

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Amarylis Claudine Bonito Azeredo Wanschel

**“Aterogênese em camundongos fêmeas LDLr^{-/-} : efeito da
S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC)”**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia
da *Universidade Estadual de Campinas*, para
obtenção do Título de Mestre em Biologia
Funcional e Molecular, na área de Fisiologia**

Orientadora: Profa. Dra. Marta Helena Krieger

CAMPINAS - SP
2006

UNIDADE BC
 Nº CHAMADA:
T/UNICAMP
W188a
 V. _____ Ed. _____
 TOMBO BC/ 71359
 PROC. 16.145-07
 C ☐ D ☒
 PREÇO 1400
 DATA 07-02-07
 BIB-ID 399372

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

W188a

Wanschel, Amarylis Claudine Bonito Azeredo
 Aterogênese em fêmeas LDLr-/-: efeito da S-nitroso-
 N-acetilcisteína (SNAC) / Amarylis Claudine Bonito
 Azeredo Wanschel. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Marta Helena Krieger.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
 Campinas, Instituto de Biologia.

1. Aterosclerose. 2. Lipoproteínas de baixa
 densidade. 3. Óxido nítrico. 4. Hipertensão. 5.
 Estrógeno? I. Krieger, Marta Helena. II. Universidade
 Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Atherogenesis in LDLr-/- female: effects of S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC).

Palavras-chave em inglês: Atherosclerosis; Low density lipoproteins; Nitric oxide; Hypertension; Estrogen.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Marta Helena Krieger, Eliana Cotta de Faria, Dora Maria Grassi-Kassisse.

Data da defesa: 20/02/2006.

Data da Defesa: 20/02/2006

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Marta Helena Krieger (orientadora) 

Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza

Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse 

Prof. Dra Eliana Cotta de Faria 

Prof. Dra Helena Coutinho Franco de Oliveira

A Mei (*in memoriam*) que me ensinou a amar incondicionalmente,
trouxe muitas alegrias, fez parte de minha vida e deixou muitas
saudades até hoje. Aos camundongos que foram sacrificados em prol da
pesquisa, que suas vidas sirvam "efetivamente" para um passo mesmo
que infimo no entendimento de mecanismos que são peças chave nas
descobertas da cura de doenças podendo algum dia salvar outras vidas.

20070798

Dedico

À Mel (*in memoriam*) que me ensinou a amar incondicionalmente, trouxe muitas alegrias, fez parte de minha vida e deixou muitas saudades até hoje. Aos camundongos que foram sacrificados em prol da pesquisa, que suas vidas sirvam “efetivamente” para um passo mesmo que ínfimo no entendimento de mecanismos que são peças chave nas descobertas da cura de doenças podendo algum dia salvar outras vidas.

Agradecimentos especiais

Agradeço a minha família, meu pai, minha mãe, minha avó, Angélica e principalmente aos meus irmãos Tati, Ciro, Pris e a minha sobrinha Sabrina pela pureza de sentimentos e pelo verdadeiro amor de família.

Agradecimentos

Gostaria em primeiro lugar de agradecer a Deus, pela oportunidade de poder trabalhar na área que gosto, tendo a possibilidade de estudar com remuneração, pois se existe vocação para determinada tarefa, encontrei a minha no estudo e na pesquisa.

Agradeço a minha orientadora Marta por ter acreditado em mim, e por ter me oferecido a possibilidade de entrar na área científica, sendo sempre uma grande mulher, uma amiga sem perder o profissionalismo e apaixonada pelo que faz.

A minha equipe de laboratório, José Antônio (pelos docinhos mineiros, piadas, conselhos e ensinamentos), Rodrigo (pelas atenções e carinhos sempre preocupados), Leandro (pelas cantorias), Daniel, Viviane (pelo carinho e pelas afinidades), Cláudia (pelos conselhos e dicas experientes), Mika (pela admiração) e Adriana, agradeço a todos vocês pelos momentos de estudo, discussão, trabalho e é claro boas risadas para deixar os momentos mais felizes.

Agradeço ao Ivo (pela simpatia e eficiência com que resolvia a todos os pedidos), Alexandra, a Dona Zefa, a Dona Lú (pelos sorrisos de todos os dias e cafezinhos de todas as tardes), Léscio, Andréia, Marina pela ajuda prestada a cada dia, pois sem vocês o término deste trabalho seria impossível.

Agradeço aos meus amigos de “departamento” Karina (por ter me ajudado a superar os percalços deste mestrado, admiro muito sua força e classe), Héder (pelos sorrisos sinceros e histórias contadas), Claudinha (pelas conversas e reuniões do “Claudinhas Bujigangas” momentos de “desestress”), Emiliane, Gi, Danilo, Fer, Edla, pelas festas e pelos momentos em “república”, com eles aprendi que a vida é mais leve do que parece, só depende como nós a levamos.

Ao meu amorzinho Alessandro, que esteve presente e atuante desde os meus primeiros dias de iniciação científica até hoje, e me ensinou a transformar um protocolo em um experimento, nas diversas área da vida.

Agradeço as minhas amigas de faculdade Karen e Marcela pelo ombro amigo sempre que precisei de ajuda, e como precisei...

A Maria do Carmo, minha professora de inglês (pelos chás no final da tarde e conversas amigas), minha amiga, minha família em Campinas.

Ao Antônio, meu amigo pela ajuda nos experimentos de biologia molecular que teimavam em “não dar certo”. Benditas bandas que não aparecem....

Às entidades de fomento à pesquisa CAPES e FAPESP que financiaram esse projeto.

“Viver, e não ter a vergonha de ser feliz
Cantar e cantar e cantar
A beleza de ser um eterno aprendiz
Ah meu Deus eu sei, eu sei
Que a vida devia ser bem melhor e será
Mas isso não impede que eu repita
É bonita, é bonita e é bonita”

Gonzaguinha

ÍNDICE

Lista de Abreviações.....	x
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xiii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi
1- Introdução.....	1
2- Objetivos.....	12
3- Materiais e Métodos.....	13
4- Resultados.....	19
5- Discussão.....	35
6- Conclusões.....	42
7- Referências Bibliográficas.....	46

LISTA DE ABREVIACÕES

°C – graus centígrados

CML – células musculares lisas

µm – micrômetros

AMPc (cyclic adenosine monophosphate) – adenosina monofosfato cíclica

ApoB (apolipoprotein B) – apolipoproteína B

ApoE (apolipoprotein E) – apolipoproteína E

bpm – batimentos por minuto

DAB (diaminobenzidine) – diaminobenzidina

E₂ - estrógeno

EPM – erro padrão da média

FC – frequência cardíaca

FRDE – fator relaxante derivado do endotélio

FCT- fêmeas (LDLr^{-/-}) do grupo controle

FHC- fêmeas (LDLr^{-/-}) do grupo sob dieta hipercolesterolêmica

FSNAC- fêmeas (LDLr^{-/-}) do grupo sob dieta hipercolesterolêmica + tratamento com S-nitroso-N-acetilcisteína

FWT- fêmeas selvagens do grupo wild type (C57Bl6)

