

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Polyana Lima Meireles Dalpiaz

**A Influência dos Hormônios Sexuais no Balanço
entre as Citocinas Pró-Inflamatórias e Anti-
Inflamatórias em Machos e Fêmeas SHR, Após o
Tratamento com Enalapril.**

VITÓRIA

2011

A Influência dos Hormônios Sexuais no Balanço entre as Citocinas Pró-Inflamatórias e Anti-Inflamatórias em Machos e Fêmeas SHR, Após o Tratamento com Enalapril.

POLYANA LIMA MEIRELES DALPIAZ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 16 de Dezembro de 2011 por:

Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli - Orientadora, UFES

Prof^a. Dr^a. Margareth Ribeiro Moyses - Co-orientadora, UFES

Prof^a. Dr^a. Sonia Alves Gouvea, UFES

Prof^a. Dr^a. *Ana Raquel S. de Medeiros Garcia*, IFES

Dalpiaz, Polyana Lima Meireles

A Influência dos Hormônios Sexuais no Balanço entre as Citocinas Pró-Inflamatórias e Anti-Inflamatórias em Machos e Fêmeas SHR, Após o Tratamento com Enalapril

Vitoria - 2011.

xii, 70p (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2011)

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Margareth Ribeiro Moyses

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

DEDICATÓRIA

À Meus Pais, as raízes; onde tudo começou.

Ao Adair, a terra firme, fértil, onde tudo floresce.

Aos meus irmãos, o equilíbrio dos galhos e a sombra para o descanso.

Ao Arthur e a Ana e os meus sobrinhos, as minhas sementes. A esperança de renovação.

Me torno uma árvore forte a cada dia, por que tenho vocês como elemento da minha existência.

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora da Penha que estão ao meu lado em todos os momentos, escolhendo os meus caminhos, e me preparando para segui-los.

À minha orientadora e incentivadora, Prof^a. Dr^a. Nazaré de Souza Bissoli, 'mãe científica' de todos seus alunos, exemplo de pessoa e de profissional. Obrigada por me ajudar transpor mais etapa da minha vida, por caminhar de mãos dadas comigo, esperar o meu ritmo com paciência e me ensinar os primeiros passos da ciência.

Ao Prof^a. Dr^a Margareth Ribeiro Moyses pelo carinho, confiança, disponibilidade e atenção.

A Prof^a. Dr^a. Adriana Carmona e seu Aluno Marcio Alves, por ter me recebido em seu laboratório de enzimologia -USP e com toda paciência e disposição me ajudaram nas dosagens da ECA.

Ao Prof. Dr. Dalton Vassalo e a Prof^a. Dr^a Alessandra S. Padilha por disporem o uso do pletismógrafo e pela companhia nestes longos dias.

A Profa. Dra Elenice Moreira Lemos pela ajuda nas dosagens das citocinas.

Ao Prof. Dr. Henrique e sua ex-aluna Renata Tiradentes por terem me acolhido e aberto não só a portas do seu laboratório, mas os horizontes para novas perspectivas para minha vida acadêmica.

As alunas de iniciação científica, Glauciene J. de Souza e Lara Nascimento Gusmão, pelos sábados, domingos, feriados de parceria nos experimentos.

Aos amigos do laboratório Ana Raquel, Phablo, Karine, Tadeu, Elaine, Marcos, Antonio e em especial Aline, Isabela pela parceria, amizade, incentivo. Na medida do tempo, da necessidade, da solicitação, todos, uns mais, outros

menos, uns fisicamente outros intelectualmente, outros de todas as formas e intensidades, participaram deste resultado.

Ao Edson dias pelo convívio, amizade e apoio técnico no laboratório.

A todos os demais professores, alunos e funcionários do PPGCF pelo convívio, auxílio e companheirismo.

Se tiverdes fé do tamanho de um grão de mostarda, direis a este monte: Passa daqui para acolá, e ele passará. E Nada vos será impossível" (Mt 17.20).

SUMARIO

	PAGINAS
Lista de Figura e Tabelas	9
Lista de Abreviaturas.....	10
INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Doenças Cardiovasculares e Citocinas.....	14
1.2 Citocinas.....	15
1.2.1 IL-6, TNF- e IL-10	17
1.3 SRA e hormônios sexuais.....	21
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo Geral.....	25
2.2 Objetivos Específicos.....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Animais Experimentais.....	27
3.2 Grupos Experimentais.....	27
3.3 Protocolo experimental.....	28
3.4 Registro da Pressão Sistólica (PAS)	29

3.5 Ovariectomia.....	30
3.6 Orquidectomia	31
3.7 Tratamento com inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina.....	33
3.8 Determinação fase do ciclo estral.....	33
3.9 Coleta de sangue para determinação da concentração das citocinas e da ECA.....	36
3.10 Análise dos Níveis Séricos de IL-6 ,IL-10 e TNF- α	36
3.11 Análise da atividade <i>da ECA plasmática</i>	37
3.12 Análise Estatística.....	38
4- RESULTADOS	39
4.1. Verificação do peso corporal inicial e final.....	40
4.2 Verificação da PAS.....	40
4.3 Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina	42
4.4 IL-6.....	43
4.5 TNF- α	44
4.6 IL-10.....	45
4.7 Razão IL-10/ TNF- α	46
4.8 Razão entre as citocinas IL-10/ IL-6.....	47
5- DISCUSSÃO	49
5.1 Diferenças sexuais no desenvolvimento da hipertensão.....	49
5.2 Diferenças sexuais nos níveis plasmáticos de citocinas e os efeitos do Enalapril	51

5.3 Diferenças entre os sexos no Balanço Citocinas.....	54
6- CONCLUSÃO.....	56
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	PAGINA
Figura 1: Resposta pró-inflamatória via NFkB, ativada pela Ang II e inibida pelo Quinalapril e outros IECAs.....	22
Figura 2: Organograma do protocolo experimental.....	29
Figura 3: Fotografia da técnica de execução da ovariectomia.....	30
Figura 4: Desenho técnica de execução da orquidectomia.....	32
Figura 5: Fotografia do posicionamento da rata para realização da coleta do lavado vaginal.....	34
Figura 6: Lâmina com esfregaço vaginal- Fase Metaestro.....	34
Figura 7: ilustração das fases do ciclo estral detectada através do esfregaço vaginal.....	35
Figura 8: Representação da PAS em mmHg e da variação do percentual de queda.	41
Figura 9: Valores dos níveis de atividade da ECA.	42
Figura 10: Valores dos níveis séricos de IL-6.....	43
Figura 11: Valores dos níveis séricos de TNF- α	44
Figura 12: Valores dos níveis séricos de IL-10.....	45
Figura 13: Razão de IL-10/TNF- α	46
Figura 14: Razão de IL-10/TNF- α	47

Tabela 1: Valores do peso corporal inicial e final..... 40

LISTA DE ABREVIATURAS

AFU	Unidades arbitrárias de fluorescência
Ang II	Angiotensina II
CEF	Castrada tratada com enalapril Fêmea
CEM	Castrado tratado com enalapril Macho
CSF	Fatores Estimulador de Colônias
CVF	Castrada tratada com veículo Fêmea
CVM	Castrado tratado com veículo Macho
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCVs.	Doenças cardiovasculares
ECA	Enzima conversora de angiotensina
IECA	Inibidor da enzima conversora de angiotensina
IFN	Interferons
IL	Interleucinas
NK	Células natural killers
OVX	Ovariectomia
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCR	Proteína c reativa
SEF	Sham tratada com enalapril Fêmea

SEM	Sham tratado com enalapril Macho
SVM	Sham tratado com veiculo Macho
SHR	Rato Espontaneamente Hipertenso
SRA	Sistema renina angiotensina
SVF	Sham tratada com veiculo Femea
Th.	Linfócitos T auxiliares
TNF	Fator de Necrose Tumoral

RESUMO

A Influência dos Hormônios Sexuais no Balanço entre as Citocinas Pró-inflamatórias e Anti-Inflamatórias em Machos e Fêmeas SHR, Após o Tratamento com Enalapril.

Introdução: A angiotensina II, peptídeo formado a partir da ação da enzima conversora da angiotensina (ECA) sobre a angiotensina I, é um dos principais mediadores do sistema renina-angiotensina (SRA) e além de ter efeitos hemodinâmicos, está envolvida em eventos chaves do processo inflamatório. A utilização dos inibidores da ECA, além de benefícios hemodinâmicos, está associado a efeitos antiinflamatórios, entretanto, ainda não está claro se os IECAs possuem ação benéfica sobre o equilíbrio entre as citocinas pró e antiinflamatórias e se hormônios podem interferir nesta relação. Assim, este estudo foi desenhado para investigar em ratos SHR, machos e fêmeas, castrados e não castrados, o potencial benéfico dos inibidores da ECA nos níveis séricos dos biomarcadores inflamatórios, IL-10, IL-6, e TNF- α , uma vez que estas citocinas desempenham papéis importantes na patogênese de doenças inflamatórias.

Objetivo: Avaliar a influência do gênero no efeito do enalapril sobre os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e antiinflamatória (IL-10) em ratos SHR.

Metodologia: Ratos SHR, adultos, ambos os sexos, com 12 semanas, peso de 150 ± 8 g (fêmeas) e 230 ± 10 g (machos), foram separados em 8 grupos experimentais (n=7) sendo: Fêmeas e Machos 1) SHAM + tratamento com veiculo, 2) SHAM + tratamento com Enalapril, 3)Castração + tratamento com Enalapril, 4)Castração + tratamento com veiculo. O tratamento por gavagem com Maleato de Enalapril (10mg/Kg/dia), foi iniciado após 21 dias da castração e teve duração de 4 semanas. Os animais do grupo Sham foram submetidos à cirurgia fictícia e os animais do grupo castrado, sofreram ovariectomia e orquidectomia bilateral, machos e fêmeas respectivamente. Foram analisadas a atividade da ECA plasmática as citocinas IL-10, IL-6, e TNF- α . Nivel de significância: $p < 0,05$.

Resultados: O enalapril reduziu e igualou a PAS e a atividade da ECA em todos os grupos tratados, observamos dimorfismo sexual nos níveis plasmáticos de IL-

10, TNF- α e IL-6 nos grupos sham, com valores maiores nas fêmeas. A retirada dos hormônios sexuais fez desaparecerem a diferença entre machos e fêmeas em relação ao citocinas inflamatórias e inverteu o padrão de resposta, ou seja, os machos tiveram aumento e as fêmeas redução de IL-10. Nos machos tanto a castração quanto o tratamento com enalapril aumentaram a IL-10 e reduziram a ECA. O tratamento com enalapril aumentou a IL-10 em todos os grupos tratados, dessa forma melhorou o balanço pró e antiinflamatório, independente do gênero.

Conclusão: A neutralização das ações da angiotensina II por inibidores da ECA em SHR pode exercer efeitos antiinflamatórios e anti-hipertensivos, independentemente do sexo, mas dependente dos hormônios sexuais para reduzir citocinas pró-inflamatórias.

Palavras-chave: Citocinas, dimorfismo sexual, enalapril, inflamação, ECA.

ABSTRACT

The influence of sex hormones in the balance between pro-inflammatory and Anti-Inflammatory in male and female SHR, after treatment with enalapril.

Introduction: Angiotensin II, a peptide formed from the action of angiotensin converting enzyme (ACE) on angiotensin I, is a primary mediator of the renin-angiotensin system (RAS) and in addition to hemodynamic effects, is involved in key events the inflammatory process. The use of ACE inhibitors, apart from hemodynamic benefits, is associated with anti-inflammatory effects, however, still unclear whether ACE inhibitors have beneficial effects on the balance between pro-and anti-inflammatory cytokines and hormones can interfere with this relationship. Thus, this study was designed to investigate in SHR rats, males and females, castrated and intact, the potential benefit of ACE inhibitors on serum levels of inflammatory biomarkers, IL-10, IL-6 and TNF- α , since that these cytokines play important roles in the pathogenesis of inflammatory diseases.

Objective: To evaluate the influence of gender on the effect of enalapril on serum levels of proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) and antiinflammatory (IL-10) in SHR rats.

Methods: SHR, adults, both sexes, with 12 weeks, weight 150 ± 8 g (females) and 230 ± 10 g (males), were separated into eight experimental groups ($n = 7$) are: Males and Females 1) SHAM + Treatment with vehicle, 2) SHAM + treatment with enalapril, 3) castration + treatment with enalapril, 4) castration + treatment with vehicle.

Treatment by gavage with enalapril (10mg/kg/day) was started after 21 days of castration and lasted 4 weeks. Sham group animals underwent sham surgery group and the castrated animals, underwent bilateral ovariectomy and orchidectomy, males and females respectively. We analyzed the plasma ACE activity of the cytokines IL-10, IL-6 and TNF- α . Level of significance: $p < 0.05$.

Results: Enalapril reduced SBP and ACE activity in all treated groups, we observed sexual dimorphism in plasma levels of IL-10, TNF- α and IL-6 in the sham groups, with higher values in females. The withdrawal of sex hormones made disappear the difference between males and females in relation to inflammatory cytokines and reversed the pattern of response. Enalapril

treatment increased IL-10 in all treated groups, thus improving the balance pro- and anti-inflammatory, regardless of gender.

Conclusion: The neutralization of the actions of angiotensin II by ACE inhibitors in SHR may exert anti-inflammatory and anti-hypertensives, regardless of sex, but dependent on sex hormones to reduce pro-inflammatory cytokines.

Keywords: Cytokines, sexual dimorphism, enalapril, inflammation, ACE.

