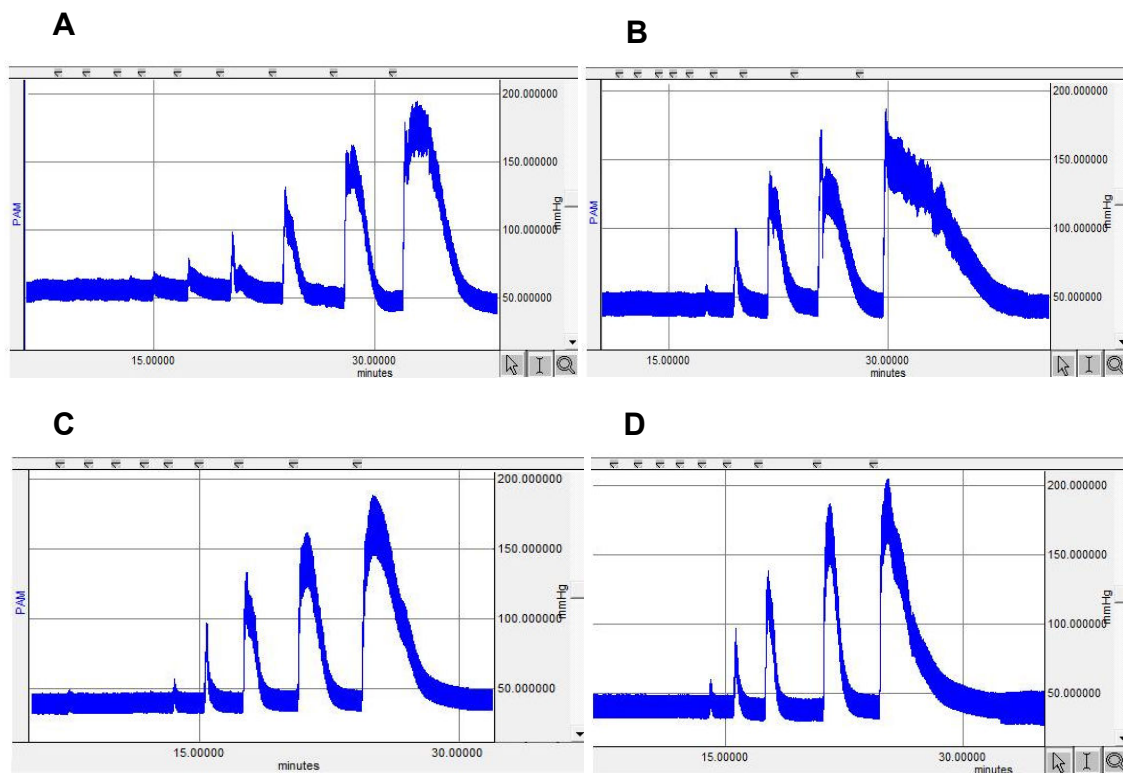


**Figura 12.** Registros típicos do relaxamento endotélio-independente ao doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio em artérias mesentéricas de camundongos C57 Sham (A), ApoE Sham (B), C57 OVX (C) e ApoE OVX (D) após pré-contração com norepinefrina.



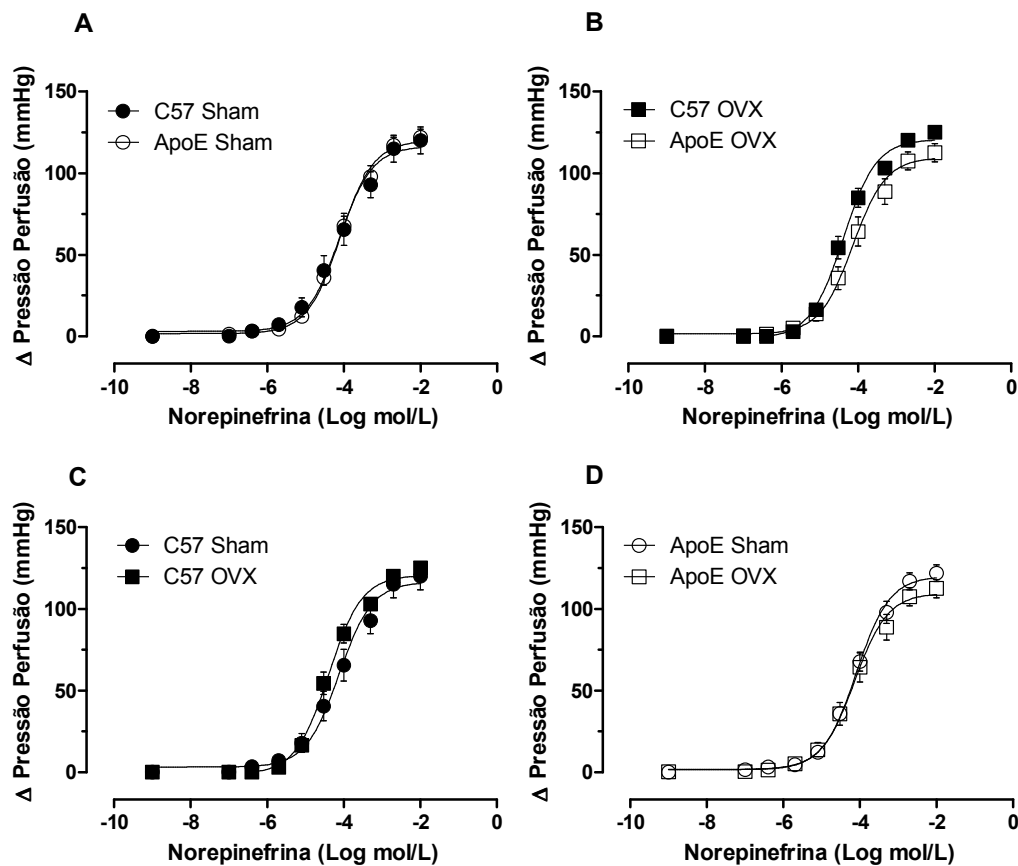
**Figura 13.** Relaxamento endotélio-independente ao doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio em artérias mesentéricas de camundongos C57 e ApoE 30 dias após cirurgia de ovariectomia (OVX) ou controle (Sham). As respostas estão expressas como porcentagem de relaxamento relativo à pré-contrações induzidas por NE. A: comparação entre C57 Sham e ApoE Sham. B: comparação entre C57 OVX e ApoE OVX. C and D: efeitos da ovariectomia no vasorelaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio em camundongos C57 e ApoE, respectivamente. Os valores indicam média±EPM (n= 8 a 10 por grupo).