HDL (high-density lipoprotein) – lipoproteína de alta densidade

ip – intraperitonal

ko - knockout

LDL (low density lipoprotein) – lipoproteína de baixa densidade

LDLr^{-/-} - knockout para o receptor de LDL

mg/Kg – miligrama por quilograma

mmHg – milímetros de mercúrio

MCT- machos (LDLr^{-/-}) do grupo controle

MHC- machos (LDLr^{-/-}) do grupo sob dieta hipercolesterolêmica

MSNAC- machos (LDLr^{-/-}) do grupo sob dieta hipercolesterolêmica + tratamento com S-nitroso-N-acetilcisteína

MWT- machos selvagens do grupo wild type (C57Bl6)

[•]NO (nitric oxide) – óxido nítrico

NOS (nitric oxide synthase) – óxido nítrico sintase

NOS_e – óxido nítrico sintase endotelial

NOS_i – óxido nítrico sintase induzida

NOS_n – óxido nítrico sintase neuronal

O₂⁻ - ânion superóxido

PAD – pressão arterial diastólica

PAM – pressão arterial média

PAS – pressão arterial sistólica

PBS (phosphate-buffered saline) – tampão fosfato

ROS (reactive oxygen species) – espécies reativas de oxigênio

RSNOs (S-nitrosothiols) – S-nitrosotióis

SHR (spontaneously hipertensive rats) - ratos espontaneamente hipertensos

SNAC (S-nitroso-N-acetylcysteine) – S-nitroso-N-acetilcisteína

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- <i>Fotomicrografias de seções transversais da aorta proximal ascendente de camundongos fêmeas LDLr-/- e C57Bl/6 mostrando lesões ateroscleróticas representativas.....</i>	19
Figura 2- <i>Quantificação da área total da lesão aterosclerótica da secção transversal em aorta proximal ascendente de camundongos LDLr-/- fêmeas.....</i>	20
Figura 3- <i>Quantificação da área total da lesão aterosclerótica da secção transversal em aorta proximal ascendente de camundongos LDLr-/- machos e fêmeas.....</i>	21
Figura 4- <i>Pressão arterial sistólica de camundongos LDLr-/- e C57Bl/6 machos e fêmeas.....</i>	25
Figura 5- <i>Pressão arterial diastólica de camundongos LDLr-/- e C57Bl/6 machos e fêmeas.....</i>	27
Figura 6- <i>Pressão arterial média de camundongos LDLr-/- e C57Bl/6 machos e fêmeas.....</i>	28
Figura 7- <i>Frequência cardíaca de camundongos LDLr-/- e C57Bl/6 machos e fêmeas.....</i>	30
Figura 8- <i>Peso ventricular esquerdo relativo (mg/g peso corpóreo) em camundongos LDLr-/- e C57Bl/6 machos e fêmeas.....</i>	31
Figura 9- <i>Fotomicrografias da região do arco aórtico de camundongos fêmeas LDLr-/- e WT, mostrando a expressão de NOSe.....</i>	33
Figura 10- <i>Fotomicrografias da região do arco aórtico de camundongos fêmeas LDLr-/- e WT , mostrando a expressão de NOSn.....</i>	34
Figura 11- <i>Fotomicrografias da região do arco aórtico de camundongos fêmeas LDLr-/- e WT mostrando a expressão de NOSi.....</i>	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação da área total da lesão aterosclerótica da secção transversal em aorta proximal ascendente de camundongos LDLr-/- machos e fêmeas.	21
Tabela 2. Valores plasmáticos em camundongos fêmeas C57Bl6 e LDLr-/-	23
Tabela 3. Pressão arterial e frequência cardíaca em camundongos fêmeas C57Bl6 e LDLr-/-.....	24
Tabela 4. Pressão arterial sistólica de camundongos machos e fêmeas C57Bl6 e LDLr-/- dos respectivos grupos.....	25
Tabela 5. Pressão arterial diastólica de camundongos machos e fêmeas C57Bl6 e LDLr-/-.....	26
Tabela 6. Pressão arterial média de camundongos machos e fêmeas C57Bl6 e LDLr-/-.....	28
Tabela 7. Frequência cardíaca de camundongos machos e fêmeas C57Bl6 e LDLr-/-.....	29
Tabela 8. Peso ventricular esquerdo relativo de camundongos machos e fêmeas C57Bl6 e LDLr-/-.....	31
Quadro Resumo Comparativo das Respostas dos Camundongos C57Bl6 e LDLr-/- Machos e Fêmeas.....	46

6. RESUMO

A incidência de riscos de doença aterosclerótica cardiovascular é maior em homens do que em mulheres na fase reprodutiva, essa diferença diminui quando diminui a produção de estrógenos após a menopausa. Uma série de estudos sugere que essa diferença em ambos os sexos pode ser causada em parte, pela ação pró-aterogênica dos andrógenos. O objetivo deste estudo foi verificar a participação do dimorfismo sexual em camundongos adultos LDLr-/- no efeito vasculoprotetor promovido pelo tratamento com a S-nitrosotiol-N-acetilcisteína (SNAC) na fase inicial da aterogênese por meio dos seguintes avaliações : a) expressão fenotípica da hipertensão; b) desenvolvimento de ateroma; c) perfil lipídico; d) imunorreatividade das isoformas das NOS vasculares. Camundongos machos e fêmeas com 3 meses de idade foram avaliados nos seguintes grupos experimentais: selvagens C57BL/6 (WT) sob dieta comercial; LDLr-/- sob dieta comercial com os controles (CT); LDLr-/- sob dieta hipercolesterolêmica (HC); LDLr-/- sob diet hiperlipidêmica associado ao tratamento com SNAC 0,51µm ip/dia (HC+SNAC).

Após 2 semanas de tratamento com administração de dieta hipercolesterolêmica, verificou-se que as fêmeas desenvolveram lesões ateroscleróticas na aorta proximal ascendente 50% menores em relação aos machos. Tais evidências sugerem o papel protetor do estrógeno presente nas fêmeas adultas no estágio inicial da aterosclerose. O tratamento com SNAC promoveu a redução em 50% na instalação do ateroma em ambos sexos, evidenciando não haver relação com o dimorfismo sexual. Contudo, o perfil lipídico das

fêmeas mostrou valores mais elevados que os encontrados em machos, tanto de colesterol (COL), como de triglicérides (TG) plasmáticos nos camundongos sob dieta hipercolesterolêmica. Assim, o tratamento com SNAC não impediu o aumento dos teores lipídêmicos induzidos pela dieta hipercolesterolêmica em fêmeas, inferindo que a condição não está correlacionada ao tamanho da área de lesão desenvolvida. Camundongos fêmeas LDLr-/- sob dieta aterogênica evidenciaram aumento de cerca de 10% na pressão arterial, quando comparados aos respectivos camundongos selvagens (WT). O tratamento com SNAC preveniu totalmente a hipertensão induzida pela dieta hipercolesterolêmica. Contudo, nos machos tal hipertensão foi verificada ocorrer em camundongos LDLr-/- sem dieta hipercolesterolêmica, e o tratamento com SNAC não produziu efeito preventivo na hipertensão. Tais resultados indicam que a gênese da hipertensão é diferente nos dois sexos, sugerindo a participação das vias androgênicas. As fêmeas não apresentaram hipertrofia ventricular esquerda ou redução na frequência cardíaca associada à hipertensão, a qual foi evidenciada nos machos sob as mesmas condições. Assim o conjunto de alterações hemodinâmicas indica que as fêmeas sofreram um menor impacto do que camundongos machos nas alterações cardiovasculares estudadas. A expressão de NOS foi evidenciada na aorta das fêmeas LDLr-/- sob dieta comercial (CT), contudo ausente nas WT e, sob dieta hipercolesterolêmica (HC) a sua imunorreatividade foi menor que no animal controle porém expressiva e difusa, as expressões tanto no controle como no animal HC foram reduzidas pelo tratamento com a SNAC. Estas alterações indicaram a sua participação na disfunção endotelial presente neste modelo e o fato de que o efeito protetor promovido pela SNAC está associado às vias NO/NOS.