1 - INTRODUÇÃO

1-INTRODUÇÃO

Componentes da resposta inflamatória são ativados em diversas doenças cardiovasculares (Nickenig & Harrison, 2002; Savoia & Schiffrin, 2007) e também em situação de deficiência de estrogênio (Kamada, 2001). Entre os numerosos mediadores envolvidos nesta resposta inflamatória, citocinas pró-inflamatórias exercem ações adversas que podem agravar o curso da doença (Mehra e cols, 2005). Por outro lado, estudos demonstram que o aumento de Angiotensina II (Ang II) está diretamente envolvido na hipertrofia e proliferação celular, estresse oxidativo e resposta inflamatória (Dinh e cols., 2001; Ferrario & Strawn, 2006), além de seus efeitos hemodinâmicos bem definidos. Além disso, os inibidores da ECA possuem efeitos anti-inflamatórios em pacientes com hipertensão arterial ou insuficiência cardíaca congestiva (Ma e cols., 2010; Vijayaraghavan & Deedwania e cols., 2011). Assim, estudos que avaliem a interação de citocinas, SRA e hormônios sexuais em animais hipertensos podem contribuir para elucidar os possíveis mecanismos pelos quais os inibidores da ECA exercem seus efeitos imunomoduladores.

1.1 Doenças Cardiovasculares e Citocinas

O grupo das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) compreende majoritariamente doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e doenças

respiratórias crônicas. Muitas doenças deste grupo têm fatores de risco comuns, e demandam por assistência continuada de serviços e ônus progressivo, na razão direta do envelhecimento dos indivíduos e da população. No Brasil, segundo dados de 2009 do Sistema de Informação de Mortalidade, as DCNT concentram 72% do total de óbitos, percentual que representa mais de 742 mil mortes por ano. As que mais matam são as doenças cardiovasculares (31,3%), o câncer (16,2%), as doenças respiratórias crônicas (5,8%) e o diabetes mellitus (5,2%) (<http://www.saude.gov.br>).

Nos últimos anos, tem-se considerado o papel da inflamação subclínica na progressão das doenças cardiovasculares (DCV) (Suliman & Stenvinkel, 2008; Mehra e cols., 2005). A inflamação é um processo fisiológico em resposta a diferentes estímulos como infecções, alterações físico-químicas ou danos traumáticos. A resposta inflamatória necessita ser precisamente regulada, uma vez que deficiências ou excessos dessa resposta estão diretamente relacionados com mortalidade e a morbidade (Tracey, 2002).

Uma grande variedade de doenças cardíacas tem sido associada à inflamação e a modulação de citocinas. Estas incluem hipertensão, aterosclerose, infarto agudo miocárdio, lesão de reperfusão cardíaca, miocardite, rejeição do enxerto, sepse associada à disfunção cardíaca e insuficiência cardíaca crônica (ICC) (Mehra e cols., 2005). As citocinas são conhecidas por sofrerem “up-regulation” em pacientes com ICC e têm sido implicadas na fisiopatologia desta doença. As citocinas são moléculas que interligam, amplificam e propagam a resposta imune inata e adaptativa, estão envolvidas em recrutar células para áreas de inflamação, estimulando sua divisão, proliferação e diferenciação. A ação das citocinas sobre o sistema cardiovascular está bem assentada em bases experimentais que demonstram promoção de inflamação, disfunção endotelial, coagulação intravascular, geração de radicais livres, perda gradativa de massa muscular e intolerância ao exercício, entre outros efeitos (Adamopoulos e cols., 2001; Mann, 2002).

1.2 Citocinas

As citocinas são um grande grupo de proteínas reguladoras de baixo peso molecular (15-30 kDa), que incluem, interleucinas (IL), Fatores de Necrose Tumoral (TNF), Interferons (IFN), Fatores Estimulador de Colônias (CSF), Fator Transformador de Crescimento (TGF), e as Quimiocinas. São produzidas por diferentes células do sistema imunológico, como os monócitos, macrófagos, células T ativadas, células B, células natural killer (NK) e fibroblastos (Sprague & Khalil, 2009; Mehra e cols., 2005), e outras células, fibroblastos, plaquetas, endotélio, músculo liso vascular (Torre-Amione e cols.,2005;). Para exercer seus efeitos biológicos, as citocinas ligam-se a receptores específicos na membrana da célula alvo e agem de forma autócrina, parácrina e justacrina, ou seja, estimulam as células que as produzem, as células adjacentes, ou ainda intervêm diretamente por meio da interação célula-célula, respectivamente. Além disso, uma única citocina, dependendo do tipo de célula, do tempo de liberação e da quantidade de receptores no tecido, pode agir em diversos tipos de células e assim produzir múltiplas respostas biológicas (pleiotropia) (Hirano,1999). Estas ações podem ser sinérgicas, quando a associação de duas citocinas amplifica a sua atividade como, por exemplo: IL-12 e IL-18, TNF- α IFN- γ , antagônica, quando suas atividades se opõem , IL-10 e TNF- α , (Bolger et al, 2002) ou ainda pode ser redundante, quando diferentes citocinas possuem um mesmo efeito sobre determinado tipo celular ,como a IL-6 e o TNF- α , (Tedgui & Mallat,2006; Sprague & Khalil, 2009).

As citocinas podem ser classificadas de diversas formas, uma das mais comuns é quanto a sua fonte celular, linfócitos T auxiliares (Th). Classificadas em tipo Th-1 e tipo Th-2. As citocinas Th-1, como IL-2, IFN- γ , e TNF- α , são principalmente pró-inflamatórias promovem a ativação de macrófagos, células NK, neutrófilos, linfócitos citotóxicos, ampliam a resposta imunológica celular e podem exacerbar o quadro em algumas doenças como a aterosclerose (Calcagni & Elenkov, 2006; Sprague & Khalil, 2009; Mehra e cols.; 2005). As citocinas tipo Th-2, como a IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, são predominantemente anti-inflamatórias e tem o efeito de contrabalançar a resposta pró-inflamatória por meio da diminuição das citocinas pró-inflamatórias e da supressão da ativação de monócitos

(Dinarello, 2000; Calcagni & Elenkov, 2006; Sprague & Khalil, 2009). Apesar da IL-6 ser classificada como uma citocina tipo Th2, ela apresenta caráter dual e demonstra ter efeitos variáveis (Kleemann e cols. 2008) devido a sua capacidade de estimular e ser estimulada por outras citocinas, principalmente a IL-1 e o TNF- α (Huber e cols. 1999) Os dois tipos de resposta não agem isoladamente, dependem do tempo de liberação de citocinas, da presença de fatores sinérgicos ou concorrentes, da densidade de receptores de citocinas, da capacidade de resposta para cada citocina. O equilíbrio na produção das citocinas do tipo Th1 e Th2 é essencial para manter a homeostase no sistema imunológico e seu desequilíbrio está envolvido na patogênese de muitas doenças humanas, como alergia e doenças autoimunes, doenças infecciosas e septicemia, aterosclerose, obesidade de tipo visceral, síndrome metabólica (Cizza e cols, 2001).

1.3 IL-6, TNF- e IL-10

Como descrito acima, a IL-6 e o TNF- α apresentam propriedades pró-inflamatórias e pró-aterogênicas, enquanto a IL-10 tem papel fundamental na supressão dessa resposta inflamatória. Assim, o balanço desses marcadores biológicos pode vir a ser uma ferramenta benéfica no diagnóstico, tratamento e prevenção de eventos vasculares (Ferrario & Strawn, 2006), por isso essas citocinas tornaram-se objetos do nosso estudo.

Interleucina-6

A IL-6 é uma citocina multifuncional, sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células, em resposta a microrganismos e também à estimulação por outras citocinas, principalmente interleucina-1 (IL-1) e TNF- α (Heinrich & Andus, 1990). Constitui importante marcador inflamatório por regular a resposta imune, as reações de fase aguda e a principal citocina pró-coagulante, pois determina a produção e a elevação das concentrações plasmáticas de fibrinogênio e em especial, da proteína C reativa (PCR), por estimular a síntese no fígado destas proteínas (Willerson & Ridker, 2004; Yudkin e cols.; 1999). Embora, ainda não haja consenso sobre métodos de dosagem e valores de referência para a IL-6, sabe-se que

ela é normalmente expressa em níveis baixos, exceto durante infecção, trauma ou outros fatores estressores. Entre os vários fatores que regulam a expressão do gene da IL-6, estão o estrogênio e a testosterona (Ershler & Keller, 2000).

Na Síndrome Metabólica (SM), o aumento da IL-6 se correlaciona, de forma dependente da obesidade, com aumento da glicemia, circunferência da cintura, níveis séricos de triglicerídeos e de HDL-colesterol, pressão sistólica, pressão diastólica e a obesidade (Volp e cols, 2008). Em homens aparentemente saudáveis, níveis elevados de IL-6 estão associados ao risco aumentado de futuras isquemias miocárdicas (Ridker e cols, 2000). Na Insuficiência cardíaca, na aterosclerose, na hipertrofia cardíaca (Haugen e cols., 2008), os níveis periféricos da IL-6 e expressão miocárdica do mRNA, desta citocina e de seu receptor estão aumentados de forma significativa e quanto mais elevada, pior a gravidade da doença, apresentando duas vezes mais o risco de óbito em 24 meses (Rauchhaus e cols., 2000). Desta forma, os níveis desta citocina podem prever morbidade em pessoas saudáveis e mortalidade em pessoas que já apresentaram algum evento cardiovascular (Francisco e cols., 2006).

Fator de Necrose Tumoral- α

Classicamente, o TNF- α é descrito como uma citocina versátil que altera o remodelamento tecidual, a permeabilidade da barreira de células epiteliais, promove ativação de macrófagos e recrutamento de infiltrados inflamatórios, além de amplificar as respostas de moléculas de adesão. É produzido, não apenas por células do sistema imune como os macrófagos e mastócitos, mas também por outras células como a músculo liso e do tecido adiposo (Sprague & Khalil, 2009). Atua, preferencialmente, por meio de dois receptores da família de receptores de TNF- α , o TNF-R1 de 55 kDa, e o TNF-R2 de 75 kDa. A ligação do TNF- α a esses receptores induz a transdução do sinal intracelular que pode resultar na ativação de diferentes eventos como regulação da apoptose, indução de genes de resposta imediata e ativação da transcrição de genes de resposta inflamatória, inclusive genes codificadores de outras citocinas como IL-1 β , IL-6 e IL-10 (Hotamisligil, 2003).

O TNF- α , assim como a IL-6, é mediador central da resposta de fase aguda da resposta imune, pois também determina a produção e a elevação das concentrações plasmáticas de fibrinogênio, inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) e, em especial, da PCR (Francisco e cols, 2006; Willerson & Ridker, 2004; Yudkin e cols, 1999). Desempenha papel importante na fisiopatologia, em uma variedade de infecções e doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide, asma, choque séptico, febre hemorrágica, caquexia, resistência insulínica relacionada à obesidade e grande variedade de tumores (Beutler & Cerami, 1988) e hipertensão (Agarwal e cols., 2009). No infarto do miocárdio, por meio de diversos efeitos em quase todos os tipos celulares envolvidos na lesão cardíaca, o TNF- α é capaz de suprimir a contratilidade cardíaca, aumentar apoptose dos cardiomiócitos (Engel e cols., 2004), estimular a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão por leucócitos e células endoteliais, além de regular metabolismo da matriz extracelular, reduzindo a síntese de colágeno, aumentando as Metalloproteinases de Matrix e a atividade em fibroblastos cardíacos (Siwik e cols., 2000).

Interleucina-10

Foi originalmente descrita como um fator de inibição da síntese de citocina devido a sua capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias por meio dos macrófagos e das células Th1. A IL-10, hoje é reconhecida como uma das mais importantes citocinas anti-inflamatórias e anti-aterogênicas (Wang e cols., 2009; Kaur e cols., 2009). Além de inibir a proliferação das células Th1, a IL-10 estimula a proliferação das células Th2 e a ativação de células NK (Thompson et cols. 1991). Como já descrito, as células Th1 são facilitadoras de uma resposta imunológica pró-inflamatória, pois secretam interleucina IL-1 β , IL-2, IL-12, interferon- γ e o TNF- α , e as células Th2 por secretarem as citocinas IL-4, IL -6, IL -10 e IL -13 contribuem para uma resposta anti-inflamatória (Lakoski e cols., 2008; Kaur e cols., 2009). Assim a IL-10, além de facilitar o desenvolvimento de respostas das células Th2, é capaz de diminuir a função citolítica e secretora de citocinas por Th1, constituindo componente chave em muitos aspectos da resposta imune (Moore e cols.,2001). Do mesmo modo, a

redução da produção de IL-10 pode estar associada a uma maior suscetibilidade a doenças infecciosas e a verificação da redução do nível sérico de IL-10, não é apenas um biomarcador de aumento do risco de eventos cardiovasculares como também é indicativo de mau prognóstico (Kleemann e cols., 2008; Tziakas e cols., 2003). Em pacientes com síndrome coronariana aguda, baixos níveis séricos de IL-10, estão associados com a instabilidade da placa aterosclerótica e altos níveis demonstraram diminuição do risco (Tziakas e cols., 2003).