Os registros típicos da contração induzida pela norepinefrina nos animais encontram-se representados na figura 14. A análise das curvas concentração-efeito à NE mostraram que a vasoconstrição não foi afetada pela nem hipercolesterolemia apresentada pelos animais ApoE nem tampouco pela ovariectomia (figura 15).



**Figura 14.** Registros típicos da contração concentração-dependente à norepinefrina em artérias mesentéricas de camundongos C57 Sham (A), ApoE Sham (B), C57 Sham (C) e ApoE OVX (D).





**Figura 15.** Contração concentração-dependente à norepinefrina em artérias mesentéricas de camundongos C57 e ApoE 30 dias após cirurgia de ovariectomia (OVX) ou controle (Sham). A: comparação entre C57 Sham e ApoE Sham. B: comparação entre C57 OVX e ApoE OVX. C: efeitos da ovariectomia na reatividade vascular à norepinefrina em camundongos C57. D: efeitos da ovariectomia na reatividade vascular à norepinefrina em camundongos ApoE. Os valores indicam média±EPM (n= 8 a 10 por grupo), e as contrações estão expressas como aumentos na pressão de perfusão (mmHg).



***Discussão***



## 5. Discussão

O presente estudo é o primeiro a mostrar um prejuízo da função endotelial em vasos de resistência de camundongos espontaneamente ateroscleróticos (com deficiência genética da apolipoproteína E) fêmeas comparados com camundongos fêmeas normais (C57BL/6). A disfunção endotelial foi tão marcante que a ovariectomia, que prejudicou a função endotelial dos animais C57, não causou dano adicional aos ApoE.

Um dos marcos da aterosclerose em humanos é a disfunção endotelial, que está presente mesmo antes da existência de mudanças estruturais na vasculatura (Ross, 1993), fato este que se baseia tanto em estudos realizados em seres humanos (Luscher, 1990; Somers *et al.*, 2000; Fujii *et al.*, 1992) quanto em modelos experimentais de aterosclerose acelerada por dieta enriquecida com colesterol (Villeneuve *et al.*, 2003; d'Uscio *et al.*, 2002; d'Uscio *et al.*, 2001; Verbeuren *et al.*, 1986). Conforme ressaltado previamente, o camundongo ApoE *knockout* é considerado um modelo murino de grande importância para o estudo da aterosclerose devido ao desenvolvimento de lesões arteriais espontâneas (Piedrahita *et al.*, 1992; Plump *et al.*, 1992). Os camundongos ApoE machos geralmente não apresentam alteração de função endotelial quando submetidos à dieta normal (Arruda *et al.*, 2005; Wölfle & Wit, 2005), sendo que disfunção endotelial é observada somente sob dieta hiperlipidêmica (d'Uscio *et al.*, 2002). Em contraste, tem sido observado que vasos de condutância de camundongos

ApoE fêmeas apresentam disfunção endotelial mesmo sob dieta normal (Niebauer *et al.*, 1999). O presente trabalho mostra que vasos de resistência de camundongos ApoE fêmeas alimentados com dieta normal também apresentam disfunção endotelial, como indicado pelo marcante decréscimo do vasorelaxamento dependente do endotélio ACh-induzido. A acetilcolina liga-se ao receptor muscarínico e facilita a entrada de cálcio no endotélio intacto, e o aumento intracelular deste íon promove a ativação da eNOS levando, conseqüentemente, ao relaxamento do vaso mediado pelo óxido nítrico (Luz *et al.*, 2005) . Sendo a vasodilatação induzida pela acetilcolina dependente da presença e da integridade do endotélio, a mesma funciona como um marcador da função endotelial. Considerando o NO como o principal mediador dessa vasodilatação, a diminuição da resposta à ACh observada no leito arteriolar mesentérico isolado de camundongos ApoE fêmeas poderia ser decorrente de alterações na resposta do músculo liso vascular ao NO. Contudo, o prejuízo do vasorelaxamento parece não envolver o músculo liso vascular, visto que a vasodilatação independente do endotélio ao doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio (NPS) permaneceu preservada em camundongos fêmeas ApoE-deficientes. As ações clínicas de nitrovasodilatadores são conhecidas como resultantes de sua capacidade de liberar NO, portanto o termo “doadores de NO” tem sido adotado para esta classe de drogas, que inclui o trinitrato de glicerila (TNG) e o NPS, dentre outras (Feelisch & Stamler, 1996). Os nitrovasodilatadores exercem efeitos *in vivo* principalmente por diminuírem a resistência vascular devido ao aumento dos níveis de GMPc circulantes. Por

isso, os inibidores da fosfodiesterase potencializam esse efeito hipotensivo (Pedro *et al.*, 1998). Semelhantemente, os efeitos vasodilatador e hipotensivo dos agonistas colinérgicos muscarínicos estão associados com o aumento de GMPc circulante (Ignarro *et al.*, 2001) e são em grande parte mediados pelo óxido nítrico. Estas observações, bem como os efeitos hipotensivos *in vitro* de outros agentes vasodilatadores dependentes do endotélio, sugerem que não somente o NO basal, mas também o sintetizado no endotélio e induzido por drogas, pode diminuir a pressão arterial. As variações observadas nos diferentes leitos vasculares em resposta aos vasodilatadores que geram NO podem ser atribuídas às diferenças na distribuição dos receptores na superfície da célula endotelial (Umans *et al.*, 1990).