6. ABSTRACT

The incidence of risk of coronary artery disease (CAD) is greater in men than in woman during the reproductive years, and this gender difference diminishes after cessation of estrogen production after menopause (Kannel et al, 1976). Many studies have been suggested also that this gender difference may be caused in part by proatherogenic actions of androgens. The aim of this study was to verify the role of sexual dimorphism in LDLr^{-/-} mice in the vasculoprotector effect treatment promoted by S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) in the initial phase of atherogenesis. The following parameters were evaluated: 1- phenotypic expression of the hypertension; 2- lesion area development; 3- plasma lipid levels; 4- localization of NOS using immunohistochemistry. Male and female mice 3 months old were evaluated in experimental groups following: C57Bl/6 wild type (WT) chow diet; LDLr^{-/-} control group (CT) chow diet; LDLr^{-/-} hypercholesterolemic diet (HC); LDLr^{-/-} hypercholesterolemic diet plus SNAC 0.51 μ mol/Kg ip/daily (SNAC). After treatment for 2 weeks the female developed a 50% decrease lesion area in the proximal aorta as compared to males. This evidence indicated the protector role of the estrogen in female in the initial stage of atherosclerosis. The treatment with SNAC promoted a 50% reduction in the installation of atherosclerosis in both sexes with no sexual dimorphism. In female the lesion area was not correlated with the average plasma cholesterol levels. Female mice LDLr^{-/-} under a hypercholesterolemic diet showed an increase of 10% in blood pressure compared with the background (WT). The treatment with SNAC prevented the hypertension induced by the hypercholesterolemic diet. Nevertheless male hypertension is associated with mice LDLr^{-/-} and chow diet treatment does not prevent hypertension. These results showed that

hypertension genesis is different in both sexes suggesting the participation of androgenic pathways. The males showed left ventricular hypertrophy and decreased heart rate associated with hypertension, but the female in the same conditions did not show. Thus is hemodynamic alteration set indicate that female have a less impact than male mice in the studied cardiovascular alterations. The expression of the three types of NOS was evident in aorta of the female LDLr^{-/-} chow diet, although absent in WT. In female LDLr^{-/-} hypercholesterolemic diet there was enhanced immunoreactivity. This overexpression was decreased by treatment with the SNAC. These alterations participated in endothelial dysfunction present in this model and the protector effect promoted by SNAC is associated with the NO/NOS pathways.

1. INTRODUÇÃO

Aterosclerose e modelos experimentais

Nos últimos anos, camundongos geneticamente modificados têm sido utilizados em inúmeros experimentos envolvendo a aterosclerose. A procriação de diferentes linhagens possibilitou induzir diferentes graus de susceptibilidade a esta patologia e uma série de espécies variantes com os genes que regulam o metabolismo das lipoproteínas e as concentrações de colesterol tem sido desenvolvidas (Paigen *et al*, 1987). Os camundongos selvagens são altamente resistentes à aterosclerose, o que dificultou o uso deste modelo animal para identificação dos genes que controlam esta complexa patologia. Inicialmente, diversos autores contornaram esse problema e induziram a formação de lesões ateroscleróticas por meio de alimentação com uma dieta hiperlipidêmica, constituída de 1,25% de colesterol, 15% gordura e 0,5% de ácido cólico (Vesselinovitch e Wissiler, 1968; Vesselinovitch *et al*, 1968). Uma vez alimentadas por vários meses com tais dietas, certas cepas desenvolvem lesões com estrias de gordura na aorta proximal (Roberts *et al*, 1976). Contudo, a engenharia genética possibilitou o desenvolvimento de modelos de camundongos transgênicos capazes de desenvolver lesões avançadas em contraste com as discretas lesões observadas em camundongos selvagens alimentados com dietas aterogênicas (Breslow, 1996). Atualmente, há concordância de que camundongos *knockout* para ApoE (apolipoproteína E) ou para o receptor de LDL (LDLr-/-) podem desenvolver lesões que compartilham aspectos semelhantes às lesões humanas avançadas (Rosenfeld *et al*, 2000; Calara *et al*, 2001; Johnson e Jackson, 2001; Song *et al*, 2001).

Assim, os camundongos *knockout* LDLr^{-/-} têm sido bastante utilizados para diferentes estudos da aterosclerose, beneficiando o entendimento dos mecanismos moleculares e celulares ateroprotetores, inclusive àqueles mediados pelo estrógeno. Os camundongos LDLr^{-/-} assemelham-se a condição de hipercolesterolemia familiar humana (Trieu e Uckun, 1998) e, embora existam diferenças no transporte e no metabolismo de lipídios entre camundongos e humanos, alterações em etapas específicas das vias tornam as duas espécies similares.

Disfunção endotelial e hipertensão arterial

A hipertensão arterial constitui-se de uma das principais causas de morbidade e mortalidade em humanos, caracterizando-se por um quadro multifatorial sob controle poligênico (Dominiczak *et al*, 2000). Em linhas gerais, a hipertensão é diagnosticada através do aumento progressivo da pressão arterial média ao longo da vida do indivíduo. Isso expõe o coração a uma sobrecarga hemodinâmica que desencadeia uma resposta hipertrófica das células cardíacas. O interesse no estudo desta patologia se justifica principalmente por estimativas recentes sobre as taxas de mortalidade derivadas de anomalias das funções cardiovasculares, que indicam que as doenças cardíacas e coronarianas são responsáveis por uma grande porcentagem dos óbitos anuais, e este padrão se confirma em muitos países em desenvolvimento como Brasil, onde a taxa de óbito é de 36,9% em homens e 28% em mulheres (www.ibge.gov.br).

A disfunção endotelial é o elo de ligação entre hipertensão arterial, hiperlipidemia e o desenvolvimento da aterosclerose. As alterações na função do endotélio verificadas no quadro hipertensivo parecem ser devidas às ações efetuadas pelos seguintes mediadores: óxido nítrico (NO), endotelina e angiotensina II (Ang II). Uma vez que, o endotélio atua como regulador do fluxo sanguíneo tecidual e é um dos principais órgãos alvo responsável pelo controle da resistência periférica, a perda de tônus vascular dependente do endotélio está intimamente associada à hipertensão arterial (K-Laflame *et al*, 1998).