A IL-10 também pode agir como um antagonista do TNF- α , contrabalançando os efeitos adversos desta citocina pró-inflamatória (Dhingra e cols. 2007), sendo um componente de neutralização da inflamação, uma vez que reduz a duração e a magnitude do processo (Kaur e cols., 2006;2009). Ambas citocinas são fundamentais para o equilíbrio entre as células Th1/Th2, no qual o desequilíbrio está criticamente envolvido em várias infecções (Yndestad e cols., 2007). A diminuição de IL-10 ou o aumento na proporção de TNF- α parecem estar correlacionados com lesões ateroscleróticas, angina instável, síndrome coronariana aguda, atopias e tumores. (Fearon & Locksley, 1996). No coração o desequilíbrio entre estas duas citocinas pode resultar em resposta inflamatória e assim promover papel patogênico na progressão das doenças cardiovasculares (Kaur e cols., 2009; Yndestad e cols, 2007).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a maneira pela qual a IL-10 inibe a síntese das citocinas pró-inflamatórias. (Schottelius e cols, 1999). Uma das mais estudadas é a inibição do fator de transcrição nuclear NF κ B (Wang e cols., 1995; Fernández & Kaski, 2002). O NF κ -b é um fator de transcrição que regula diversas substâncias pró-inflamatórias e pode ser ativado por múltiplos estímulos, como hipóxia, espécies reativas de oxigênio, endotoxinas bacteriana, citocinas, entre outros (Valen e cols, 2001; Henke e cols., 2007). O tecido miocárdico de pacientes com IC de diversas etiologias exhibe aumento da expressão dessa molécula e dos genes que ela regula, como por exemplo, à síntese do TNF- α , moléculas de adesão leucocitária e de metaloproteinases. Já foi demonstrado que muitos tipos celulares em cultura, como células endoteliais, macrófagos, leucócitos e cardiomiócitos, respondem

a alguns estímulos de citocinas com a síntese de NF- κ B em um padrão de retroalimentação positiva que perpetua a própria ativação inflamatória (Valen e cols., 2001). Quando não estimulado, o fator NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória: o I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do I κ B são necessárias para que ocorra a translocação. Vários estímulos levam à fosforilação do I κ B, que é fundamental para sua degradação. A proteína I κ B fosforilada recebe a adição de ubiquitina, pela ação da ubiquitina ligase, sendo em seguida degradada pelo complexo proteossoma 26S. Isso resulta na liberação do NF- κ B. O desmembramento do complexo I κ B/NF- κ B permite o transporte do NF- κ B para o núcleo, com consequente ligação desse nos genes junto à região promotora, levando a um aumento na expressão do gene alvo (Schottelius e cols.,1999; Baldwin, 1996). Na sepse, o estímulo com LPS fosforila o I κ B e promove a translocação do NF- κ B para o núcleo onde ele vai estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias. A implicação desse fator de transcrição como alvo terapêutico decorre da enorme quantidade de genes que sofrem regulação pelo fator NF- κ B, e participam de vários processos celulares, tais como desenvolvimento, plasticidade, morte e defesa celular e consequentemente também estão implicados em doenças como aterosclerose, asma, artrite, câncer, distrofia muscular, infarto e infecções virais (Kumar e cols., 2004). Segundo Schottelius e cols.,1999, a IL-10 bloqueia a degradação I κ B α e assim inibe a translocação nuclear do NF- κ B e consequentemente sua atividade. Assim, muitos de seus efeitos antiinflamatórios podem ser por meio desse mecanismo (Savoia & Schiffrin, 2007; Raines e cols, 2004).

1.4 SRA e hormônios sexuais.

Estudos demonstram que o aumento de Ang II, peptídeo formado a partir da ação da enzima conversora da angiotensina (ECA) sobre a angiotensina I, um dos principais mediadores do SRA, está diretamente envolvido no crescimento, na proliferação celular, no estresse oxidativo e na resposta inflamatória (Dinh e cols., 2001; Ferrario & Strawn, 2006, Graninger e cols., 2004; Ruiz-Ortega e cols., 2001) por meio da ativação do NF- κ B (Brasier e cols., 2000, Hall e cols. 2006). Assim, além de seus efeitos hemodinâmicos, o foco tornou-se o

entendimento da Ang II como modulador da inflamação. Ang II aumenta a permeabilidade vascular, recruta células inflamatórias para o tecido, e ativa diretamente a infiltração de células imunes competentes (Suzuki e cols. 2003) e media o processo pró-inflamatório, promovendo a geração de citocinas e radicais livres (Ruiz-Ortega e cols, 2001). Por outro lado, pesquisa recente também descreve que citocinas, como a IL-10, pode limitar o estresse oxidativo e a disfunção vascular mediada pela Ang II e promover um efeito protetor na parede vascular (Didion e cols., 2009).

Os inibidores da ECA são eficazes em reduzir a pressão arterial e regredir a hipertrofia ventricular esquerda tanto em humanos com hipertensão essencial, quanto em modelos animais de hipertensão arterial, como o SHR (Vapaatalo e cols, 2000; Uggere e cols., 2000). Adicionalmente, podem reverter o aumento na produção de superóxido e a ativação do sistema NF-kB, reduzir a elevada expressão de citocinas pró-inflamatórias, em aortas de ratos (Gonzalez e cols, 2000) e em modelo de aterosclerose em coelhos (Hernandez-Presa e cols, 1997) e bloquear a ativação do NF-kB em pulmões de ratos Sprague-Dawley, após o tratamento com um inibidor da ECA (He e cols., 2007). O bloqueio do NFkB pelo IECA representado na figura 1 (Egido & Ruiz-Ortega, 2007).

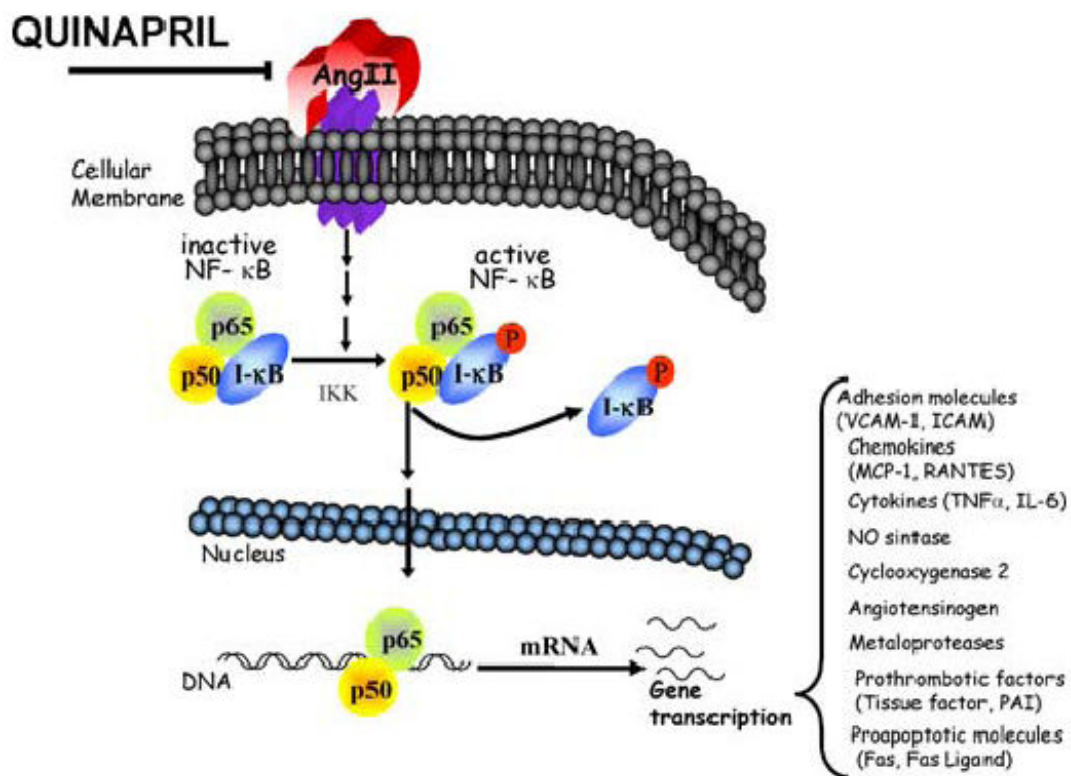


Figura 1 Resposta pró-inflamatória via NFκB, ativada pela Ang II e inibida pelo Quinalapril e outros IECAs. Anti-inflammatory Actions of Quinapril. Egido & Ruiz-Ortega Cardiovasc Drugs Ther (2007).

Sabe-se que os hormônios sexuais são capazes de modular a ação de citocinas e do SRA, e que as diferenças na produção de citocinas na suscetibilidade a doenças podem ser devido a diferenças de gênero (Cutolo cols., 1996; Tamir cols., 2002, Katzenellenbogen e cols., 1990). Nas células vasculares do musculo liso, em humanos, o estrogênio inibe a expressão da IL-1, e IL-6, demonstrando os efeitos de anti-inflamatórios do estrogênio. Estudos in vitro, demonstram evidência que a testosterona pode suprimir a expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1 β e IL-6 (D'Agostino e cols., 1999) e potencializar a expressão de antiinflamatórias como a citocina IL-10 (Bebo e cols., 1999). Em ratos hipertensos a atividade da ECA é maior em machos do que em fêmeas (Pendergrass e cols., 2008) e administração de estrogênio em fêmeas ovariectomizadas transgênicas (mRen2)27 diminui a atividade da ECA no plasma, rim e aorta (Brosnihan e cols., 1997). Diferenças entre machos e fêmeas em relação aos outros componentes do SRA, como a concentração de Ang II (Miller e cols., 1999; Pollock, 2007) e o

angiotensinogênio (Danser e cols., 1999; Yanes e cols., 2009) também são encontradas.

A medição das citocinas pode ser uma ferramenta benéfica no diagnóstico, tratamento e prevenção de eventos vasculares, além de ser importante na determinação da eficácia de agentes antiinflamatórios usados na doença vascular, monitorando os componentes da via inflamatória e fornecendo informações importantes sobre a gravidade e progressão das DCVs.

Além disso, embora os inibidores da ECA tenham revelado efeitos antiinflamatórios inclusive em pacientes com hipertensão arterial ou insuficiência cardíaca congestiva (Ma e cols., 2010; Vijayaraghavan & Deedwania e cols., 2011), ainda não está claro sua ação sobre o equilíbrio entre as citocinas pró e antiinflamatórias.

Assim, este estudo foi desenhado para investigar em ratos SHR, machos e fêmeas, o potencial benéfico dos inibidores da ECA nos níveis séricos dos biomarcadores inflamatórios, IL-10, IL-6, e TNF- α , uma vez que os mesmos desempenham papéis importantes na patogênese de doenças inflamatórias.

2- OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência do gênero no efeito do enalapril sobre os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) em ratos SHR.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar os efeitos do tratamento com enalapril sobre:

- O peso corporal de ratos SHR, machos e fêmeas, castrados e não castrados.
- PAS de ratos SHR, machos e fêmeas, castrados e não castrados.
- Atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina (ECA) em ratos SHR, machos e fêmeas, castrados e não castrados.
- Balanço de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória (IL-10/ TNF- α e IL-10/ IL-6).

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Todos os procedimentos experimentais adotados obedeceram às normas estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), aprovados sob o nº 023/2009. Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR) adultos, ambos os sexos, com 12 semanas de idade, peso inicial de 150 ± 8 g (fêmeas) e 230 ± 10 g (machos), provenientes do Biotério da UFES. Esses animais foram mantidos em ambiente, temperatura (20-24°C) e luz controlada. Ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os animais receberam água e ração de modo irrestrito.

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram separados em 8 grupos experimentais, n= 7, sendo:

Fêmeas:

1. Sham tratada com veículo veículo (SVF)
2. Sham tratada com enalapril fêmea (SEF)
3. Castrada tratada com veículo (CVF)
4. Castrada tratada com enalapril (CEF)

Machos:

1. Sham tratado com veículo macho (SVM)
2. Sham tratado com enalapril macho (SEM)
3. Castrado tratado com veículo (CVM)
4. Castrado tratado com enalapril (CEM)

3.3 Protocolo experimental

1º semana do protocolo (11 semanas de idade)

- Aclimação
- Determinação da PAS por pletismografia

2° semana do protocolo (12 semanas de idade)

- Determinação da PAS por pletismografia
- Verificação do peso corporal
- Execução da técnica de Orquidectomia e Ovariectomia nos animais, com exceção dos animais SHAM, no quais se realizou cirurgia fictícia.

3° e 4° semana do protocolo (13 e 14 semanas de idade)

- Verificação do peso corporal

5°, 6°, 7°, 8° semana do protocolo (15, 16, 17 e 18 semanas de idade)

- Verificação do peso corporal e cálculo da dose a ser administrada nos animais tratados com maleato de enalapril. Os animais tratados com veículo receberam água.

7° semana do protocolo, grupo de fêmeas sham (Fêmeas - 18 semanas de idade)

- Determinação e acompanhamento da fase do ciclo estral

8° semana do protocolo (19 semanas de idade)

- Medida da PAS por pletismografia

- Determinação e acompanhamento da fase do ciclo estral
- Coleta, centrifugação e armazenagem do soro e plasma para posterior análise dos níveis séricos das citocinas (IL-6,IL-10,TNF- α)



Figura 2: Organograma do protocolo experimental

3.4 Registro da Pressão Sistólica (PAS)

Para determinação da PAS foi utilizado o método de Pletismografia de cauda, fabricado pela II TC Life Science Inc (Woodland Hills, CA, EUA). Os ratos foram acondicionados em um tubo cilíndrico de acrílico, no qual a região proximal da cauda se encaixava a um manguito de borracha ligado ao esfigmomanômetro para insuflar e desinsuflar automaticamente em intervalos fixos de aproximadamente 40 segundos. Próximo ao manguito estava acoplado um transdutor de pulso (sensor) que captava os sinais a serem enviados e registrados no computador. O experimento só teve início após um período de aclimação, onde os animais por três vezes, em dias diferentes, por dez minutos, foram submetidos à mesma situação de medida da PAS. Este procedimento tem o objetivo de adaptá-los a situação de medida, para que ele

se movimente a menor quantidade de vezes possível durante o registro. A pressão arterial foi medida pelo menos cinco vezes para cada animal.

3.5 Ovariectomia

A ovariectomia foi realizada bilateralmente sob anestesia com cloral hidratado 10% (Vetec Química Fina LTDA, RJ Brasil). A cirurgia consistiu de uma incisão perpendicular de 1 a 1,5 cm na pele entre a última costela e a coxa, a 1 cm da linha mediana, seguida de uma outra incisão perpendicular na camada muscular para abertura da cavidade peritoneal, como demonstrado na figura 3. Posteriormente, foi realizada ligadura da tuba uterina e remoção dos ovários. A cavidade peritoneal foi então suturada e limpa e ao final do procedimento os animais receberam 0,1 ml por 100 g de peso do antibiótico Enrofloxacin 2,5% (Flotril® Shering- Plough) por via intramuscular e em seguida recolocados em gaiolas individuais. No grupo SHAM foi realizada uma cirurgia fictícia de ovariectomia, a fim de estabelecer parâmetros semelhantes em todos os animais deste estudo.



Figura 3: Fotografia da técnica de execução da ovariectomia.