Por outro lado, a vasoconstrição NE-induzida, previamente reportada como exacerbada em camundongos ApoE machos (Arruda *et al.*, 2005), apresentou-se normal nas fêmeas ApoE. Esta observação corrobora o achado que mostra que a vasoconstrição induzida pela norepinefrina em anéis de aorta é normal em camundongos ApoE fêmeas tanto submetidos à dieta normal quanto à hiperlipidêmica (Deckert *et al.*, 1999).

O gênero é um potente modificador em uma série de doenças cardiovasculares (Leinwand, 2003). Ao contrário das fêmeas, os machos têm uma maior prevalência de doenças ateroscleróticas, tais como doença isquêmica do coração, acidente vascular cerebral e aneurisma aórtico (Rodin *et al.*, 2003;

Blanchard *et al.*, 2000). Em humanos, as mulheres têm expectativa de vida maior e o aparecimento de sintomas das doenças ateroscleróticas ocorre cerca de vinte anos mais tarde do que nos homens (Xavier, 2005). A doença cardiovascular é a principal causa de mortalidade em mulheres na pós-menopausa, sendo que a disparidade entre a sua incidência entre mulheres na pré e pós-menopausa tem sido atribuída a ações do estrogênio endógeno sobre o sistema cardiovascular e, em especial, sobre a função do endotélio vascular (Maturana *et al.*, 2007). No presente estudo, investigamos o papel exercido pelos hormônios femininos endógenos na responsividade de vasos de resistência em camundongos normais e espontaneamente ateroscleróticos. A eficácia da cirurgia de ovariectomia foi confirmada pelo peso do útero e pelos níveis plasmáticos de  $17\beta$ -estradiol. Corroborando os achados de outros autores (Marsh *et al.*, 1997; Hodgkin *et al.*, 2001; Henriques *et al.*, 2004), os camundongos submetidos à retirada dos ovários apresentaram menores peso uterino e nível de  $17\beta$ -estradiol plasmático do que os animais não-castrados. Também observamos que os níveis de colesterol plasmático não foram afetados pela ovariectomia em ambas as linhagens de camundongos. Embora os animais ApoE apresentem hipercolesterolemia, a retirada dos ovários não alterou este perfil. Seria esperado que a ovariectomia promovesse alteração no perfil lipídico dos animais ovariectomizados em comparação com os que foram submetidos à cirurgia fictícia (Sham), uma vez que o estradiol altera o metabolismo lipídico via regulação da ligação de lipoproteínas e de sua depuração no fígado (Srivastava *et al.*, 1993). Este resultado foi também obtido em outros trabalhos que

utilizaram o camundongo ApoE como modelo experimental (Sato *et al.*, 2007; Schultz *et al.*, 2004). Bourassa *et al.* (1996) relataram que tanto em animais alimentados com dieta normal quanto com dieta hiperlipidêmica *Western type*, a ovariectomia não afetou os níveis de colesterol plasmático.

No presente estudo, observamos que a ovariectomia acarretou uma redução significativa do vasorelaxamento ACh-induzido em camundongos C57 fêmeas. Embora o prejuízo da função endotelial tenha sido visto em vasos de condutância de camundongos fêmeas castrados, este é o primeiro estudo que mostra esta disfunção em vasos de resistência de animais C57. A disfunção endotelial observada em camundongos fêmeas normocolesterolêmicos era esperada, visto que já foi mostrado que a terapia estrogênica exerce efeitos diretos na função endotelial, como promovendo aumento da produção de NO através de mecanismo eNOS-dependente (Weiner *et al.*, 1994) e elevando a síntese de prostaciclina através da ativação da ciclooxigenase-1 e da prostaciclina sintase (Jun *et al.*, 1998; Ospina *et al.*, 2002). Um dos possíveis mecanismos pelo qual o estrogênio pode influenciar o relaxamento vascular dependente do endotélio é por alteração na sensibilidade das células musculares lisas ao óxido nítrico. Em estudos feitos com cultura de células endoteliais, o estrogênio aumenta a transcrição e a atividade da óxido nítrico sintase. A presença de estrogênio em fêmeas é responsável por um aumento na liberação de NO, o que sugere também que a expressão do RNA mensageiro da

NOS das células endoteliais esteja aumentado na presença do estradiol (Darkow *et al.*, 1997).