A integridade do endotélio exerce importância tanto nos mecanismos de regulação da motricidade arterial *per se* como nos de controle de pressão arterial promovidos pelo sistema renina-angiotensina centrais e periféricos (Goto *et al*, 2004). Contudo, tem sido demonstrado que a própria hipertensão, os mediadores como a Ang II atuam pela via através da redução na produção do NO, promovendo um aumento na produção dos fatores constritores derivados do endotélio e o aumento na geração de radicais livres derivados do oxigênio, resultando na disfunção endotelial (Vanhoutte, 1996). Há concordância na atual literatura, de que a disfunção endotelial constitui-se de fator agravante e potente na perpetuação do quadro hipertensivo, atuando na precipitação de eventos trombóticos e na promoção da estenose e remodelamento vascular, por meio da estimulação da proliferação de células musculares lisas (CML). O efeito hipertensivo promovido pelos antagonistas das óxido nítrico sintases (NOS), em diversos modelos de estudo (Zatz e Baylis, 1998; Wang *et al*, 2003), bem como a verificação do aumento da pressão arterial em camundongos homozigotos com a deleção do gene da NOS endotelial (Biecker *et al*, 2004), demonstraram claramente o papel do NO produzido e liberado no endotélio na regulação da pressão arterial.

Óxido nítrico e alterações cardiovasculares

Óxido nítrico exerce múltiplas funções regulatórias nos organismos vivos e em humanos (Moncada *et al*, 1991) e tem sido objeto de intensa pesquisa nos últimos anos. É reconhecido que o NO atua na vasodilatação, na inibição da agregação/adesão plaquetária, na modulação da neurotransmissão e neuroproteção, bem como na toxicidade mediada pelos macrófagos (Marin e Martinez, 1997). Todos esses efeitos têm como importante – embora de modo algum único – mecanismo transdutor intracelular a ativação da fração solúvel da guanilil ciclase e a elevação dos níveis de cGMP. O óxido nítrico é liberado pela ativação da NO sintase (NOS) neural ou endotelial, essa ativação é mediada pela Ca^{2+} - calmodulina, embora o NO tenha uma meia-vida de apenas poucos segundos, difunde-se tão rapidamente para células vizinhas (exemplo: do endotélio para células musculares do vaso), que nelas ativa a guaniliciclase citoplasmática, esta transforma GTP em cGMP, este ativa, como segundo mensageiro, a proteino-quinase G (PKG). Esta reduz a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de modo ainda não completamente elucidado, provocando a vasodilatação. O desequilíbrio na biodisponibilidade de NO tem sido observado nas várias condições patológicas já citadas acima, e nos processos comumente descritos como biorregulatórios (Ford Lorkovic, 2002). O excessivo aporte de NO (micromolar) pode causar morte das células através de processos como estresse oxidativo, danos no DNA e desequilíbrio de cálcio citossólico. Por outro lado, a insuficiência de aporte de NO, geralmente encontrado em níveis basais, ao redor de valores na faixa micromolar, ou o aumento da sua degradação está intimamente relacionada às patologias associadas à disfunção endotelial. Sendo que esta última é o

evento primário na aterogênese, onde o NO produzido pelo endotélio, segundo Channon *et al*, 2000, promove a inibição de:

1. Adesão, agregação e ativação das plaquetas induzida pela trombina;
2. Proliferação, migração de células da musculatura lisa e síntese de matriz extracelular;
3. Adesão e ativação de neutrófilos e monócitos, apresentando efeitos inflamatórios;
4. Formação de LDL oxidada que é altamente aterogênica, apresentando efeitos antioxidantes.

Tais ações do NO promovem a manutenção da integridade funcional e estrutural do endotélio constituindo um evento inicial que ocorre na aterogênese e na doença coronariana cardíaca (Ignarro *et al*, 2002). A redução na biodisponibilidade do NO, pode ser suprida, mesmo que parcialmente, através da administração de doadores de NO (Groves *et al*, 1995; Bult, 2000).

Nitrosotióis e seus efeitos

Dentre os compostos que apresentam grande potencial como doadores de NO encontram-se os S-nitrosotióis (RSNOs) de baixo peso molecular. Os RSNOs são espécies endógenas e têm sido detectados em fluídos do revestimento das vias aéreas, nas plaquetas e em neutrófilos. Eles podem assim, atuar como carreadores de NO na forma de tíois livres ou proteínas contendo cisteína em sistemas biológicos (Stamler *et al*, 1992). Os RSNOs

podem ser então, ferramentas úteis no tratamento de doenças que envolvem disfunções na disponibilidade de NO (Eiserich *et al*, 1998).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que os S-nitrosotióis (RSNOs), apresentam importante ação vasodilatadora em ratos normotensos e hipertensos (Ricardo *et al*, 2002). Também foram estudados em camundongos LDLr^{-/-} machos sob dieta hiperlipidêmica a administração da S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) e foi mostrado o efeito protetor deste na aterogênese nos animais tratados durante 15 dias (Krieger *et al*, 2005). Neste estudo, foi verificado que a administração de SNAC promoveu uma prevenção de 55% da área da placa aterogênica, mas não preveniu as alterações de motricidade vasculares dependentes do endotélio. O mecanismo responsável por estes efeitos podem ter sido devidos à ação direta do NO e/ou o decréscimo dos níveis de superóxido. Recentemente, verificamos que tais camundongos com a deleção gênica do receptor de LDL e sob dieta comercial quando comparados aos seu “background” (C57Bl/6), apresentaram o fenótipo hipertenso, bradicárdico com importante déficit na contratilidade cardíaca (Garcia *et al*, 2005). A aterosclerose induzida pela dieta nestes camundongos *knokout* (LDLr^{-/-}), promoveu a formação inicial do ateroma que foi acompanhada de desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda. O tratamento com SNAC neste modelo com fenótipo hipertenso e dieta indutora de hiperlipidemia, preveniu em 100% a progressão da hipertrofia e restaurou a resposta contrátil à noradrenalina, mas não foi capaz de corrigir a hipertensão, indicando que ambos efeitos são independentes.

Alterações cardiovasculares relacionadas ao sexo

Estudos têm demonstrado que a hipertensão é mais comum em homens de 30 a 45 anos de idade do que em mulheres da mesma idade, sugerindo que a diferença entre os sexos exerce um papel importante nos mecanismos de controle da pressão arterial (Thompson e Khalil, 2003; Orshal e Khalil, 2004; Mitchell *et al*, 2004). Importantes efeitos dos hormônios sexuais nos mecanismos de controle neural e renal da pressão arterial têm sido propostos (Peng *et al*, 2003; Reckelhoff e Fortepiani, 2004; Harrison-Bernard *et al*, 2003) como, por exemplo, o fato do estradiol inibir a liberação de renina, enquanto que a testosterona ativa o sistema renina angiotensina (Harrison-Bernard *et al*, 2003; Thompson e Khalil, 2003; Reckelhoff e Fortepiani, 2004). Assim, estudos tanto em modelos experimentais como em humanos, têm demonstrado uma série de efeitos dos hormônios sexuais no mecanismo de controle da pressão arterial (Thompson e Khalil, 2003; Dubey *et al*, 2004; Orshal e Khalil, 2004).

Tem sido observado, do ponto de vista vascular, que as mulheres na pré-menopausa encontram-se hemodinamicamente mais protegidas do que homens na mesma idade, sendo menor, portanto, a incidência de doenças cardiovasculares (DCV), este fenômeno pode ser parcialmente explicado, tanto pelo fato da liberação de NO ser maior em vasos sanguíneos de fêmeas do que em machos, visto em experimentos com ratos (Orshal e Khalil, 2004), como ao papel protetor exercido pelo estrógeno E₂ (Gebara *et al*, 2003). Uma vez que este possui grande afinidade pelo endotélio e células musculares lisas (CML), devido à presença de receptores específicos de estrógeno (ER, subtipos ER- α e ER- β) (Powers *et al*, 1991;

Tostes *et al*, 2003), e ainda, inúmeras variantes descritas (Mendelsohn *et al*, 2002; Zhu *et al*, 2002). Nos camundongos, foram descritas 3 isoformas dos receptores para estrógeno β (Leygue *et al*, 1998), contudo, ainda não existem referências sobre os agonistas preferenciais desses receptores.