3.6 Orquidectomia

A orquidectomia foi realizada sob anestesia com cloral hidratado 10% (Vetec Química Fina LTDA, RJ Brasil). A cirurgia consistiu em uma incisão perpendicular de 0,5 a 1,0 cm no tegumento e celular subcutâneo da bolsa escrotal, rompendo a cavidade escrotal, em seguida realizou-se outra incisão na camada muscular até atingir a túnica vaginallis. Os testículos foram expostos por compressão e uma ligadura feita em torno do cordão espermático para posterior remoção das gônadas, como demonstrado na figura 4 (A-J). Ao final do procedimento os animais receberam 0,1 ml por 100 g de peso do antibiótico Enrofloxacina 2,5% (Flotril ® Shering- Plough) em seguida recolocados em gaiolas individuais. No grupo SHAM foi realizada uma cirurgia fictícia de orquidectomia, a fim de estabelecer parâmetros semelhantes em todos os animais deste estudo.

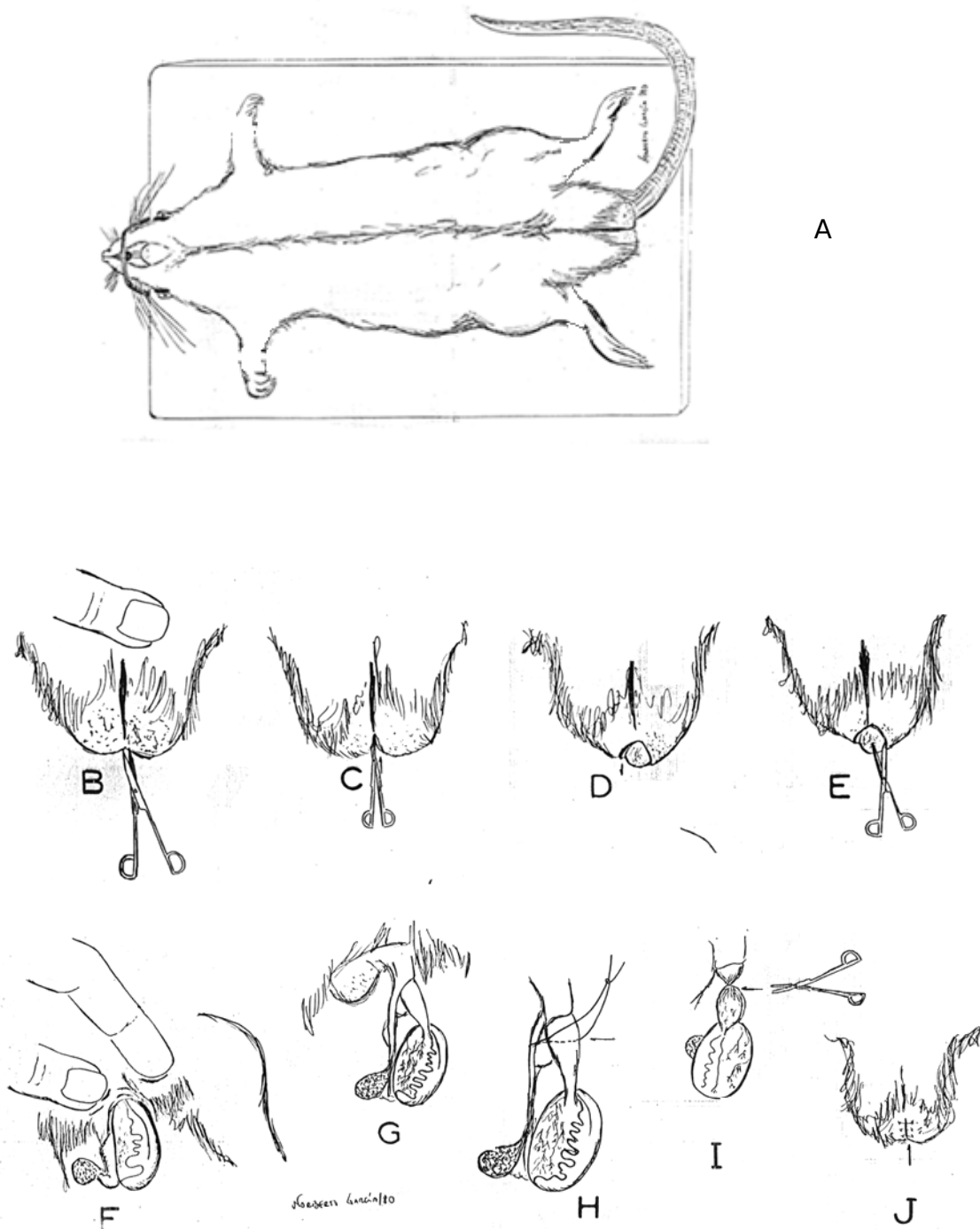


Figura 4: desenho técnica de execução da orquidectomia. Prof. Dr. Norberto G. Cairasco, Fisiologia, FMRP, USP

3.7 Tratamento com inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina

Os animais SHR, após 21 dias de castração ou cirurgia fictícia (SHAM), foram submetidos ao tratamento diário com maleato de enalapril (10 mg/kg/dia) , um inibidor da enzima conversora da angiotensina (IECA) durante 4 semanas nos machos e devido a fase do ciclo estral ,as fêmeas sham 4 semanas ± 2 dias. O tratamento foi administrado por gavagem intragástrica. Para tanto, os animais foram pesados semanalmente para ajuste da dose.

3.8 Determinação fase do ciclo estral

O ciclo estral da rata com duração de 4 ou 5 dias é caracterizado por 4 fases, proestro, estro, metaestro e diestro, que foram monitoradas por meio da técnica de esfregaço vaginal , na qual o posicionamento da rata esta demonstrado na figura 5. Através da observação a fresco de três tipos celulares, Células Nucleadas, Epiteliais e Leucócitos, é possível a determinação da fase do ciclo, como demonstrado nas figuras 6 e 7. O fluido vaginal foi coletado através de micro pipetas plásticas contendo 0,1 mL de solução salina (NaCl 0,9%) em seguida transferido para lâminas de vidro e sobrepostos com lamínulas para posterior observação em microscópio ótico com lente objetivas de 10x e 40 x de aumento. Este procedimento foi realizado diariamente, durante 7 a 10 dias, entre 8:00 e 10:00 hs da manhã (Becker 2005, Marcondes ,2002) . Utilizaram-se no experimento somente ratas com ciclos estrais regulares, e o sacrifício sempre no proestro.



Figura 5: Fotografia do posicionamento da rata para realização da coleta do lavado vaginal.

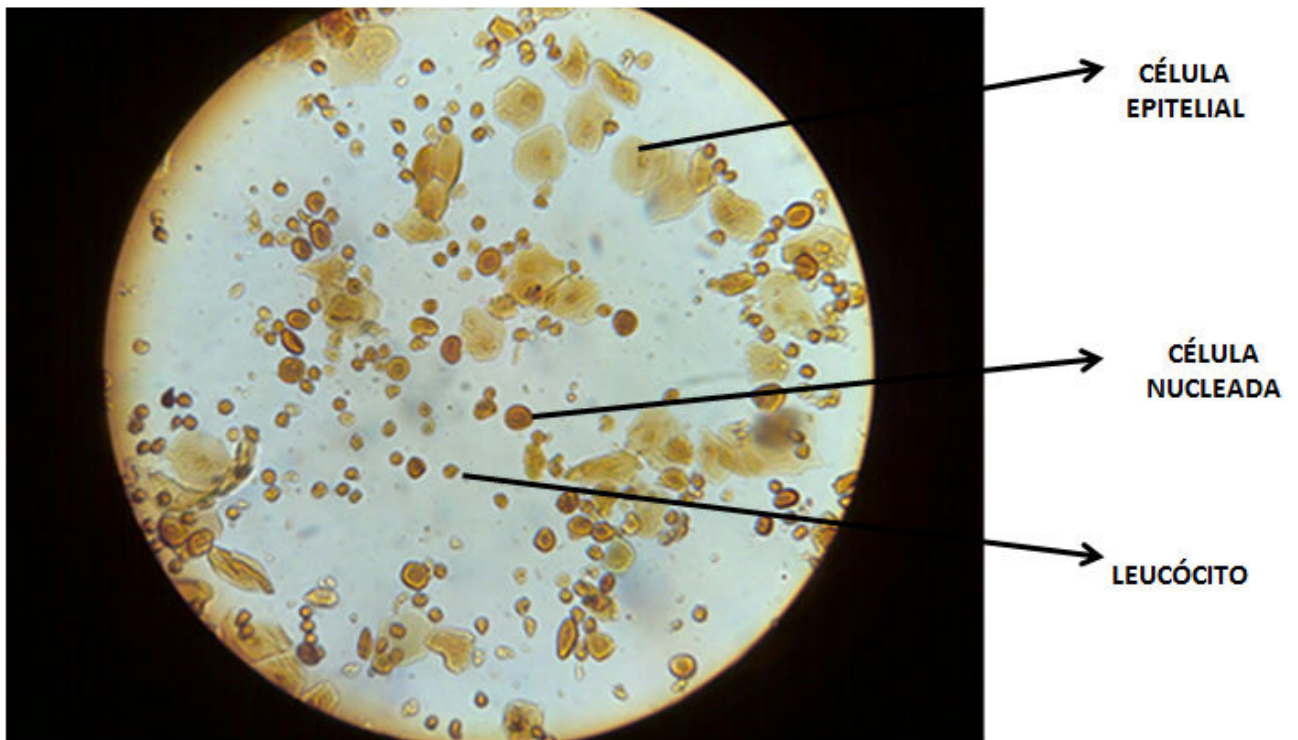


Figura 6: Lâmina com esfregaço vaginal- Fase Metaestro.

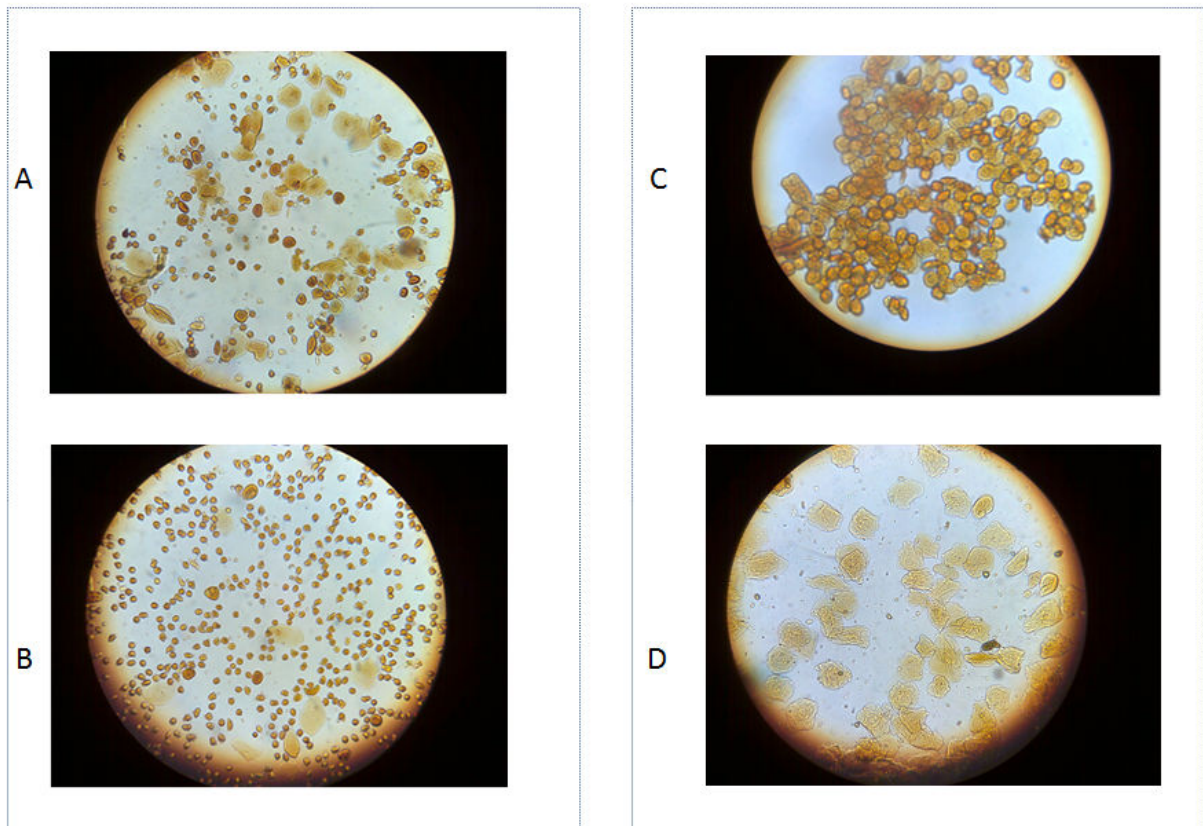


Figura 7: ilustra as fases do ciclo estral detectada através do esfregaço vaginal em microscópio ótico com um aumento de 40 vezes.

- A- Metaestro ou Diestro I- caracterizada por um pouco das 3 células. (Células Nucleadas, Epiteliais e Leucócitos).
- B- Diestro II- caracterizada por infiltrado leucocitário
- C- Proestro – caracterizada por presença predominante de células nucleadas
- D- Estro – caracterizada por presença predominante de células epiteliais.

3.9 Coleta de sangue para determinação da concentração das citocinas e da atividade da enzima conversora de angiotensina.

Um dia após a segunda medida da PAS, os animais foram decapitados, sem anestesia, e aproximadamente 8 ml de sangue foi coletado em 2 alíquotas de aproximadamente 4 ml cada. Uma em tubos vazios para obtenção soro para dosagem das citocinas e outra em tubo heparinizado para dosagem da atividade da enzima conversora de angiotensina. As amostras de soro e plasma foram centrifugadas a 4°C, a 1000g por 15 minutos, em seguida armazenadas a -80°C até o momento das dosagens.