Alguns estudos evidenciam a ação do estradiol sobre a resposta inflamatória envolvida na disfunção endotelial em modelos animais e humanos. O estradiol pode inibir ou estimular a expressão de IL-1 dependendo das condições, assim como estimular a expressão do fator de crescimento derivado das plaquetas (Michael *et al.*, 1997; Stock *et al.*, 1989). O estradiol é capaz de inibir, também, a expressão do TNF $\alpha$  e a expressão de IL-6 (Stock *et al.*, 1989). Observou-se que fatores de transcrição, como o fator nuclear Kappa B (NF $\kappa$ B), regulam a expressam de muitos genes, incluindo o da IL-1 e IL-6, que estão relacionados com a resposta inicial da resposta inflamatória. Estudo feito em macacos com dieta hiperlipidêmica mostrou que o estradiol conjugado inibe a ativação do NF $\kappa$ B no arco aórtico no estágio inicial da aterosclerose (Register *et al.*, 1995). Vários estudos têm mostrado que o estrogênio diminui os níveis de moléculas de adesão celular circulantes *in vivo*, contudo o possível mecanismo pelo qual os níveis destas moléculas são reduzidos ainda não está determinado. Têm-se sugerido três prováveis mecanismos para este efeito do estrogênio, que inclui: a *down regulation* da transcrição destas moléculas, a redução subsequente da expressão das mesmas na superfície endotelial e a consequente redução dos níveis circulantes das moléculas de adesão (Luz *et al.*, 2005).



O estradiol, ainda, acelera o crescimento de células endoteliais *in vivo* e *in vitro* (Spyridopoulos & Losordo, 1997). O rápido crescimento do endotélio induzido pelo estradiol após uma lesão vascular pode ser em parte devido ao aumento local da expressão dos fatores de crescimento do endotélio vascular. A precoce restauração do endotélio pelo estradiol pode contribuir para atenuar a resposta à agressão endotelial através do aumento da eficácia do NO, o qual pode inibir a proliferação de células musculares lisas. A confirmação da presença e da integridade funcional dos receptores de estrogênio em células musculares lisas vasculares de humanos (CMLVh) sugere que o efeito direto do estrogênio em artérias humanas é possível. O efeito inibitório do estradiol na atividade proliferativa das CMLVh em cultura é dose-dependente. Estudos com antagonistas dos receptores de estrogênio foram feitos para examinar a questão sobre se o efeito antiproliferativo do estrogênio sobre as CMLVh se dá por receptores de estrogênio. A maior evidência do papel funcional dos receptores de estrogênio sobre a biologia das CMLVh foi obtida pela observação da expressão de CMLVh em cultura com altos níveis de receptores de estrogênio, a qual mostrou uma diminuída atividade proliferativa (Spyridopoulos & Losordo, 1997). Diante do exposto nossos dados, evidenciando prejuízo na resposta vasodilatadora dependente do endotélio de camundongos ovariectomizados, corroboram a idéia de que os hormônios sexuais endógenos desempenham um papel importante na manutenção da função endotelial normal.

Os achados do presente estudo mostram, ainda, que a resposta vascular à NE foi não foi estatisticamente diferente nos camundongos C57 ovariectomizados comparados aos C57 Sham. Apesar de muitos trabalhos, feitos em ratos, demonstrarem um aumento da resposta vasoconstritora na ausência do estrogênio, esta resposta parece depender do tipo de leito vascular estudado e, principalmente, do modelo animal a ser utilizado. Estudo anterior realizado em anéis de aorta isolados de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) controles e ovariectomizados mostra que a vasoconstrição induzida pelo inibidor da óxido nítrico sintase N<sup>w</sup>-nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME) foi melhor nos animais controle do que nos OVX (Riveiro *et al.*, 2001). Por outro lado, estudos realizados em leito arteriolar mesentérico (Nevala *et al.*, 1996), em anéis de aorta torácica isolada (Zamorano *et al.*, 1995) e em anéis de arteríolas cerebrais (Thorin *et al.*, 2003) de ratos verificaram hiper-reatividade dos animais do grupo OVX em relação aos seus respectivos controles. A resposta final à NE deve depender, portanto, do tipo de leito vascular estudado e do tipo de prostanóide majoritariamente sintetizado neste local (Terrano *et al.*, 1983; Chardonnens *et al.*, 1989). Uma hipótese é a de que em animais ovariectomizados alguma alteração vascular deve afetar a biossíntese dos fatores relaxantes derivados da vasculatura, diminuindo a resposta vascular à NE.

Ao contrário dos machos, as fêmeas ApoE *Knockout* submetidas à dieta normal apresentaram disfunção endotelial nos vasos de resistência. Resultados similares foram observados por outros pesquisadores em vasos de condutância

de camundongos ApoE-deficientes (Niebauer *et al.*, 1999). Estas observações corroboram o achado de que fêmeas ApoE possuem maior área de lesão em comparação aos camundongos machos (Caligiuri *et al.*, 1999), o que parece ser relacionado ao efeito direto do estrogênio na ativação do sistema imune das fêmeas. No presente estudo, a ovariectomia de fêmeas ApoE não causou dano adicional à função endotelial dos vasos de resistência, provavelmente porque estes animais já apresentavam uma disfunção endotelial marcante. Embora haja evidências de que a produção aumentada de ânion superóxido (Jiang *et al.*, 2001; d'Uscio *et al.*, 2001) e a redução da atividade da eNOS (d'Uscio *et al.*, 2001) poderiam contribuir para a disfunção endotelial em camundongos ApoE, ainda não se encontra claro porque sob dieta normal esta disfunção está relacionada às fêmeas mas não aos machos.

De maneira similar aos camundongos C57, não foi observado nenhum efeito da ovariectomia sobre a vasoconstrição induzida pela norepinefrina em vasos de resistência de camundongos ApoE, corroborando o achado de que camundongos fêmeas *knockout* para o receptor de 17 $\beta$ -estradiol não apresentam mudança na resposta vasoconstritora NE-induzida (Douglas *et al.*, 2008).