O estrógeno se difunde através da membrana plasmática e forma complexos com receptores nucleares citosólicos, os quais depois se ligam à cromatina e estimulam a transcrição do gen, sendo estes caracterizados como indução de efeitos genômicos. Por outro lado, o estrógeno também pode se ligar a receptores e gerar sinais na membrana plasmática de células vasculares os quais induzem efeitos rápidos, denominados não genômicos. Assim, o estrógeno (E_2) pode influenciar a produção de NO por meio da ativação dos receptores (ERs), induzida pela via genômica, bem como promover a ativação da NOSe (Khalil, 2005).

Os mecanismos pelos quais são obtidos os efeitos ateroprotetores dos hormônios sexuais ainda não estão completamente elucidados. A capacidade da terapia de reposição de estrógeno no favorecimento das alterações no perfil lipídico tem sido mostrada ser modesta, pois limita somente em parte, a ateroproteção em humanos (Grady, 1992). Estudos em alguns modelos animais mostraram que o papel ateroprotetor desempenhado pelo E_2 foi completamente independente das alterações no perfil lipídico plasmático (Hough *et al*, 1986; 1997; Marsh *et al*, 1999). Elhage *et al*, (1997) verificaram que a redução da aterosclerose não está acompanhada da redução do colesterol plasmático, pelo menos em doses baixas e fisiológicas, pellets com (0,1mg) de estrógeno, e sugeriram que o E_2 protege

contra aterosclerose usando como alvos componentes celulares e moleculares da inflamação (Hodgin e Maeda, 2005).

Adicionalmente, o efeito ateroprotetor dos andrógenos em camundongos resulta em grande parte, da conversão local de andrógeno em estradiol, na aorta pela aromatase (Nathan, 2001). Assim, a maioria dos estudos tem focalizado mediadores locais que podem contribuir para os efeitos cardioprotetores do E₂ através da ação direta na parede do vaso. Em resumo, inúmeras evidências têm sugerido que o NO e o E₂ possuem efeitos protetores no ambiente vascular. Em primeiro lugar, o NO e o E₂ são responsáveis por potencializar diversas funções ateroprotetoras, como a inibição da adesão leucocitária, da proliferação das células musculares lisas e agregação plaquetária, bem como promover vasodilatação (Nathan e Chaudhuri, 1997; Mendelsohn e Karas, 1999) e redução na pressão arterial (Akkad *et al*, 1997 e Seely *et al*, 1999).

Assim, a ausência da óxido nítrico sintase endotelial (NOS_e) em camundongos transgênicos resulta em hipertensão (Huang, 1995 e Shesely, 1996), vasodilatação disfuncional (Faraci *et al*, 1998) e aumento da proliferação das células musculares lisas em resposta a injúria (Rudic, 1998). Em camundongos ApoE^{-/-}, a perda da NOS_e resultou em aumento do tamanho da lesão aterosclerótica (Knowles, 2000). Similarmente, foi verificada que a ausência do E₂ causado por gonadectomia, contribuiu para aumento na proliferação das células musculares lisas em resposta a injúria em camundongos (Mendelsohn e Karas, 1999). E, ainda, neste estudo foi verificado que ambas, a expressão do gen da NOS_e e a atividade da enzima, são aumentadas/estimuladas pelo E₂. Concentrações fisiológicas de E₂ estimulam o RNA mensageiro para NOS_e em células endoteliais e a expressão da proteína, por um longo tempo, via mecanismo dependente do receptor (Weiner, 1994 e Holm, 1997).

E ainda, a inibição da síntese de NO diminui alguns dos efeitos do E₂ na vasculatura. Contudo, camundongos Apoe -/- tratados com L-NAME não mostraram alterações nos efeitos ateroprotetores promovidos pelo E₂ (Elhage *et al*, 1997). Mas, é importante ressaltar que esta estratégia farmacológica foi limitada porque o tratamento com L-NAME não foi específico a NOSe, e sim as diferentes isoformas.

O efeito vasorrelaxante do estrógeno ultrapassa àqueles da progesterona ou testosterona, então um grande nível de estrógeno plasmático em fêmeas pode explicar a redução na contração vascular de fêmeas comparada com machos, porém, a diferença de sexo na contração vascular pode ser relacionada a uma relativa abundância de receptores hormonais, fêmeas possuem mais receptores estrogênicos (ERs) em suas artérias do que machos (Collins *et al*, 1995).

O dimorfismo sexual na reatividade vascular pode envolver fatores de contração derivados do endotélio, como a endotelina (ET-1), e o tromboxano (A₂). A quantidade de ET-1 liberado nas células endoteliais é menor em fêmeas do que em machos de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e a diferença de sexo na produção de ET-1 pode estar relacionada ao estrógeno (Khalil, 2005).

Hormônios sexuais podem também mudar a expressão vascular de receptores para Ang II, uma vez que o estrógeno induz a uma diminuição na expressão, enquanto que a progesterona induz a um aumento na regulação da expressão do receptor Ang II tipo 1 (AT₁) (Khalil, 2005). E, ainda, tem sido visto que o estrógeno tem propriedades antioxidantes que podem diretamente afetar a biodisponibilidade do NO no ambiente vascular.

A finalidade deste estudo foi verificar a participação do dimorfismo sexual em camundongos adultos LDLr-/- no efeito vasculoprotetor promovido pelo tratamento com o nitrosotiol S-nitrosotiol-N-acetilcisteína (SNAC) na fase inicial da aterogênese por meio das seguintes avaliações feitas em camundongos fêmeas e machos adultos, verificando-se os seguintes aspectos: a) fenótipo hipertenso; b) desenvolvimento de ateroma; c) perfil lipídico; d) imunorreatividade das NOS vasculares. Tais aspectos foram avaliados nas seguintes condições: a) da presença da deleção gênica, por meio da comparação dos camundongos LDLr-/- ao seu ancestral selvagem C57Bl6; b) alimentação com dieta rica em colesterol ; c) tratamento com o S-nitrosotiol-N-acetilcisteína, doador de óxido nítrico.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

Caracterizar os efeitos do tratamento com S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) em camundongos fêmeas LDLr-/- nos seguintes aspectos: área de lesão aterosclerótica aórtica, perfil hemodinâmico, perfil lipidêmico e expressão das óxido nítrico sintases comparando com camundongos machos sob as mesmas condições.