3.10 Análise dos Níveis Séricos de IL-6 ,IL-10 e TNF- α pela técnica ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Os níveis das citocinas pró-inflamatórias Interleucina 6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), e o da citocina anti-inflamatória Interleucina 10 (IL-10) foram determinados através do método de Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) por meio de kits da Invitrogen-BioSource International (Camarillo, CA) em parceria com o Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES em amostras de soro dos animais. A técnica se baseia no método sanduíche. Amostras de soro armazenadas a -80°C foram previamente descongeladas e colocadas em placas individuais sensibilizadas com anticorpo específico para interleucina IL-6, IL-10 e outra para TNF- α de rato. As amostras, incluindo os padrões de conteúdos conhecidos de IL-6, IL-10 e TNF- α e espécimes controle foram

pipetados para os diferentes poços, seguidos da adição de um segundo anticorpo monoclonal conjugado. Após esta etapa seguiu-se o período de incubação por 2 horas. Durante a primeira incubação a IL-6, IL-10 e o TNF- α se ligam simultaneamente ao anticorpo imobilizado (captação) em um sítio, e ao segundo anticorpo conjugado (adicionado) em um segundo sítio. Após a remoção do excesso de segundo anticorpo por 4 sucessivas lavagens, a estreptavidina-peroxidase (enzima) foi adicionada. Esta se liga ao anticorpo conjugado para completar os quatro membros do sanduíche. Após uma nova incubação por 30 minutos e novamente 4 sucessivas lavagens para remoção de todas as enzimas não ligadas, uma solução substrato (cromógeno) foi adicionada e que reage com a enzima para produção de cor (azul). A intensidade do produto colorido é diretamente proporcional à concentração das citocinas presentes. O procedimento do ELISA foi realizado para duplicatas das amostras e padrões, sendo realizada a média entre as absorbâncias a partir da leitura realizada através do aparelho Dynex Technologies – analisador automático de ELISA, em comprimento de onda de 450nm. Para correções de diluições sofridas durante o procedimento, as médias foram multiplicadas por 2, obtendo-se o valor real da absorbância.

3.11 Análise da atividade da ECA plasmática (espectrofotofluorimetria)

Protocolo para a determinação da atividade da ECA

O ensaio, para a medida da atividade proteolítica da enzima conversora de angiotensina I (ECA-I), empregou o substrato Abz_FRK(Dnp)P-OH, ideal para os estudos em cinéticas enzimáticas e para a análise da atividade somática dos domínios C e N da ECA-I. Os ensaios foram realizados diretamente em

Espectrofluorímetro (TECAN GENios) de microplaca automático equipado com controlador de temperatura e shaker, placa de 96 poços de poliestireno preta. As amostras de plasma foram descongeladas em gelo. Em cada poço da microplaca, foi colocada 20 µl de amostra de plasma do grupo pretendido, em seguida adicionou-se a mistura do tampão de ensaio (12,1 g de Tris.Base, 2,92 g de NaCl em 1 litro de água deionizada, o pH 7,0 ajustado com HCl) e 10 Mm de Abz-FRK (dnp)P-OH. Gravou-se o aumento da fluorescência com excitação - λ_{ex} : 320nm e emissão λ_{em} : 420 nm, com a temperatura de 37°C e agitação constante. A atividade da Eca foi expressa em AFU (unidades arbitrárias de fluorescência) (Carmona e cols., 2006).

3.12 Análise Estatística

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), N experimental de cinco animais para interleucinas e 7 para PAS. As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA) de duas vias para os fatores tratamento e sexo, com medidas repetidas, seguida de teste de comparação de médias (post hoc) de Fisher. Todos os resultados foram avaliados através do software GB-Stat School Pak®. Valores de p menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

5 - RESULTADOS

4- RESULTADOS

4.1. Verificação do peso corporal inicial e final.

Na tabela 1 está representado o peso corporal dos animais experimentais que foi medido no início e ao final do tratamento. No início do estudo não há diferença do peso corporal entre os grupos do mesmo sexo analisados. Comparando fêmeas ovariectomizadas com fêmeas SHAM, houve aumento no peso corporal final, diferentemente do macho que não houve diferença quando comparado aos outros grupos do mesmo sexo. Tanto o peso inicial, quanto o peso final foram diferentes entre os sexos.

Tabela 1: Valores do peso corporal nos grupos Sham Veículo Macho (SVM), Sham Veículo Fêmea (SVF), Sham + Enalapril Macho (SEM), Sham + Enalapril Fêmea (SEF), Castrados + Veículo Macho (CVM), Castrados + Veículo Fêmea (CVF), Castrados + Enalapril Macho (CEM) e Castrados + Enalapril Fêmea (CEF).

GRUPOS	Peso inicial (g)	Peso Final (g)
SVM	232 ± 8*	278 ± 4 *
SVF	158 ± 4	187 ± 3
SEM	224 ± 5*	264 ± 7 *
SEF	152 ± 5	183 ± 4
CVM	239 ± 6*	280 ± 6 *
CVF	153 ± 3	217 ± 5 +
CEM	236 ± 3*	264 ± 5*
CEF	157 ± 5	216 ± 3 +

Os valores foram apresentados com média ± EPM. *p<0,05 quando comparado á fêmea do mesmo grupo, + p<0,05 quando comparado ao grupo SV do mesmo sexo.

4.2 Verificação da PAS

Ao início do protocolo experimental, a PAS inicial dos machos se apresentou diferente das fêmeas, entretanto, não houve diferença entre os grupos do mesmo sexo (machos 219 ± 5 mmHg e fêmeas 177 ± 3 mmHg, $p < 0,05$). Ao final do período experimental, como representado na Figura 8 (Painel A e B) observamos a diferença sexual nos níveis de PAS entre os animais do grupo Sham Veículo (SV machos: 222 ± 5 mmHg, SV fêmeas: $188 \pm 3,6$ mmHg). Como esperado, o tratamento com enalapril não só foi capaz de reduzir a PAS, em ambos os sexos, como também as igualou (SE machos: 153 ± 5 mmHg, SE fêmeas: 152 ± 2 mmHg) e castrados (CE machos: 148 ± 4 mmHg, CE fêmeas: 139 ± 3 mmHg). O percentual de queda nos machos foi de -31%, enquanto nas fêmeas foi de -19%. A castração em ambos os sexos, manteve a PAS a níveis semelhantes aos dos animais Sham Veículo (CVM: 221 ± 3 mmHg, CVF: 192 ± 2 mmHg). O tratamento com enalapril em ratos castrados, da mesma forma que no grupo sham veiculo, reduziu e igualou a PAS (CEM: 148 ± 4 mmHg; -33%/ CEF: 139 ± 3 mmHg; -25%) desaparecendo a diferença entre o sexos.

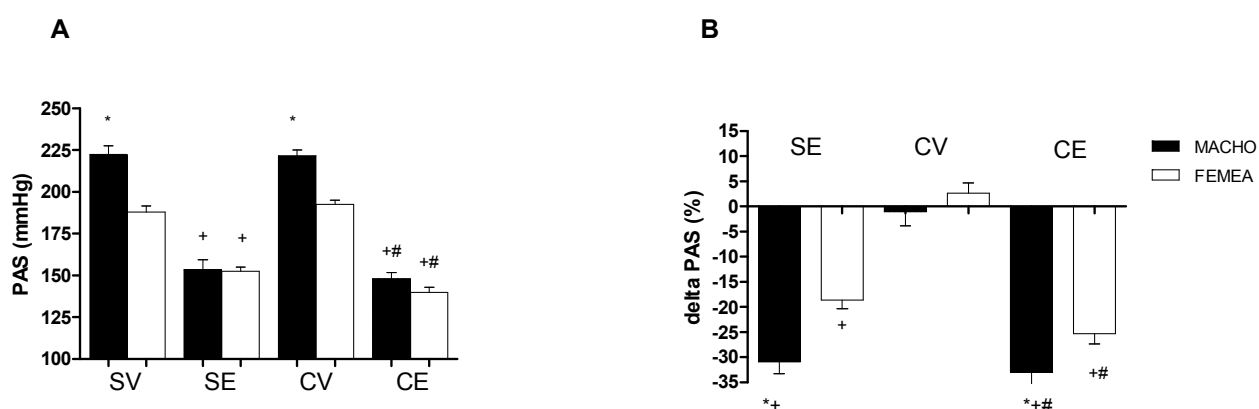


Figura 8: (Painel A e B). Representação da PAS em mmHg (A) e da variação do percentual de queda (B) da PAS dos grupos Sham Veículo (SV), Sham + Enalapril (SE), Castrado + Veículo (CV), Castrado + Enalapril (CE). Os valores foram apresentados com média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs fêmea do mesmo grupo ; + $p < 0,05$ vs animal sham veiculo ; # $p < 0,05$ vs animal do mesmo sexo castrado.

4.3 Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina

Na Figura 09 observamos a diferença sexual na atividade da ECA no grupo Sham, com o macho apresentando o maior valor (SV machos: $1500 \pm 131 \pm 1,2$ UAF; SV fêmeas: 1234 ± 80 UAF). O tratamento com enalapril foi eficiente em reduzir a atividade da ECA. A castração nos machos promoveu diminuição na atividade da ECA plasmática, enquanto na fêmea não houve alteração em relação ao grupo SVM (CVM: 790 ± 58 UAF, CVF: 1161 ± 39 UAF). O tratamento com enalapril foi efetivo em ambos os grupos, castrados e não castrados. (SEM: 59 ± 20 UAF; SEF: 21 ± 4 UAF; CEM: 8 ± 5 UAF; CEF: 32 ± 3 UAF).

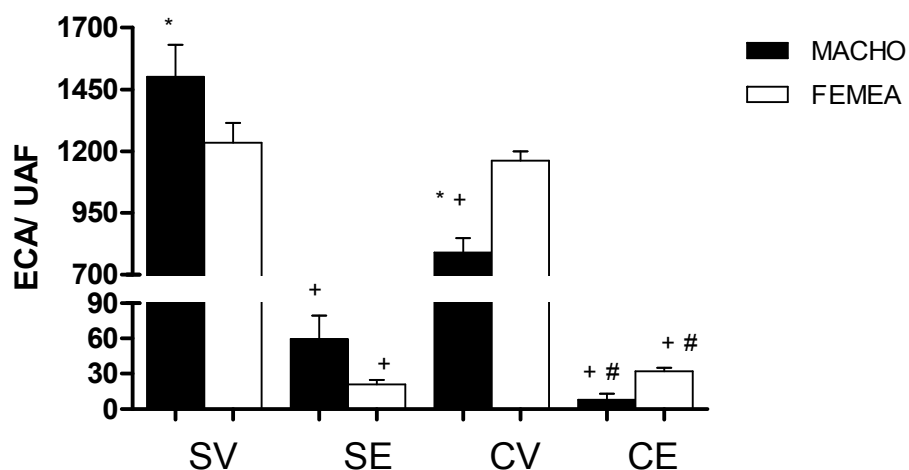


Figura 9: Valores dos níveis de atividade da ECA nos grupos Sham Veículo (SV), Sham Enalapril (SE), Castrado Veículo (CV), Castrado Enalapril (CE). Os valores foram apresentados com média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs fêmea do mesmo grupo; + $p < 0,05$ vs animais do mesmo sexo, do grupo SV; # $p < 0,05$ vs animais do mesmo sexo do grupo CV.

4.4 IL-6

Na figura 10 estão demonstrados os resultados referentes à dosagem da citocina IL-6. Pode se observar dimorfismo sexual entre os animais do grupo Sham Veículo, (SVM: $7,2 \pm 0,2$ pg/ml; SVF: $10,31 \pm 0,2$ pg/ml). O tratamento com enalapril, a castração e as duas intervenções associadas, reduziram e igualaram os níveis desta citocina em ambos os sexos (SEM: $3,31 \pm 0,9$ pg/ml; SEF: $3,46 \pm 0,2$ pg/ml e CVM: $4,2 \pm 0,23$ pg/ml; CVF: $4,07 \pm 0,6$ pg/ml, CEM: $5,9 \pm 0,4$ pg/ml e CEM: $5,5 \pm 0,6$ pg/ml).

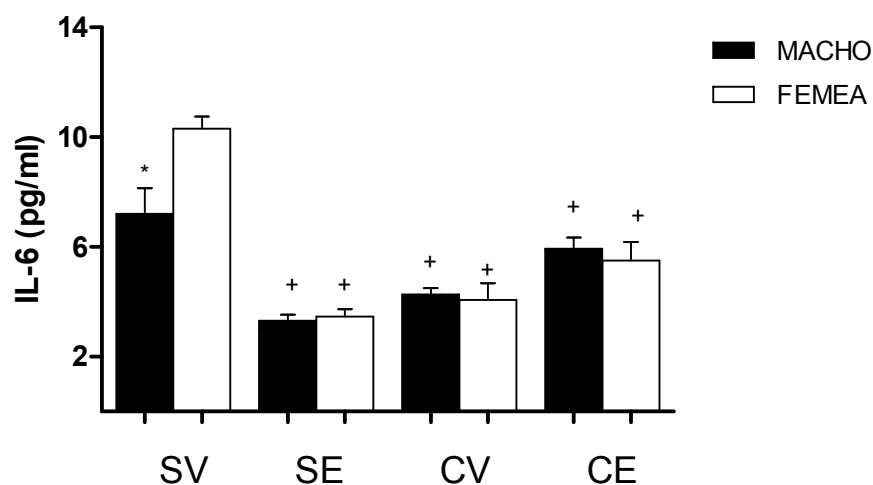


Figura 10: Valores dos níveis séricos de IL-6 nos grupos Sham Veículo (SV), Sham Enalapril (SE), Castrado Veículo (CV), Castrado Enalapril (CE). Os valores foram apresentados com média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs fêmea do mesmo grupo ; + $p < 0,05$ vs a animais do mesmo sexo, do grupo SV.

4.5 TNF- α

Em relação à citocina pró-inflamatória TNF- α , como representado na figura 11, observamos que no grupo Sham veiculo, as fêmeas apresentaram maiores valores desta citocina que os machos (SVM: $12,76 \pm 1,02$ pg/ml; SVF: $16,30 \pm 1,6$ pg/ml). Nos machos, não foi observada mudança em nenhum dos grupos estudados (SEM: $14,06 \pm 0,49$ pg/ml; CVM $12,7 \pm 1,0$ pg/ml; CEM: $14,2 \pm 1,2$ pg/ml). Diferentemente do grupo de fêmeas, nos quais tanto o tratamento com enalapril quanto a castração, reduziram as concentrações desta citocina (SEF: $13,0 \pm 1,2$ pg/ml; CVF: $10,9 \pm 0,8$ pg/ml; CEF: $12,7 \pm 1,6$ pg/ml).