### 5.1. Limitações/Perspectivas do Estudo

Uma das limitações do presente estudo é que não foram medidas a extensão das lesões ateroscleróticas do leito arteriolar mesentérico nem a produção de ânion superóxido nos camundongos hipercolesterolêmicos e/ou ovariectomizados. Ainda como limitação está o fato de não sabermos como se comportam os vasos de condutância em relação aos parâmetros estudados e de não ter sido feito tratamento dos animais com estradiol. Embora esteja estabelecido que o estradiol possa ser responsável pelo desenvolvimento de cânceres (Cummings *et al.*, 2000, Cauley *et al.*, 1999), pelo seu efeito protetor no sistema cardiovascular feminino o tratamento com estrogênio poderia promover melhora na função endotelial dos animais que apresentaram prejuízo da mesma.

As perspectivas futuras deste trabalho incluem, além do estudo em vasos de condutância e do tratamento com o 17 $\beta$ -estradiol, a investigação dos possíveis mecanismos envolvidos na disfunção endotelial presente nos animais, através do estudo das diversas vias que promovem a vasodilatação endotélio-dependente.

***Conclusões***

## **6. Conclusão**

Em suma, diante dos resultados expostos pode-se concluir que:

- A função endotelial dos vasos de resistência está prejudicada nos camundongos ApoE fêmeas;
- A ovariectomia causa disfunção endotelial em camundongos C57, mas não piora a marcante disfunção endotelial previamente induzida pela hipercolesterolemia em camundongos ApoE;
- A ovariectomia reduz significativamente os níveis de estradiol plasmático, mas não os de colesterol total de ambas as linhagens de animais.



***Referências Bibliográficas***

## 7. Referências Bibliográficas

Arnal J-F, Bayard F. Vasculoprotective effects of oestrogens. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28:1032-1034.

Arruda RMMP, Peotta VA, Meyrelles SS, Vasquez EC. Evaluation of vascular function in apolipoprotein E knockout mice with angiotensin-dependent renovascular hypertension. *Hypertension*. 2005;46:932-936.

Augusto O, Bonini MG, Amanso AM. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic Biol Med*. 2002;32:841-859.

Blanchard JF, Armenian HK, Friesen PP. Risk factors for abdominal aortic aneurysm: results of a case-control study. *Am J Epidemiol*. 2000;151:575-583.

Berliner JA, Navab M, Fogelman AM. Atherosclerosis: basic mechanisms, oxidation, inflammation and genetics. *Circulation*. 1995;91:2488-2496.

Bevilacqua MP. Endothelium-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:767-804.



Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): A novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998;98:1842-1847.

Bourassa PA, Milos PM, Gaynor BJ, Breslow JL, Aiello RJ. Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:10022–10027.

Brady AJ, Warren JB, Poole-Wilson PA. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol*. 1993;265:A176-182.

Brandes RP, Schmitz-Winnenthal FH, Feletou M. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild type and endothelial NO synthase Knock-out mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;57:9747-9752.

Caligiuri G, Nicoletti A, Zhou X, Törnberg I, Hansson GK. Effects of sex and age on atherosclerosis and autoimmunity in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis*. 1999;145:301-308.

Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res*. 1996;78:415-423.

Caramori PRA, Zago AJ. Disfunção endotelial e doença arterial coronariana. *Arq Bras Cardiol.* 2000;75(2):163-172.

Carr MC, Kim KH, Zambon A, Mitchell ES, Woods NF, Casazza CP, Purnell JQ, Hokanson JE, Brunzell JD, Schwartz RS. Changes in LDL density across the menopausal transition. *J Investig Med.* 2000;48:245-250.

Carvalho MHC, Fortes ZB, Nigro D. The role of thromboxane A2 in the altered microvascular reactivity in two-kidney, one clip hypertension. *Endothelium.* 1997;5:167-178.

Cauley JA, Lucas FL, Kuller LH, Stone K, Browner W, Cummings SR. Elevated serum estradiol and testosterone concentrations are associated with a high risk of breast cancer. *Ann Intern Med.* 1999;130:270-277.

Caulin-Glaser T, Garci-Gardeña G, Sarrel P.  $17\beta$ -Estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic  $Ca^{2+}$  mobilization. *Circ Res.* 1997;81:885-892.

Cayette AJ, Palacino JJ, Horten K. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Atheroscler Thromb.* 1994;14:753-759.

Cernacek P, Stewart DJ. Immunoreactive endothelin in human plasma: marked elevations in patients in cardiogenic shock. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;161:562-567.

Chardonens D, Lung U, Capponi AM, Valloton MB. Comparison of the effects of angiotensin II and vasopressin on cytosolic free calcium concentration, protein kinase C activity, and prostacyclin production in cultured rat aortic and mesenteric smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989;14:39-44.

Cooke JP, Singer AH, Tsao P. Anti-atherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest* 1992; 90: 1168-72.

Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.* 1992; 340:1111-1115.

Chae CU, Ridker PM, Manson JE. Postmenopausal hormone replacement therapy and cardiovascular disease. *Thromb Haemost.* 1997;78:770-780.

Choen R. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 1995;38:105-128.

Clarkson P, Celermajer DS, Powe AJ, Donald AE, Henry RM, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease. *Circulation*. 1997;96:3378-33783.

Cummings SH, Duong T, Kenyon E. Serum estradiol level and risk of breast cancer during treatment with raloxifene. *JAMA*. 2002;287:216-220.

Dantas APV, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MHC. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999;34:914-919.

Darkow D, Lu L, White RE. Estrogen relaxation of coronary artery smooth muscle is mediate by NO and GMPc. *Am J Physiol*. 1997;272:2765-2773.

Deckert V, Lizard G, Duverger N, Athias A, Palleau V, Emmanuel F, Moisant M, Gambert P, Lallemand C, Lagrost L. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by high-fat feeding in apoE-deficient mice: toward normalization by human apoA-I expression. *Circulation*. 1999;100:1230-1235.