2.2 Específicos

- Verificar a participação da deleção do gen do receptor de LDL no fenótipo cardiovascular de fêmeas adultas;
- Caracterizar a área de lesão aterosclerótica na raiz aórtica às modificações do perfil lipídico e hemodinâmico de fêmeas adultas, induzidos por dieta hipercolesterolêmica durante 15 dias;
- Verificar o efeito do tratamento com a SNAC na aterogênese e nas alterações hemodinâmicas;
- Avaliar a disfunção endotelial por meio da imunorreatividade das NOS induzida e constitutivas de artérias dos camundongos estudados;
- Avaliar a influência do dimorfismo sexual no fenótipo hipertenso e na formação de ateroma induzidos pela dieta neste modelo experimental.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados com camundongos selvagens (cepa C57BL6) e camundongos *knockout* para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}), fêmeas e machos com 3 meses de idade, pesando 18 ± 10 g. Os animais foram adquiridos no Laboratório Jackson - EUA e criados no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Estadual de Campinas (Campinas, SP, Brasil) com controle de temperatura e ciclo claro/escuro (12h). O uso dos animais e o protocolo experimental foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEAA)-IB - UNICAMP sob protocolo número 521-1.

Os camundongos foram divididos em 8 grupos experimentais (n= 6-15) assim constituídos:

Grupo 1) camundongos machos selvagens os quais receberam ração comercial (Nuvital®) por 15 dias (MWT);

Grupo 2) camundongos machos LDLr^{-/-} que receberam ração comercial (Nuvital®) por 15 dias (MCT);

Grupo 3) camundongos machos LDLr^{-/-} que receberam ração hipercolesterolêmica com 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico (AIN93G) por 15 dias (MHC);

Grupo 4) camundongos machos LDLr^{-/-} que receberam ração hipercolesterolêmica com 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico (AIN93G) e tratamento com SNAC (produzido no Laboratório de Bioensaios “*in vitro*” Departamento de Bioquímica -Instituto de Biologia/

UNICAMP pela PHD Sílvia Mika Shishido), durante 15 dias, na dose de 0,51 μ mol/Kg ip (intraperitoneal) (MSNAC);

Grupo 5) camundongos fêmeas selvagens os quais receberam ração comercial (Nuvital®) por 15 dias (FWT);

Grupo 6) camundongos fêmeas LDLr/- que receberam ração comercial (Nuvital®) por 15 dias (FCT);

Grupo 7) camundongos fêmeas LDLr/- que receberam ração hipercolesterolêmica com 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico (AIN93G) por 15 dias (FHC);

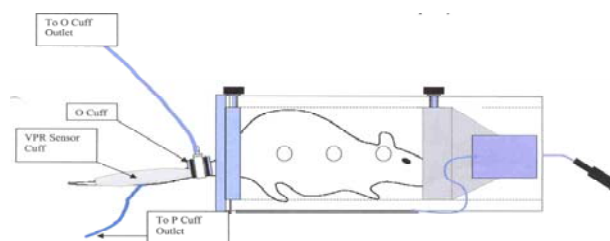
Grupo 8) camundongos fêmeas LDLr/- que receberam ração hipercolesterolêmica com 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico (AIN93G) mais tratamento com SNAC durante 15 dias, na dose de 0,51 μ mol/Kg ip (intraperitoneal) (FSNAC).

Os animais foram mantidos em gaiolas com número máximo de 6 animais por gaiola, tiveram livre acesso às respectivas dietas e receberam água *ad libitum*.

3.2 Medida de Pressão Arterial de Frequência Cardíaca

Inicialmente foi desenvolvido um protocolo para adaptação dos camundongos ao sistema Kent Scientific (XBP 1000) de medida de pressão arterial caudal segundo Krege *et al*, 1995. Após uma série de testes, verificamos que este protocolo deve ser constituído de 6 sessões de treinamento, composta de 15 ciclos de medidas em cada sessão, executadas durante o ciclo claro dos animais. Após tal período, a pressão arterial de cada animal,

acordado, adaptado e em jejum de 12 horas, foi aferida no dia do sacrifício, utilizando-se 30 ciclos de medidas. As medidas foram arquivadas em planilhas eletrônicas e para efeito de análise foram consideradas as pressões que se encontravam relacionadas aos valores dentro das faixas consideradas normais de frequência cardíaca (470 a 650 bpm) e volume caudal (25 a 50 μ L), para este sistema de medidas.



3.3 Análise plasmática de colesterol, triglicérides e ácidos graxos livres.

As concentrações plasmáticas de triglicéris (Roche®), colesterol total (Roche®), ácidos graxos livres (Wako®), foram determinadas com kits enzimáticos colorimétricos conforme as instruções do fabricante após retirada de sangue via retro-orbital com capilares heparinizados (Perfecta®).

3.4 Área de Lesão Aterosclerótica na Aorta Proximal Ascendente

Os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal (ip) utilizando-se Xilazina/Ketamina (Bayer AS e Parke-Davis®, respectivamente) na concentração de 6 e 40

mg/Kg, respectivamente. Após secção da aorta abdominal, seus corações foram perfundidos através do ventrículo direito com 6 ml de salina seguido de 6 ml de formaldeído 10%. Os corações foram removidos e fixados por 24 horas em formalina 10%, e então embebidos em gelatina (Sigma®) 5%, 10% e 25%. Processamento histológico e coloração dos cortes foram empregados como descrito por Paigen *et al* (1987). Resumidamente, após a aplicação de Tissue Freezing Médium (Sigma®) nos blocos de gelatina contendo os corações, estes foram cortados transversalmente em criostato (HM 505 E Microm) a uma temperatura de -25°C com uma espessura de 10µm cada corte, as lâminas contendo 8 cortes cada foram coletadas à partir do momento do aparecimento das válvulas semilunares até o desaparecimento das mesmas, utilizando-se para a localização desta área a visualização microscópica das válvulas semi-lunares. Os cortes foram então corados com Oil Red (Amresco®) e contracorados com Light Green (Amresco®) e Hematoxilina de Harris (Sigma®). As lesões foram quantificadas como descrito por Rubin *et al* (1991), utilizando-se do programa Image Pro Plus software (versão 3.0) para análise da imagem. As áreas de lesões foram expressas como a somatória das lesões em 6 cortes de 10µm de espessura, com 80µm de distância entre os cortes, em uma área total de 480µm (medidas expressas em área x 10³ µm²).

3.5 Imunohistoquímica para as isoformas das óxido nítrico sintases neuronal, endotelial e induzida.

Após toracotomia os arcos aórticos foram removidos e incluídos em parafina para cortes histológicos de 3µm de espessura, segundo Junqueira *et al* (1979). Os cortes foram

tratados com peróxido de hidrogênio 3% para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos com leite desnatado 2% diluído em PBS (phosphate-buffered saline) 10 mM pH 7,4. As lâminas foram incubadas por 12 horas com anticorpos policlonais produzidos em coelho anti-eNOS, anti-iNOS e anti-nNOS (Santa Cruz® 1:100) em câmara úmida. Após a incubação com o anticorpo primário, foi feita a incubação com anticorpo secundário biotinilado (kit Dako® LSAB+), durante 1 hora à 37°C. Para evidenciar as áreas imunorreativas os cortes foram incubados com o complexo conjugado com peroxidase (Dako® LSAB+), durante 45 minutos à 37°C e colocadas em solução de cromógeno (50mg de DAB em 50ml de PBS com 3ml de água oxigenada 10%) por 3 minutos. Após contra coloração com Hematoxilina de Harris (Sigma®) por 25 segundos as lâminas foram montadas e analisadas em microscópio óptico em um aumento de 400x. Todas as análises foram feitas por observador único.