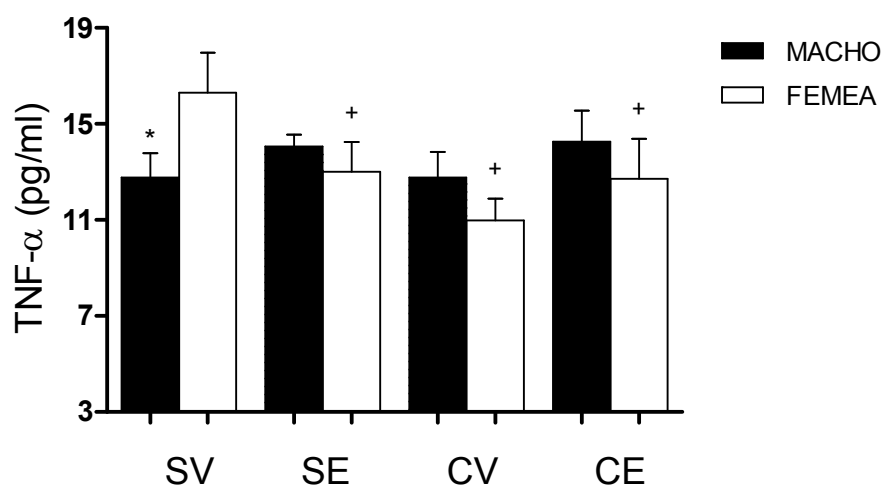


Figura 11: Valores dos níveis séricos de TNF- α nos grupos Sham Veiculo (SV), Sham Enalapril (SE), Castrado Veiculo (CV), Castrado Enalapril (CE). Os valores foram apresentados com média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs fêmea do mesmo grupo; + $p < 0,05$ vs grupo sham veiculo do mesmo sexo

4.6 IL-10

Conforme figura 12, demonstramos dimorfismo sexual nas concentrações séricas de IL-10 observadas entre o grupo Sham Veículo (SVM: $12,8 \pm 1,2$ pg/ml, SVF: $16,4 \pm 1,1$ pg/ml) e também entre o grupo Castrado Veículo (CVM: $15,3 \pm 2,1$ pg/ml, CVF: $8,9 \pm 0,9$ pg/ml). Ainda nesta figura, observamos que o tratamento com enalapril no grupo Sham, em ambos os sexos, foi capaz de aumentar as concentrações de IL-10. (SEM: $19,2 \pm 3,1$ pg/ml, SEF: $23,5 \pm 1,8$ pg/ml), diferentemente do grupo castrado tratado, que somente os machos apresentaram diferença quando comparado ao sham veículo e este tratamento eliminou a diferença de gênero (CEM: $19,8 \pm 0,7$ pg/ml, CEF: $20,1 \pm 1,8$ pg/ml).

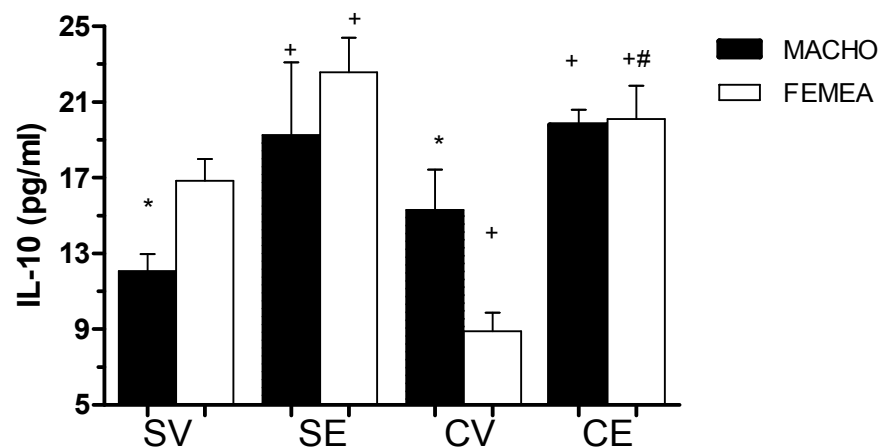


Figura 12: Valores dos níveis séricos de IL-10 nos grupos Sham Veículo (SV), Sham Enalapril (SE), Castrado Veículo (CV), Castrado Enalapril (CE). Os valores foram apresentados com média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs fêmea do mesmo

grupo; + $p < 0,05$ vs animais do mesmo sexo, do grupo SV ; # $p < 0,05$ vs animais mesmo sexo, do grupo CV.

4.7 Razão IL-10/ TNF- α

A razão entre a citocina anti-inflamatória IL-10 e a pró- inflamatória TNF- α está demonstrada na figura 13 . No grupo Sham Veiculo, não foi observado diferença entre os sexos na razão destas citocinas (SV macho: $0,96 \pm 0,02$ pg/ml; SV fêmea: $1,03 \pm 0,05$ pg/ml). O tratamento com enalapril, independente do sexo, foi efetivo em aumentar esta razão em machos e fêmeas castradas (CEM: $1,4 \pm 0,09$ pg/ml; CEF: $1,6 \pm 0,9$ pg/ml) e não castrados (SE macho: $1,3 \pm 0,1$ pg/ml; SE fêmea: $1,7 \pm 0,08$ pg/ml). Quando comparado ao grupo sham veiculo, a castração provocou resposta inversa entre os gêneros, enquanto nos machos aumentou , nas fêmeas reduziu (CV macho: $1,2 \pm 0,1$ pg/ml; CV fêmea: $0,8 \pm 0,4$ pg/ml).

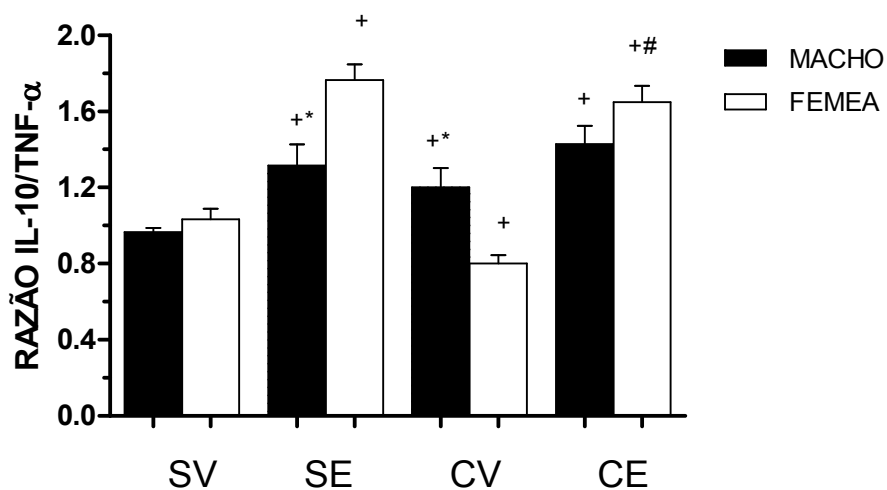


Figura 13: Razão de IL-10/TNF- α nos grupos Sham Veiculo (SV), Sham Enalapril (SE),

Castrado Veículo (CV), Castrado Enalapril (CE). Os valores foram apresentados com média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs fêmea do mesmo grupo; + $p < 0,05$ vs animais do mesmo sexo, do grupo SV ; # $p < 0,05$ vs animais mesmo sexo, do grupo CV.

4.8 Razão entre as citocinas IL-10/ IL-6

Na figura 14 está demonstrada a razão entre a citocina anti-inflamatória IL-10 e a pró- inflamatória IL-6. No grupo Sham Veículo, observamos similaridade entre os sexos na razão destas citocinas (SVM: $1,7 \pm 0,1$ pg/ml; SVF: $1,60 \pm 0,15$ pg/ml). O tratamento com enalapril manteve a similaridade entre os gêneros e assim como na razão de IL-10/ TNF- α também foi efetivo em aumentar este balanço, independente do gênero, tanto nos animais castrados (CEM: $3,4 \pm 0,3$ pg/ml; CEF: $3,7 \pm 0,2$ pg/ml), quanto nos animais não castrados (SEM: $5,8 \pm 0,6$ pg/ml; SEF: $6,6 \pm 0,6$ pg/ml). Quanto à castração, nos machos, promoveu aumento neste balanço (CVM: $3,5 \pm 0,5$ pg/ml), e não se alterou nas fêmeas (CVF: $2,3 \pm 0,3$ pg/ml).

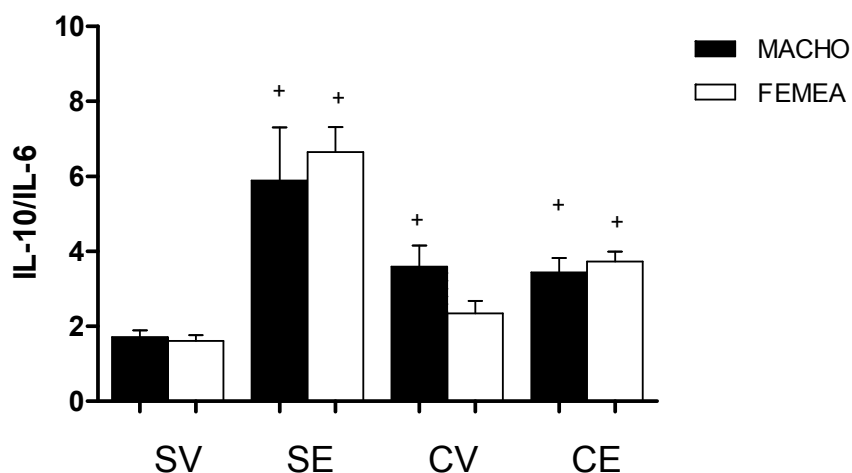


Figura 14: Razão de IL-10/TNF- α nos grupos Sham Veículo (SV), Sham Enalapril (SE), Castrado Veículo (CV), Castrado Enalapril (CE). Os valores foram apresentados com média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs fêmea do mesmo grupo; + $p < 0,05$ vs animais do mesmo sexo, do grupo SV.

5 - DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

Neste estudo, foi observado dimorfismo sexual nos níveis plasmáticos das citocinas IL-6, TNF- α e IL-10 de ratos SHR. Os valores dessas citocinas foram maiores nas fêmeas e a castração alterou esse padrão. Além disso, nós demonstramos pela primeira vez que os hormônios sexuais podem modular diretamente o balanço de citocinas, bem como o enalapril foi capaz de modificar os níveis de IL-6 e IL-10 nos animais machos e fêmeas hipertensos, e os níveis plasmáticos de TNF- α , somente nas fêmeas. Nos animais castrados, o enalapril aumentou IL-10, mas não foi capaz de alterar as concentrações de citocinas pró-inflamatórias. Enalapril melhorou o equilíbrio entre as citocinas pró- e antiinflamatória em ambos os sexos, com exceção dos machos castrados.

5.1 Diferenças sexuais no desenvolvimento da hipertensão

Estudos sugerem que as diferenças sexuais no desenvolvimento da hipertensão sejam por exacerbação dos andrógenos nos machos e /ou devido à proteção dada pelo estrogênio nas fêmeas (Reckelhoff e cols., 2001, Izumi, e cols., 2007; McGuire e cols., 2007). Nossos resultados são semelhantes aos demonstrados por Woods e cols. 2010, que a castração não reduziu a pressão arterial, demonstrando que a remoção dos hormônios sexuais nestes animais, não foi capaz de mudar o curso da hipertensão. A não alteração na PAS, pode estar relacionada a elevada PAS inicial de nossos animais, bem como a idade

em que os mesmos foram castrados. Além disso, a gênese e controle da hipertensão são multifatoriais (Armani e cols., 2011), assim, a remoção de um desses fatores não necessariamente levaria a mudanças na PAS, como o observado por estudos em nosso laboratório, no qual a denervação renal em ratos SHR, também não reduziu a pressão arterial média (Andrade e cols., 2010).

A castração nos machos reduziu 47,3% da atividade da ECA, sem alterar nas fêmeas, permanecendo a diferença sexual. Estes resultados confirmam dados anteriores que demonstraram que ratos machos hipertensos têm maior atividade da ECA plasmática do que as fêmeas (Pendergrass e cols., 2008) e em humanos normotensos (Zapater e cols., 2004). Apesar de pesquisadores mostrarem que a atividade da ECA pode ser regulada pelo estrogênio (Lim e cols., 2002), neste estudo, não encontramos redução na atividade da ECA após a ovariectomia. Seltzer e cols., (1992) demonstrou que a administração de estrogênio a ratas ovariectomizadas reduziu a atividade da ECA na hipófise anterior, mas nenhuma mudança na atividade da ECA circulante ou da hipófise foi detectado com o ciclo estral normal, sugerindo que atenuação da atividade da ECA ocorre apenas após exposição crônica ao estrogênio em doses maiores que as concentrações endógenas.

Em relação ao IECA, o tratamento com enalapril por 4 semanas, reduziu a PAS e a atividade da ECA em todos os grupos, ou seja, machos e fêmeas, castrados e não castrados, eliminando qualquer diferença de gênero nos níveis destes parâmetros entre os grupos, demonstrando que o desenvolvimento de hipertensão em SHR é mediada, pelo menos em parte, pela SRA.