De Meyer GRY, Bult H, Üstünes L. Effect of nitric oxide donors on neointima formation and vascular reactivity in the collared carotid artery rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;26:272-279.

Diedrich DA, Yang Z, Buhler FR. Impaired endothelium-dependent relaxations in hypertensive small arteries involve the cyclooxygenase pathway. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)*. 1990;258:H445-451.

Douglas G, Cruz MN, Poston L, Gustafsson JA, Kublickiene K. Functional characterization and sex differences in small mesenteric arteries of the estrogen receptor- $\beta$  knockout mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294:112-120.

d'Uscio LV, Baker TA, Mantilla CB, Smith L, Weiler D, Sieck GC, Katusic ZS. Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1017-1022.

d'Uscio LV, Barton M, Shaw S, Lüscher TF. Chronic ET<sub>A</sub> receptor blockade prevents endothelial dysfunction of small arteries in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res*. 2002;53:487-495.

d'Uscio LV, Smith LA, Katusic ZS. Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxations in common carotid arteries of apolipoprotein e-deficient mice. *Stroke*. 2001;32:2658-2664.

Fakuto JM, Wink DA. Nitric oxid (NO): formation and biological roles in mammalian systems. *Met Ions Biol Syst.* 1999;36:547-595.

Feelisch M, Stamler JS. Em: Feelisch M, Stamler JS , eds. New York: Wiley e Sons,1996:71-115.

Fortes ZB, Costa SG, Nigro D. Effect of indomethacin on the microvessel reactivity of two-kidney, one clip hypertensive rats. *Arch Int Pharmacodyn.* 1992;316:75-89.

Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med.* 1994;97:5s-13s.

Fujii K, Tominaga M, Ohmori S. Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.* 1992;70:660-669.

Furchgott R, Zawadzki JVB. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-376.

Furchgott RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that acid activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In:

Vanhoutte PM, ed. *Vasodilation: vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium*. New York: Raven Press, 1988:401-414.

Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptor suggests role of an intercellular messenger in the brain. *Nature*. 1988;336:385-388.

Gebara OCE, Wajngarten M, Pereira-Barretto AC. Menopausa, terapêutica de reposição hormonal e doença arterial coronária. *Arq Bras Cardiol*. 1995;64:255-258.

Gervais M, Pons S, Nicoletti A, Cosson C, Giudicelli J-F, Richer C. Fluvastatin prevents renal dysfunction and vascular NO deficit in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:183-189.

Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovascular Research*. 2002;55:250-260.

Giannini SD. História Natural da Aterosclerose. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*. 2000;10:677-685.

Gimbrone Jr. MA. Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta-1-integrins and beta-2-integrins. *J Cell Biol.* 1994;125:1417-1427.

Gordon T, Kannel WB, Hjortland MC. Menopause and coronary heart disease. *Ann Intern Med.* 1978;89:157-161.

Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 1986; 320:454-456.

Heitzer T, Hanjörg J, Münzel T. Antioxidant Vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation.* 1996;94:6-9.

Henriques TA, Huang J, D'Souza SS, Daugherty A, Cassis LA. Orchidectomy, but not ovariectomy, regulates angiotensin II-induced vascular diseases in apolipoprotein E-deficient mice. *Endocrinology.* 2004;145:3866-3872.

He P, Curry FE. Differential actions of cAMP on endothelial  $[Ca^{+2}]$  and permeability in microvessels exposed to ATP. *Am J Physiol.* 1993;265:H1019-23.



Hodgin JB, Krege JH, Reddick RL, Korach KS, Smithies O, Maeda N. Estrogen receptor  $\alpha$  is a major mediator of  $17\beta$ -estradiol's atheroprotective effects on lesion size in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *J Clin Invest.* 2001;107:333-340.

Hofker MH, Vlijmen BJM, Havekes LM. Transgenic mouse models to study the role of ApoE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1998;137:1-11.

Ignarro LJ, Buga GM, Wei LH. Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:4202-4208.

Jawień J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol.* 2004;55:503-517.

Jiang F, Gibson AP, Dusting GJ. Endothelial dysfunction induced by oxidized low-density lipoproteins in isolated mouse aorta: a comparison with apolipoprotein-E deficient mice. *Eur J Pharmacol.* 2001;424:141-149.

Jover B, Herizi A, Ventre F. Sodium and angiotensin in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade. *Hypertension.* 1993;21:944-948.

Jun SS, Chen Z, Pace MC, Shaul PW. Estrogen upregulates cyclooxygenase-1 gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelium. *J Clin Invest.* 1998;102:176-183.

Keaney JF Jr, Gaziano JM, Xu A. Dietary antioxidants preserve endothelium-dependent vessel relaxation in cholesterol-fed rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:11880-11884.

Keaney JF Jr, Xu A, Cunningham DC, Jackson T, Frei B, Vita JA. Dietary probucol preserves endothelial function in cholesterol-fed rabbits by limiting vascularoxidative stress and superoxide production. *J Clin Invest.* 1995;95:2520-2529.

Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.* 1999;43:562-571.

Kuiper GGJM, Enmarck E, Pelto-Huikko M. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93:5925-5930.

Leinwand LA. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest.* 2003;112:302-307.

Levine GN, Frei B, Koulouris SN, Gerhard MD, Keaney JF Jr, Vita JA. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1996;93:1107-1113.

Lopez JA, Armstrong ML, Piegors DJ, Heistad DD. Vascular responses to endothelin-1 in atherosclerotic primates. *Arteriosclerosis*. 1990;10:1113-1118.

Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986;315:1046-1051.

Luscher TF. Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors. A new concept in hypertension? *Am J Physiol*. 1990;3:317-330.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-241.

Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP. *Endotélio e Doenças Cardiovasculares*. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

Luz PL, Uint L. *Endotélio na aterosclerose: interações celulares e vasomotricidade*. In: da Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP. *Endotélio e Doenças Cardiovasculares*. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

Mansur AP, Davarato D, Souza MFM. Tendência do risco de morte por doenças circulatórias no Brasil de 1979 a 1996. *Arq Bras Cardiol.* 2001;76:497-503.

Marsh MM, Walker VR, Curtiss LK, Banka CL. Protection against atherosclerosis by estrogen is independent of plasma cholesterol levels in LDL receptor deficient-mice. *J Lipid Res.* 1997;40:893-900.

Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics.* 2007;62:77-86.

McGuire JJ, Ding H, Triggle CR. Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Can J Physiol Pharmacol.* 2001;79(6):443-470.

Mendelsohn ME. Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000;74:337-343.

Michael RA, Thomas CR, Janice DW. Effects of estrogens and progestins on the pathogenesis of atherosclerosis in nonhuman primates. *Hormonal, metabolic and cellular influences on cardiovascular diseases in women.* Monograph Series. American Heart Association. 1997.

Molsiri K, Khemapech S, Patumraj S, Siriviriyakul P. Preventive mechanisms of genistein on coronary endothelial dysfunction in ovariectomized rats: an isolated arrested heart model. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2004;31:59-66.

Mombouli JV, Illians S, Nagao T. The potentiation of bradykinin-induced relaxations by perindoprilat canine coronary arteries involves both nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circ Res.* 1992;71:137-144.

Moncada S, Palmer RM, Gryglewski RJ. Mechanism of action of same inhibitor of endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:9164-9168.

Montenegro MR. Atherosclerosis morphology and pathogenesis. *Annu Rev Biomed Sci.* 1999;1:133-144.

Moro MA, Russell RJ, Celleck S. CGMP mediates the vascular and platelet action of nitric oxide: Confirmation of using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:1480-1485.

Nakaki T, Nakayama M, Kato R. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol.* 1990;189:347-353.

Nevala R, Paakari I, Tarkkila L, Vapatalo H. The effects of male gender and female sex hormone deficiency on the vascular responses of the rat in vitro. *Journal of Physiol Pharmacol.* 1996;47(3):425-432.

Niebauer J, Maxwell AJ, Lin PS, Tsao OS, Kosek J, Bernstein D, Cooke JP. Impaired aerobic capacity in hypercholesterolemic mice: partial reversal by exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1999;45:1346-1354.

Nigro D, Fortes ZB, Scivoletto R. Sex-related differences in the response of spontaneously hypertensive rats to angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Endothelium.* 1997;5:63-71.

Okumura K, Yasue H, Matsuyama K. Effect of acetylcholine on the highly stenotic coronary artery: difference between constrictor response of the infarct-related coronary artery and that of the noninfarct-related artery. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19:752-758.

Ospina JA, Krause DN, Duckles SP. 17 $\beta$ -Estradiol increases rat cerebrovascular prostacyclin synthesis by elevating cyclooxygenase-1 and prostacyclin synthase. *Stroke.* 2002;33:600-605.

Palmer, RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327:524-526.

Palmer, RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333:664-666.

Pedro MA, Augusto O, Barbeiro HV. Non-specific blockade of vascular free radical signals by methylated arginine analogues. *Braz J Med Biol Res*. 1998;31:749-755.

Piedrahita JA, Zhang SH, Hagan JR, Oliver PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene mediated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89: 4471–4475.

Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyf JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992;71:343–353.

Power RF, Mani SK, Codina J. Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science*. 1991;254:1636-1639.

Qiao X, McConnell KR, Khalil RA. Sex steroids and vascular responses in hypertension and aging. *Gen Med*. 2008;5:S46-S64.

Quyyumi AA. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med*. 1998;105:32S-39S.

Radomski MW, Palmer MRJ, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol*. 1987;92:181-187.

Radomski MW, Vallance P, Whitley G. Platelet adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive and cytokine induced nitric oxide. *Cardiovasc Res*. 1993;89:2070-2078.

Register TC, Bora TA, Adams MR. Estrogen inhibits activation of arterial NF $\kappa$ B transcription factor in early diet-induced atherogenesis. *Circulation*. 1995;92:1-628.

Reinhardt RR, Bondy CA. Differential cellular pattern of gene expression for two distinct cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases in developing and mature and rat brain. *Neuroscience*. 1996;72(2):567-578.



Riveiro A, Mosquera A, Calvo C, Alonso M, Marcia M, Cores M. Long-term effect of bilateral ovariectomy on endothelial function in aortic rings of spontaneously hypertensive rats: role of nitric oxide. *Gynecol Endocrinol*. 2001;15 (2):158-164.

Rodin MB, Daviglius ML, Wong GC, Liu K, Garside DB, Greenland P, Stamler J. Middle age cardiovascular risk factors and abdominal aortic aneurysm in older age. *Hypertension*. 2003;42:61–68.

Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115–126.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-809.

Sack MN, Rader DJ, O’Cannon III RO. Oestradiol and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet*. 1994;343:269-270.

Sader MA, Celermajer DS. Endothelial function, vascular reactivity and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiov Res*. 2001;53:597-604.