3.6 Quantificação das áreas imunorreativas para as isoformas das óxido nítrico sintases neuronal, endotelial e induzida.

Foram obtidas 8 fotomicrografias, a partir de um mesmo ponto pré-fixado, dos cortes transversais das aortas de cada animal utilizando-se a câmara digital acoplada ao programa Leica IM50 (versão 1.20). Cada fotomicrografia foi analisada pelo programa Bio ColorScanner, por meio do qual foram adquiridas as porcentagens fracionais referentes as áreas imunorreativas da área total analisada e assim posteriormente expressa.

3.7 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste Tukey-Kramer foi utilizada para comparar as médias entre diferentes grupos. As correlações foram calculadas por *Person* (correlação paramétrica) pelo programa GraphPad Instat. Consideramos as diferenças significativas quando o valor de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Área de lesão aterosclerótica na aorta proximal ascendente

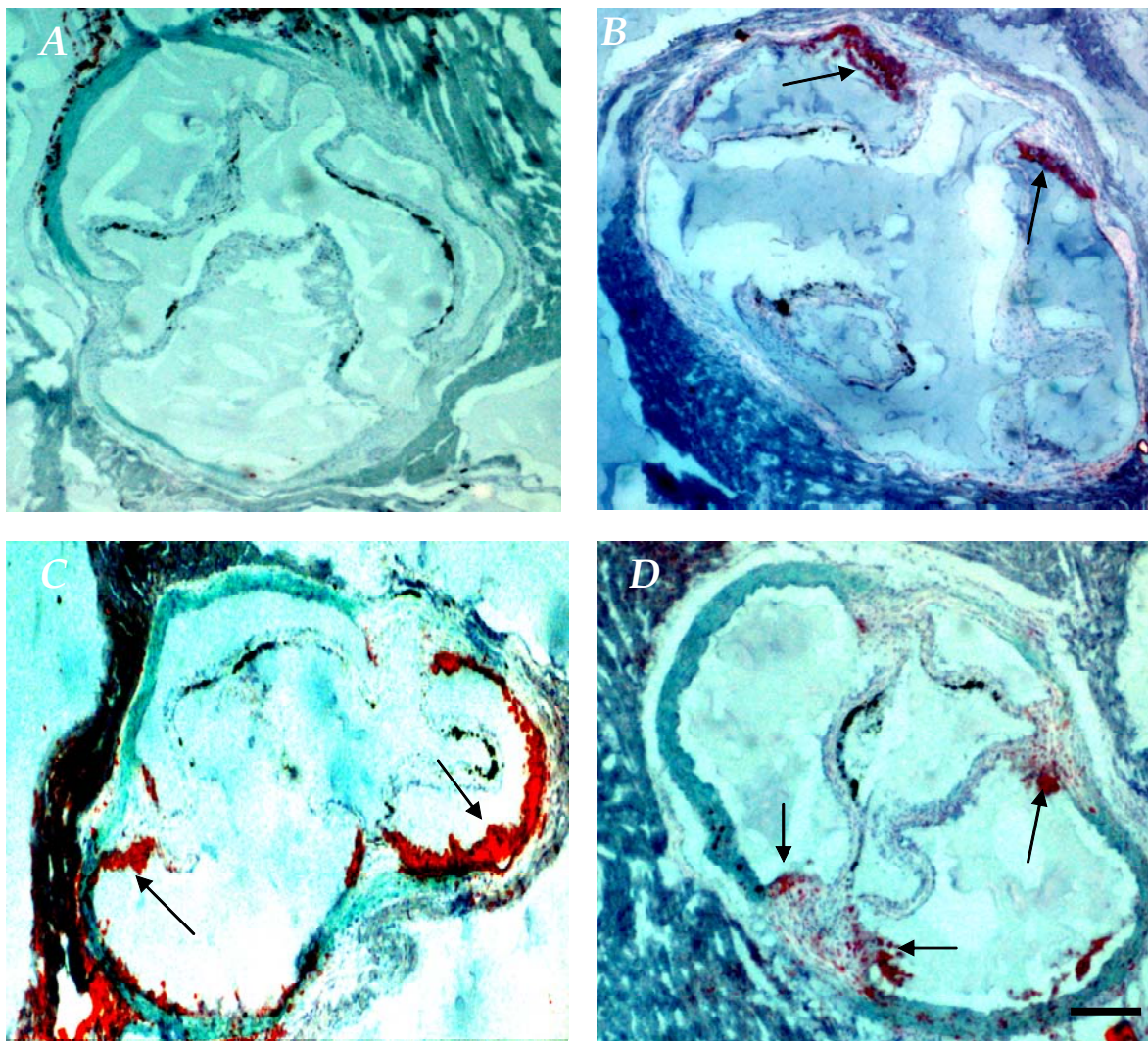
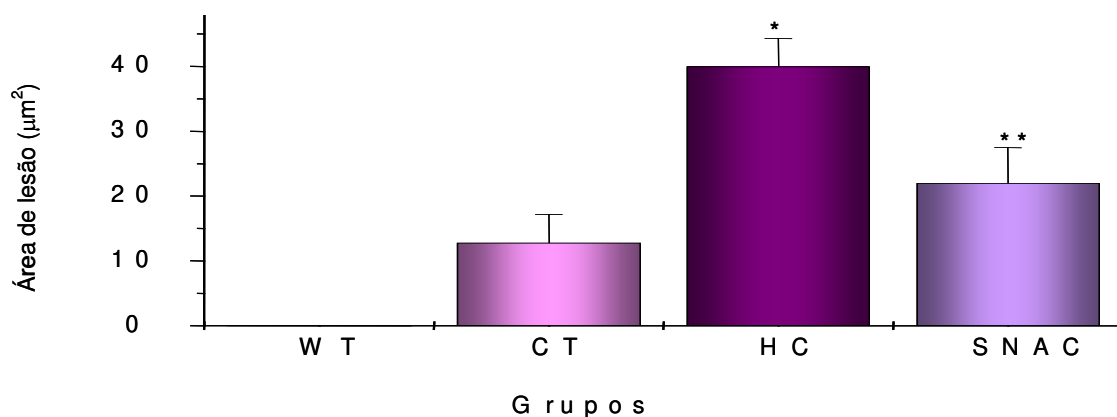


Figura 1. Fotomicrografias de seções transversais da aorta proximal ascendente de camundongos fêmeas *LDLr*^{-/-} e *C57Bl/6* mostrando lesões ateroscleróticas representativas. Os cortes foram submetidos à coloração com Oil Red e Light Green. O painel (A) representa o grupo FWT, (B) o grupo FCT, (C) o grupo FHC e (D) o grupo FSNAC. Barra = 10 μ m.

A área de lesão aterosclerótica em camundongos fêmeas dos diferentes grupos experimentais foram avaliadas e representadas na figura 1. A figura 2 apresenta os valores obtidos da quantificação da área de lesão aterosclerótica em camundongos fêmeas. Os camundongos do grupo FHC mostraram um acréscimo na área de lesão em aproximadamente 3 vezes ($12,8 \pm 4,4 \mu\text{m}^2$ vs $40 \pm 4,3 \mu\text{m}^2$), em relação aos camundongos FCT. O tratamento com SNAC impediu significativamente a formação na área total de lesão em aproximadamente 50% em relação aos camundongos FHC ($22 \pm 5,5 \mu\text{m}^2$ vs $40 \pm 4,3 \mu\text{m}^2$).