5.2 Diferenças sexuais nos níveis plasmáticos de citocinas e os efeitos do Enalapril

Neste estudo observamos dimorfismo sexual nos níveis plasmáticos de IL-6, TNF- α e IL-10 e esses valores se apresentaram maior nas fêmeas. Após a castração, as citocinas pró-inflamatórias, IL-6, tornou-se similar entre os sexos e o TNF- α e a IL-10 diminuíram nas fêmeas. A castração aboliu a diferença sexual da IL-6 e o TNF- α e inverteu o padrão da IL-10, ou seja, o macho apresentou concentrações maiores que na fêmea. O estrogênio parece ter dupla ação sobre a polarização da resposta imune que depende da concentração deste esteroide, podendo potencializar tanto a produção de citocinas Th1 (IL-1, IFN) quanto de citocinas Th2 (IL-10, IL-6). Assim, baixos níveis de estrógenos exógenos podem favorecer uma resposta pró-inflamatória do tipo Th1 (IL-1, IFN), enquanto altas doses de estrógenos podem sustentar uma resposta Th2 por aumentar a produção de IL-4, IL-10 e IL-6 (Nicot, 2009, Gilmore e cols., 1997; Correale e cols., 1998) e diminuir a secreção de TNF- α a partir de células imunes (Nicot, 2009). Esta última observação em relação ao TNF- α parece diferir dos nossos resultados, já que a OVX reduziu esta citocina, entretanto, a relação do estrogênio com as concentrações destas citocinas é complexa, uma vez que existem estudos que demonstram desde a falta de ação estrogênica nos níveis circulantes destas citocinas (Sharma e cols., 2008, Rogers e cols., 1998, Zanger e cols., 2000, Keller e cols., 2001), as respostas estimulatórias da síntese de TNF- α , e IL-6 (D'Agostino e cols., 1999, Gregory e

cols., 2000, Kawasaki e cols., 2000), ou até respostas inibitórias (Kireev e cols., 2010). Além disso, torna-se difícil comparar os resultados por causa das grandes diferenças metodológicas (diferenças de espécie, tipo de célula, o tempo após OVX, concentrações de estrogênio, ou condições de cultura) entre esses estudos e o nosso estudo, que foi realizado em fêmeas com concentrações fisiológicas de estrogênio, por isso, a coleta sanguínea do grupo sham ocorreu na fase do proestro, fase de maior concentração do estrogênio endógeno, uma vez que o nível de indução desses marcadores inflamatórios pode variar significativamente em função estágio do ciclo estral (Sundaye cols., 2006; Nicot, 2009).

Alternativamente, o estrogênio pode mudar a sua resposta de supressão ou de estimulação, dependendo do contexto individual celular. Por exemplo, experimentos *in vivo*, em ratos saudáveis a secreção de IL-6 por monócitos foi inibida pelo estrogênio, mas a inibição foi revertida quando a função imune foi ativada (Gregory e cols., 2000) ou estudo *in vitro* que mostram que o estradiol na concentração de 1-10 nM inibe a produção TNF- α induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em células mononucleares do sangue periférico, mas é estimulante, na ausência de LPS (Asai e cols., 2001), ilustrando a importância do contexto celular. Assim, mostramos que houve uma redução nos valores de 03 citocinas estudadas em ratos OVX comparado aos valores encontrados na fase de proestro, diferente de outros estudos que têm reposição hormonal com doses baixas ou altas de estrogênio. Este resultado demonstra que o estrogênio endógeno pode ser o fator principal nessas mudanças, uma vez que a ovariectomia não alterou a ECA ou a PAS.

Diferença entre os sexos foi observada pela castração em relação à IL-10. Enquanto na fêmea a IL-10 diminuiu, o macho mostrou aumento desta citocina, mantendo a diferença entre os sexos. Nos machos, a atividade da ECA foi reduzida e a IL-10 e a razão de IL-10/TNF- α aumentou nos grupos sham enalapril, castrado veiculo, e castrado enalapril. A capacidade da IL-10 em neutralizar as ações do TNF- α , são bem conhecidas (Dhingra e cols. 2007; Bolger e cols, 2002), que pode ser um dos fatores de não termos observado mudança nas concentrações individuais do TNF- α . Em trabalhos anteriores, enalapril foi capaz de produzir um aumento nos níveis plasmáticos de IL-10 em pacientes com doença arterial coronariana e hipertensão arterial (Schieffer e cols.; 2004) e em machos SHR (Miguel-Carrasco e cols., 2010).

Em relação a IL-6, nos machos, a redução dos hormônios sexuais foi fundamental para a diminuição desta citocina. Resultados de Wang e cols. (2005) apontam que o bloqueio dos receptores de testosterona com a flutamida, ou castração em machos Sprague-Dawley melhora a função miocárdica após isquemia-reperfusão aguda, por uma diminuição do TNF- α , IL-1 β e IL-6. No nosso estudo, o enalapril também reduziu IL-6 em machos e fêmeas. Em ratos Wistar machos, uma única dose de enalapril após infusão intravenosa de Ang II suprimiu IL-6 no rim (Niimi e cols.; 2002). Na ausência dos hormônios sexuais, o enalapril não foi capaz de alterar as concentrações de citocinas pró-inflamatórias, demonstrando a interação entre esses hormônios e enalapril.

Embora os mecanismos subjacentes ao papel dos inibidores da ECA sobre a síntese de citocinas não sejam bem compreendidos, eles têm sido tradicionalmente atribuída à inibição da formação de Ang II (Schindler e cols.,

1995, Papapetropoulos e cols.; 1996). Os efeitos benéficos dos inibidores da ECA em modular a células do sistema imunológico pode ser ao menos em parte, atribuível à prevenção de eventos decorrentes da formação de Ang II e, conseqüentemente, a regulação de várias genes relacionados ao NF-kB, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, NO sintase e outros fatores, que estão envolvidos na patogênese da lesão vascular inflamatória e hipertensão (Ferrario & Strawn e cols., 2006, Miguel-Carrasco e cols., 2010).

5.3 Diferenças entre os sexos no Balanço Citocinas

O TNF- α está elevado em algumas doenças cardíacas, incluindo miocardite, infarto agudo do miocárdio, angina instável (Kaur e cols., 2006a,b; Levine e cols., 1990; Torre-Amione e cols., 2005). A IL-10 inibe e antagoniza a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α (Bolger e cols., 2002). Adicionalmente, estas duas citocinas são fundamentais para o equilíbrio entre as células Th1/Th2, o que demonstra a importância de estudar o equilíbrio destas citocinas. Sobre os nossos resultados, a castração nos machos não alterou o equilíbrio IL-10/TNF- α , contudo, em fêmeas castradas quando comparada ao grupo sham, observamos que esta relação está com valor abaixo de 1, devido a grande diminuição da IL-10, menor redução do TNF- α , assim a IL-10 pode não oferecer proteção contra o TNF- α , e desta forma predominar os efeitos inflamatórios do TNF- α (Kaur e cols., 2009), reforçando a importância do estrogênio endógeno no controle das DCV. O tratamento com enalapril aumentou o balanço IL-10/TNF- α em todos os grupos tratados (exceto no grupo macho castrado), principalmente, pelo aumento da IL-10. A diferença

entre os sexos foi observada na presença de enalapril, devido a maior proporção nas fêmeas do que nos machos.

Embora, não tenhamos encontrado estudos relacionando o tratamento com inibidores da ECA, dimorfismo sexual e os níveis de citocinas em SHR, nossos resultados são consistentes com vários estudos que demonstraram, em diferentes modelos experimentais, semelhante capacidade dos IECA em modular as citocinas (Wee cols., 2002; Niimi e cols., 2002; Miguel Carrasco e cols., 2010; Krysiak e cols., 2008). O efeito do enalapril em aumentar o balanço de IL-10/TNF- α pode ser protetor sobre o SCV, como demonstrado em estudo com macho Sprague-Dawley após infarto do miocárdio, que o Losartan melhorou a função cardíaca associada ao maior balanço de IL-10/TNF- α (Kaur e cols., 2006a ; b), reduzindo os efeitos deletérios do TNF- α em relação a sua ação de gerar espécies reativas de oxigênio ROS (Dhingra e cols., 2007). Sobre a razão IL-6/IL10 não observamos diferença de gênero entre os grupos, somente diferenças individuais como anteriormente descrito. Na presença de hormônios sexuais o tratamento com enalapril aumentou esta relação em ambos os sexos, devido ao aumento de IL-10 e redução das concentrações de IL-6.

O equilíbrio entre a IL-6/IL-10 pode, eventualmente, constituir perfil prognóstico de aterogenicidade (Ferrario&Strawn, 2006). Em homens aparentemente saudáveis, níveis elevados de IL-6 estão associados ao risco de infarto do miocárdio. Estudo de Taniguchi e cols. (1999) observou que em pacientes que não sobreviveram a síndrome da resposta inflamatória sistêmica apresentaram

diminuição nesta razão (IL-6/IL-10), confirmando a importância do equilíbrio ser maior que 1, e portanto favorecendo as ações anti-inflamatórias de IL-10 .

6-CONCLUSÃO

6- CONCLUSÃO

Este estudo fornece evidências de que em machos e fêmeas SHR, existe diferença entre os sexos nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias; os efeitos da castração causados na concentração de citocinas independem dos níveis da pressão arterial em ambos os sexos, uma vez que a castração não alterou o PAS. O enalapril aumentou IL-10 em todos os grupos tratados dessa forma melhorou o balanço pró e anti-inflamatório, independente do gênero.

Assim, a neutralização das ações da Ang II por inibidores da ECA em SHR pode exercer efeitos anti-inflamatórios e anti-hipertensivos, independentemente do sexo, mas dependente dos hormônios sexuais para reduzir citocinas pró-inflamatórias.

Se o dimorfismo sexual em relação as citocinas, demonstrados neste estudo, existem em pacientes hipertensos e se o efeito do IECA em modificá-las pode ou não determinar relevância clínica é uma questão a ser considerada em estudos futuros.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamopoulos S, Parissis JT, Kremastinos DT. A glossary of circulating cytokines in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2001; 3: 517-26.
- Agarwal D, Haque M, Sriramula S, Mariappan N, Pariaut R, Francis J. Role of proinflammatory cytokines and redox homeostasis in exercise-induced delayed progression of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2009 ;54(6):1393-400.
- Andrade TU, Franquini JV, Cabral AM, Vasquez EC, Araújo MT, Moysés MR, Abreu GR, Bissoli NS. Acute obstructive apnea produces natriuresis in spontaneously hypertensive rats (SHR) by a renal nerve-dependent. *Clin Exp Hypertens.*2010;32(8):555-9.
- Armani C, Botto N, Andreassi MG. Susceptibility genes in hypertension. *Curr Pharm Des.* 2011;17(28):2973-86.
- Baldwin AS. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649–683.
- Bebo BF Jr, Schuster JC, Vandenbark AA, Ovner H. Androgens alter the cytokine profile and reduce encephalitogenicity of myelin-reactive T cells. *J Immunol*1999, 162:35–40.
- Becker JB, Arnold AP, Berkley KJ, Blaustein JD, Eckel LA, Hampson E, Herman JP, Marts S, Sadee W, Steiner M, Taylor J, Young E. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology* 2005 Apr;146(4):1650-73.
- Beutler B, Cerami A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu Rev Biochem*1988. 57:505–518.

- Bolger AP, Sharma R, von Haehling S, Doehner W, Oliver B, Rauchhaus M, Coats AJ, Adcock IM, Anker SD. Effect of interleukin-10 on the production of tumor necrosis factor-alpha by peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 2002 Aug 15;90(4):384-9.
- Brasier AR, Jamaluddin M, Han Y, Patterson C, Runge MS. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem.* 2000;212:155–169.
- Brosnihan K.B., Li P., Ganten D., Ferrario C.M. Estrogen protects transgenic hypertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilator balance of RAS. *Am. J. Physiol.* 1997, 273 R1908–R1915.
- Calcagni E, Elenkov I. Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Jun;1069:62-76. Review.
- Carmen Hinojosa-Laborde; Darrell L. Lange; Joseph R. Haywood Role of Female Sex Hormones in the Development and Reversal of Dahl Hypertension. *Hypertension* 2000;35:484-489
- Carmona AK, Schwager SL, Juliano MA, Juliano L, Sturrock ED. A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. *Nat Protoc.* 2006; 1(4):1971-6.
- Cizza G, Ravn P, Chrousos GP, Gold PW. Depression: a major, unrecognized risk factor for osteoporosis? *Trends Endocrinol Metab.* 2001 Jul;12(5):198-203. Review.
- Correale J, Arias M, Gilmore W. Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4+ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol.* 1998 Oct 1;161(7):3365-74.
- Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, et al Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages. *J Clin Endocrinol Metab* 1996,81:820–827.

- D'Agostino P, Milano S, Barbera C, Di BG, La RM, Ferlazzo V et al Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. *Ann N Y Acad Sci* 1999;876:426–429.
- Danser A.H., Derkx F.H., Schalekamp M.A., Hense H.W., Riegger G.A., Schunkert H. Determinants of inter individual variation of renin and prorenin concentrations: evidence for a sexual dimorphism of (pro) renin levels in humans. *J. Hypertens.* 1998, 16 853–862;
- Dhingra S, Sharma AK, Singla DK, Singal PK. p38 and ERK1/2 MAPKs mediate the interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress and cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Dec;293(6):H3524-31.
- Didion, S. P.; Kinzenbaw, D. A.; Schrader, L.I.; Chu, Y.; Faraci, F.M. Endogenous Interleukin-10 Inhibits Angiotensin II-Induced Vascular Dysfunction. *Hypertension* 2009; 54(3): 619–624.
- Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000;118(2):503-8. Review.
- Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME . angiotensin receptors : distribution, signaling and fun. *SCI* 100 (5): 481-492.
- Egido J, Ruiz-Ortega M. Anti-inflammatory actions of quinapril. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2007 Jun;21(3):211-20.
- Engel D, Peshock R, Armstrong RC, Sivasubramanian N, Mann DL. Cardiac myocyte apoptosis provokes adverse cardiac remodeling in transgenic mice with targeted TNF overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H1303–H1311
- Ershler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med.* 2000;51:245-70. Review.
- Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science.* 1996. 272:50–53.
- Fernández, R. P.; Kaski, J.C.; Interleukin-10 and Coronary Disease. *Rev Esp Cardiol* 2002;55(7):738-50.