Sato M, Sato H, Ogawa A, Nomura R, Takashima S, Bang H, Mitsuoka H, Imaizumi K. Antiatherogenic effect of isoflavones in ovariectomized Apolipoprotein E-deficient mice. *J Agric Food Chem*. 2007;55:8967-8971

Schieffer B, Drexler H, Ling BN. G-protein coupled receptors control vascular smooth muscle cell proliferation via pp-60 c-src and p21ras. *Am J Physiol.* 1997;272:C2019-30.

Shichiri M, Hirata Y, Ando K. Plasma endothelin levels in hypertension and chronic renal failure. *Hypertension.* 1990;15:493-496.

Shultz JM, Zhu XD, Knopp RH, LeBoeuf RC, Rosenfeld ME. Norgestimate and medroxyprogesterone acetate do not attenuate the atheroprotective effects of 17 $\beta$  estradiol in ovariectomized, apolipoprotein E-deficient mice. *Fertility and Sterility.* 2004;82:1133-1139.

Somers MJ, Mavromatis K, Galis ZS. Vascular superoxide production and vasomotor function in hypertension induced by deoxycorticosterone acetate-salt. *Circulation.* 2000;101:1722-1728.

Sorensen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D, Hatcher G, Betteridge DJ, Deanfield JE. Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level. *J Clin Invest.* 1994; 93:50-55.

Spyridopoulos I, Losordo DW. Cardiovascular estrogen receptors regulate vascular smooth muscle cell proliferation. In: *Hormonal, metabolic and cellular influences on cardiovascular disease in women*. Armonk, New York: Futura. 1997;71-97.

Srivastava RA, Baumann D, Schonfeld G. In vivo regulation of lowdensity lipoprotein receptors by estrogen differs at the post-transcriptional level in rat and mouse. *Eur J Biochem*. 1993;216:527-38.

Stampfer MJ, Colditz GA. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev Med*. 1991;20:47-63.

Stary H, Chander A, Dismore R, Fuster V, Seymour G, Willian J. 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. *ArtherosclerThromb Vasc Biol*. 1995;15:1512-1531.

Stice JP, Eiserich JP, Knowlton AA. Role of aging *versus* the loss of estrogens in the reduction of in vascular function in female rats. *Endocrinology*. 2009;150:212-219.

Stocker R, and Keane, JF Jr. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84:1381–1478.

Stock JL, Coderre JÁ, McDonald B. Effect of estrogen in vitro and in vivo on spontaneous interleukin-1 release by monocytes from post-menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989;68:364-368.

Strong JP. Atherosclerotic lesions. Natural history, risk factors, and topography. *Arch Pathol Lab Med.* 1992;116:1268-1275.

Terragno A, Zamorano B, McGiff JC, Vio CP, Terragno NA. Correlation between arterial wall synthesis of prostaglandin and blood pressure in spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats. *Prostacyclin in Pregnancy.* 1983;109-113.

Thorin E, Pham-Dang M, Clemente R, Mercier I, Calderone A. Hyper-reactivity of cerebral arteries from ovariectomized rats: therapeutic benefit of tamoxifen. *Br J Pharmacol.* 2003;140(7):1187-92.

Ting H, Timimi F, Haley E, Roddy M, Ganz P, Creager M. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. *Circulation.* 1997;95:2617-2622.

Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MHC. Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36:1143-1158.

Umans JG, Lindheimer MD, Barron WM. Pressor effect of endothelium-derived relaxing factor inhibition in conscious virgin and gravid rats. *Am J Physiol.* 1990;259:293-296.

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 1992;339:572-575.

Van der Shouw YT, van der Graaf Y, Steyerberg EW. Age at menopause as a risk factor for cardiovascular mortality. *Lancet.* 1996;347:714-718.

Van Ree JH, Van den Broek WJAA, Dahlmans VEH, Groot PHE, Vidgeon-Hart M, Frants RR, Wieringa B, Havekes LM, Hofker MH. Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis.* 1994;111:25-37.

Verbeuren TJ, Jordaens FH, Zonnekeyn LL. Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits. *Circ Res.* 1986;58:552-564.

Villeneuve N, Fortuno A, Sauvage M, Fournier N, Breugnot C, Jacquemin C, Petit C, Gosgnach W, Carpentier N, Vanhoutte P, Vilaine J-P. Persistence of the nitric oxide pathway in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. *J Vasc Res.* 2003;40:87-96.

Vita JA, Treasure CB, Ganz P, Cox DA, Fish RD, Selwyn AP. Control of shear stress in the epicardial coronary arteries of humans: impairment by atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 1989;14:1193-1199.

Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, et al. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation.* 1990; 81:491-497.

Walsh BW, Schiff I, Rosner B. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med.* 1991;325:1196-1204.

Weiner CP, Lizasoain I, Baylis AS. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthase by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:5212-5216.

Wellman GC, Bonev AD, Nelson MT. Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide and Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels. *Circ Res*. 1996

Wenger NK, Speroff L, Packard B. Cardiovascular health and disease in women. *N Engl J Med*. 1993;329:247-256.

Wöfl SE, de Wit C. Intact endothelium-dependent dilation and conducted responses in resistance vessels of hypercholesterolemic mice in vivo. *J Vasc Res*. 2005;42:475–482.

Woo KS, Choo P, Lollin YI. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. *Circulation*. 1997;96:2542-2544.

Xavier HT. *Risco Cardiovascular na Mulher*. 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: BBS Editora, 2005.

Zakhary R, Gaine SP, Dinerman JJJ. Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:795-798.

Zamorano B., Bruzzone M.E., Martinez J.L. Vascular Smooth Muscle Reactivity to Norepinephrine in Ovariectomized Rats: Relationship to Vascular PGE<sub>2</sub>/PGF<sub>2a</sub> Ratio. *Gen Pharmacol.* 1995;26(7):1613-1618.