- Ferrario CM, Strawn WB. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2006 Jul 1;98(1):121-8.
- Francisco G, Hernández C, Simó R. Serum markers of vascular inflammation in dyslipemia. *Clin Chim Acta*. 2006 Jul 15;369(1):1-16.
- Gilmore W, Weiner LP, Correale J. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol*. 1997 Jan 1;158(1):446-51.
- Graninger M, Reiter R, Drucker C, Minar E, Jilma B. Angiotensin receptor blockade decreases markers of vascular inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44:335–339
- Gregory MS, Duffner LA, Faunce DE, Kovacs EJ. Estrogen mediates the sex difference in post-burn immunosuppression. *J Endocrinol* 2000;164:129–138.
- Hall G, Hasday JD, Rogers TB. Regulating the regulator: NF-kappaB signaling in heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41:580–591
- Haugen E, Gan LM, Isic A, Skommevik T, Fu M. Increased interleukin-6 but not tumour necrosis factor-alpha predicts mortality in the population of elderly heart failure patients. *Exp Clin Cardiol*. 2008 Spring;13(1):19-24.
- He X, Han B, Mura M, Xia S, Wang S, Ma T, Liu M, Liu Z. Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents oleic acid-induced severe acute lung injury in rats. *Shock*. 2007 Jul;28(1):106-11
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*. 1990 Feb 1;265(3):621-36. Review.
- Henke N, Schmidt-Ullrich R, Dechend R. et al. Vascular endothelial cell-specific NF-kB suppression attenuates hypertension-induced renal damage. *Circulation Res* 2007;101:268–276.
- Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition prevents arterial NF-kB activation, MCP-1 expression and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 1997; 95:1532-1541.

- Hirano T. Molecular basis underlying functional pleiotropy of cytokines and growth factors. *BiochemBiophys Res Commun*. 1999 Jul 5;260(2):303-8. Review.
- Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003, 27Suppl 3:S53-5. Review.
- Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2364–2367.
- Izumi Y, Matsumoto K, Ozawa Y, et al. Effect of age at menopause on blood pressure in postmenopausal women. *Am J Hypertens* 2007;20:1045-50.
- Jill B. Becker, Arthur P. Arnold, Karen J. Berkley et al. Strategies and Methods for Research on Sex Differences in Brain and Behavior *Endocrinology* 2005 146: 1650-1673.
- Kamada M, Irahara M, Maegawa M, Ohmoto Y, Takeji T, Yasui T, Aono T. Postmenopausal changes in serum cytokine levels and hormone replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:309-314.
- Katzenellenbogen BS, Nardulli AM, Read LD Estrogen regulation of proliferation and hormonal modulation of estrogen and progesterone receptor biosynthesis and degradation in target cells. *Prog Clin Biol Res* 1990; 322:201–211
- Kaur K, Dhingra S, Slezak J, Sharma AK, Bajaj A, Singal PK. Biology of TNF- α and IL-10, and their imbalance in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2009; 14:113-123.
- Kaur K, Sharma AK, Dhingra S, Singal PK. Interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2006 ;41:1023–1030.
- Kaur K, Sharma AK, Singal PK. Significance of changes in TNF-alpha and IL-10 levels in the progression of heart failure subsequent to myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006b;291:106–113.

- Kawasaki H, Onuki R, Suyama E, Taira K. Identification of genes that function in the TNF α -mediated apoptotic pathway using randomized hybrid ribozyme libraries. *Nat Biotechnol*. 2002 Apr; 20(4):376-80.
- Kawasaki T, Ushiyama T, Inoue K, Hukuda S. Effects of estrogen on interleukin-6 production in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Clin Exp Rheumatol*. 2000 Nov-Dec;18(6):743-5.
- Keller ET, Zhang J, Yao Z, Qi Y. The impact of chronic estrogen deprivation on immunologic parameters in the ovariectomized rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of menopause. *J Reprod Immunol* 2001. 50:41–55 .
- Kessler, S P; Senanayake ,P. S; Gaughan, C. ; Sen, G.C. Vascular expression of germinal ACE fails to maintain normal blood pressure in ACE-/- mice .
- Kireev RA, Tresguerres AC, Garcia C, Borrás C, Ariznavarreta C, Vara E, Vina J, Tresguerres JA. Hormonal regulation of pro-inflammatory and lipid peroxidation processes in liver of old ovariectomized female rats. *Biogerontology*. 2010. Apr;11(2):229-43
- Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res*. 2008 Aug 1;79(3):360-76.
- Krysiak , R.; Okopieñ, Bogus A.W. Pleiotropic effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in normotensive patients with coronary artery disease . *Pharmacological Reports* 2008 60 514-523.
- Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med (Berl)*. 2004 Jul;82(7):434-48.
- Lakoski SG, Liu Y, Brosnihan KB, Herrington DM. Interleukin-10 concentration and coronary heart disease (CHD) event risk in the estrogen replacement and atherosclerosis (ERA) study. *Atherosclerosis*. 2008 ;197(1):443-7.
- Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 1990;323:236–241.

- Lim YK, Retnam L, Bhagavath B, Sethi SK, bin Ali A, Lim SK. Gonadal effects on plasma ACE activity in mice. *Atherosclerosis* 2002 Feb;160(2):311-6.
- Ma TK, Kam KK, Yan BP, Lam YY. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. *Br J Pharmacol* 2010.160(6):1273-92.
- Marcondes, F. K.; Bianchi, F. J. and Tanno, A. P.. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.* 2002, vol.62, n.4a, pp. 609-614.
- McGuire BB, Watson RW, Pérez-Barriocanal F, Fitzpatrick JM, Docherty NG. Gender differences in the renin-angiotensin and nitric oxide systems: Relevance in the normal and diseased kidney. *Kidney Blood Press Res* 2007;30:67-80.
- Mehra VC, Ramgolam VS, Bender JR. Cytokines and cardiovascular disease. *J Leukoc Biol.* 2005 Oct;78(4):805-18. Epub 2005 Jul8. Review.
- Miguel-Carrasco JL, Zambrano S, Blanca AJ, Mate A, Vázquez CM. Captopril reduces cardiac inflammatory markers in spontaneously hypertensive rats by inactivation of NF-kB. *J Inflamm (Lond)*.2010 May 12;7:21
- Miller JA, Anacta LA, Cattran DC. Impact of gender on the renal response to angiotensin II. *Kidney Int.* 1999 Jan;55(1):278-85.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683-765
- Nickenig G, Harrison DG. The AT1-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherosclerosis. Part I: Oxidative stress and atherogenesis. *Circulation* 2002;105:393–396.
- Nicot A. Gender and sex hormones in multiple sclerosis pathology and therapy. *Front Biosci.* 2009 Jan 1;14:4477-515. Review.
- Niimi, R., Nakamura, A., Yanagawa, Y. Suppression of Endotoxin-Induced Renal Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-6 mRNA by Renin-Angiotensin System Inhibitors *Jpn. J. Pharmacol.* 2002: 88, 139 – 145.

- Papapetropoulos A, Antonov A, Virmani R, et al. Monocyte- and cytokine-induced downregulation of angiotensin converting enzyme in cultured human and porcine endothelial cells. *Circ Res* 1996; 79:512±523.
- Pendergrass K.D., Pirro N.T., Westwood B.M., Ferrario C.M., Brosnihan K.B., Chappell M.C. Sex differences in circulating and renal angiotensins of hypertensive mRen(2).Lewis but not normotensive Lewis rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 2008, 295 H10–H20.
- Pollock J.S. Sex and sex hormones influence the development of albuminuria and renal macrophage infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr.Comp. Physiol.* 2007; 293 R1573–R1579.
- Procedimentos utilizados em experimentos com ratos, aula prática, Universidade Federal do Pará, UFPA, Departamento de fisiologia. disponível em: www.ufpa.br/lmec/Ensino/Graduacao/PCI.../Procedimentos.doc
- Raines EW, Garton KJ, Ferri N. Beyond the endothelium: NF-αB regulation of smooth muscle function. *Circ Res* 2004;94:706–708.
- Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, Davos C, Kemp M, Liebenthal C, Niebauer J, Hooper J, Volk HD, Coats AJ, Anker SD. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2000, 19;102(25):3060-7.
- Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K. Gender differences in the development of hypertension in SHR: role of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000;35:480–483.
- Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 2001;37:1199-208.
- Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000;101(15):1767-772.
- Rogers A, Eastell R 1998 Effects of estrogen therapy of postmenopausal women on cytokines measured in peripheral blood. *J Bone Miner Res* 13:1577–1586.

- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Rupérez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001, 10(3):321-9.
- Savoia C, Schiffrin EL. Vascular inflammation in hypertension and diabetes:molecular mechanisms and therapeutic interventions. *ClinSci (Lond)* 2007;112(7):375-84
- Schieffer B, Bunte C, Witte J, Hoepfer K, Boger RH, Schwedhelm E, Drexler H: Comparative effects of AT1-antagonism and angiotensin-converting enzyme inhibition on markers of inflammation and platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2004, 44:362-368.
- Schindler R, Dinarello CA and Koch K-M: Angiotensin-converting-enzyme inhibitors suppress synthesis of tumour necrosis factor and interleukin 1 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*, 1995, 526 – 533.
- Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS Jr. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem*. 1999 Nov 5;274(45):31868-74.
- Seltzer, A., Pinto, J.E., Viglione, P.N., Correa, F.M.A., et al., 1992. Estrogens regulate angiotensin-converting enzyme and angiotensin receptors in female rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 55: 460-467.
- Sharma R, Markel TA, Wang Y, Crisostomo PR, Wang M, Sando IC, Weil BR, Meldrum DR. Proestrus female rats are more resistant to right ventricular pressure overload. *Shock*. 2008 Sep;30(3):318-23.
- Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res* 2000;86:1259–1265
- Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2009 Sep 15;78(6):539-52.Review.

- Suliman ME, Stenvinkel P. Contribution of inflammation to vascular disease in chronic kidney disease patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2008;19:329-45.
- Sunday, L., Tran, M., Krause, D. and Duckles, S. (2006) Estrogen and progestagens differentially modulate vascular proinflammatory factors. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 291, E261-267.
- Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 Jun;35(6):881-900.
- Tamir S, Izrael S, Vaya J The effect of oxidative stress on ER α and ER β expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002, 81:327–332
- Taniguchi T, Koido Y, Aiboshi J, Yamashita T, Suzaki S, Kurokawa A. Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med.* 1999 Jul;27(7):1262-4.
- Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* 2006 Apr;86(2):515-81. Review.
- Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mos-mann TR, Moore KW, Rennick DM. Interleukin 10: a novel stimulatory factor mast cells and their progenitors. *J Exp Med.* 1991;173:507-510.
- Torre-Amione G. Immune activation in chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 2005; 95 (supl.): 3C-8C.
- Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002;420:853-9
- Tziakas DN, Chalikias GK, Hatzinikolaou HI, et al. Anti-inflammatory cytokine profile in acute coronary syndromes: behavior of interleukin-10 in association with serum metalloproteinases and proinflammatory cytokines. *Int J Cardiol* 2003;92:169–75.
- Uggere TA, Abreu GR, Sampaio KN, Cabral AM, Bissoli NS. The cardiopulmonary reflexes of spontaneously hypertensive rats are normalized after regression of left ventricular hypertrophy and hypertension. *Braz J Med Biol Res.* 2000 ;33(5):589-94.

- Valen G, Yan ZQ, Hansson GK. Nuclear factor kappa-B and the heart. *J Am CollCardiol*. 2001 Aug;38(2):307-14. Review.
- Vapaatalo H, Mervaala E, Nurminen ML. Role of endothelium and nitric oxide in experimental hypertension. *Physiol Res*.2000;49:1–10.
- Vijayaraghavan K, Deedwania P. Renin-angiotensin-aldosterone blockade for cardiovascular disease prevention. *Cardiol Clin* 2011.29(1):137-56,
- Volp AC, Alfenas, R de C, Costa NM, Minim VP, Stringueta PC, Bressan J. [Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008 Apr;52(3):537-49.
- Wang M, Tsai BM, Kher A, Baker LB, Wairiuko GM, Meldrum DR. Role of endogenous testosterone in myocardial proinflammatory and proapoptotic signaling after acute ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Jan;288(1):H221-6.
- Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)10 inhibits nuclear factor $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) activation in human monocytes: IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem*. 1995;270:9558-63.
- Wang Y, Zhou Y, Meng L, Lu X, Ou N, Li X. Inflammatory mediators in Chinese patients with congestive heart failure. *J Clin Pharmacol*. 2009 May;49(5):591-9.
- We GC, Siroi MG, Qu R, Liu P, Roulea JL. Effects of quinapril on myocardial function, ventricular remodeling and cardiac cytokine expression in congestive heart failure in the rat. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2002 Jan;16(1):29-36.
- Willerson JT, Ridker PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation* 2004;109:2-10.
- Woods LL, Morgan TK, Resko JA. Castration fails to prevent prenatally programmed hypertension in male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010 Apr;298(4): R1111-6.
- Yanes L.L., Sartori-Valinotti J.C., Iliescu R. et al. Testosterone dependent hypertension and upregulation of intrarenal angiotensinogen in Dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2009; 296 F771–F779.

- Yndestad A, Damås JK, Øie E, Ueland T, Gullestad L, Aukrust P. Role of inflammation in the progression of heart failure. *Curr Cardiol Rep*. 2007. May;9(3):236-41. Review.
- Yudkin JS, Stehouwer CDA, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *ArteriosclerThrombVasc Biol*. 1999;19:972-8
- Zanger D, Yang BK, Ardans J, Waclawiw MA, Csako G, Wahl LM, Cannon RO 3rd. Divergent effects of hormone therapy on serum markers of inflammation in postmenopausal women with coronary artery disease on appropriate medical management. *J Am CollCardiol*. 2000 Nov 15;36(6):1797-802.
- Zapater P, Novalbos J, Gallego-Sandín S, Hernández FT, Abad-Santos F. Gender differences in angiotensin-converting enzyme (ACE) activity and inhibition by enalaprilat in healthy volunteers. *J Cardio vasc Pharmacol*. 2004 May;43(5):737-44
- <http://www.saude.gov.br/>. Ministério da Saúde lança plano nacional para reduzir mortes por doenças crônicas não transmissíveis. 18/08/2011. Disponível em: <http://isags-unasul.org/site/2011/08/brasil-plano-pretende-reduzir-mortes-por-doencas-cronicas/>.