*Figura 2. Quantificação da área total da lesão aterosclerótica da secção transversal em aorta proximal ascendente de camundongos LDLr-/- fêmeas. As barras representam os camundongos FCT, FHC e FSNAC. Valores expressos em médias $\pm$ EPM, (n=7 -11) Comparação estatística: Anova seguida de teste Tukey-Kramer. * $P < 0,01$ comparado aos FCT; ** $P < 0,05$ comparado aos FHC).*

Tabela 1. Quantificação da área total da lesão aterosclerótica da secção transversal em aorta proximal ascendente de camundongos LDLr^{-/-} machos e fêmeas.

Área de lesão	CT	HC	SNAC
♂ (mμ ²)	12 ± 1 ^{a,b}	92 ± 4 ^{a,c,d}	47 ± 2 ^{b,c,e}
♀ (mμ ²)	13 ± 4	44 ± 6 ^d	22 ± 5 ^e

Área de lesão. Valores expressos em médias ± EPM (n= 6-11). Comparações estatísticas: expoentes iguais são diferentes entre si: Anova seguido de teste Tukey-Kramer

P<0,0001 para: d

P< 0,001 para: a, b,c,e.

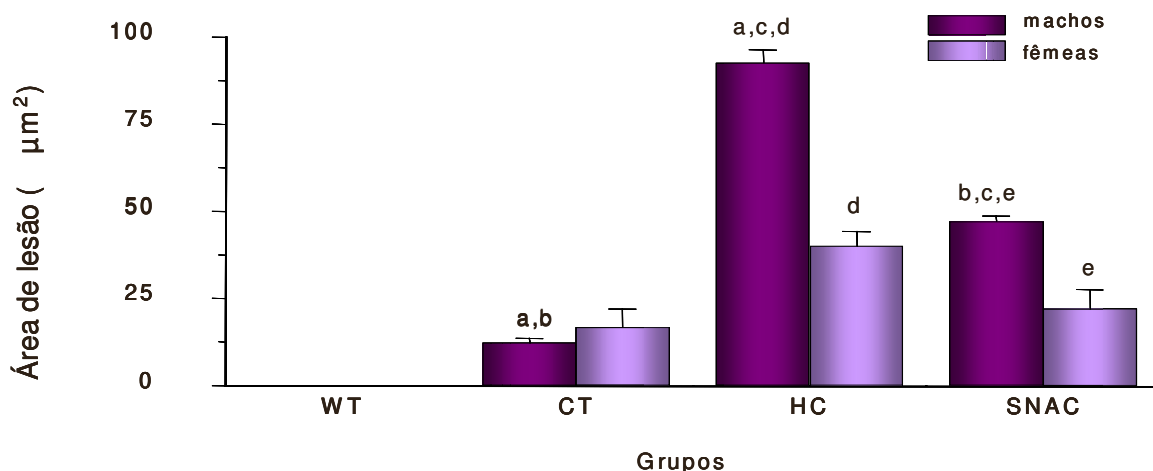


Figura 3. Quantificação da área total da lesão aterosclerótica da secção transversal em aorta proximal ascendente de camundongos LDLr^{-/-} machos e fêmeas. Valores expressos em médias ± EPM, (n=6 -11) grupo. Expoentes iguais são estatisticamente diferentes entre si. Anova seguido de teste Tukey-Kramer.

P<0,0001 para: d

P< 0,001 para: a, b,c,e.

Os camundongos MWT e FWT não apresentaram área de lesão. Contudo, como mostrado na figura 3 camundongos MCT e FCT, apresentaram coloração positiva em áreas no segmento aórtico avaliados ($12,16 \pm 1,31 \mu\text{m}^2$ vs $12,8 \pm 4,4 \mu\text{m}^2$, respectivamente), porém sem significativa diferença como podemos observar. Nos grupos MHC e FHC, quando comparados aos seus respectivos grupos controles, podemos observar significativo

aumento na área de lesão, sendo que no grupo de machos o aumento foi de cerca de 8 vezes (MCT $12,16 \pm 1,3 \mu\text{m}^2$ vs MHC $92,45 \pm 3,7 \mu\text{m}^2$, respectivamente), enquanto que no grupo de fêmeas o aumento foi de cerca de 3 vezes (FCT $12,8 \pm 4,4 \mu\text{m}^2$ vs FHC $40 \pm 4,3 \mu\text{m}^2$, respectivamente). Assim, os camundongos FHC mostraram desenvolvimento de placa aterosclerótica, significativamente menores que as desenvolvidas pelos camundongos machos MHC ($40 \pm 4,3 \mu\text{m}^2$ vs $92,45 \pm 3,7 \mu\text{m}^2$), ou seja, os machos apresentaram 2,3 vezes mais ateroma do que as fêmeas. O tratamento com SNAC impediu em ambos os grupos MSNAC e FSNAC, a formação de um marcado aumento da área de lesão aterosclerótica (figura 3) cerca de 50%, comparado tanto com MHC ($92,45 \pm 3,7 \mu\text{m}^2$ vs $47,09 \pm 1,5 \mu\text{m}^2$), como FHC ($40 \pm 4,3 \mu\text{m}^2$ vs $22 \pm 5,5 \mu\text{m}^2$).

4.2 Perfil lipídico

A tabela 2 apresenta concentrações de colesterol, triglicérides e ácidos graxos livres avaliados no plasma dos camundongos fêmeas. As concentrações de triglicérides apresentaram-se significativamente aumentadas no grupo FHC e FSNAC quando comparados ao grupo FCT, o tratamento com a SNAC não impediu os aumentos verificados. O colesterol e o triglicérides total plasmático do grupo FCT apresentou valores significativamente diferentes nos camundongos do grupo FWT enquanto que o grupo FHC foi grandemente aumentado, apesar do tratamento com SNAC não atuar impedindo tal aumento. Os ácidos graxos livres plasmáticos do grupo FHC apresentaram valores significativamente aumentados em relação aos camundongos do grupo FCT ou FWT, sendo que o tratamento com SNAC promoveu proteção neste aumento, sem, contudo aproximar-se dos valores basais registrados em FCT ou FWT.

Tabela 2: Valores plasmáticos em camundongos fêmeas C57Bl6 e LDLr-/- .

	FWT	FCT	FHC	FSNAC
TG (mm/dl)	52 ± 4,3 ^{a,c}	72 ± 3,9 ^{a,b}	210 ± 19,7 ^{b,c}	242 ± 20
COL (mm/dl)	67 ± 3,3 ^{d,f}	199 ± 6,8 ^{d,e}	1676 ± 62,42 ^{e,f}	1635 ± 62,4
AGL (mm/dl)	0,28 ± 0,05 ⁱ	0,22 ± 0,01 ^g	1,24 ± 0,11 ^{g,h,i}	0,88 ± 0,09 ^h

TG triglicérides, COL colesterol total, e AGL ácidos graxos livres. Valores expressos em médias ± EPM (n=9-15) Comparação estatística: expoentes iguais são estatisticamente diferentes entre si: Anova seguido de teste Tukey-Kramer.

TG para $P < 0,001 = b,c$; $P < 0,05 = a$.

COL para $P < 0,0001 = d,e,f$;

AGL para $P < 0,001 = g,i$; para $P < 0,05 = h$.

A correlação entre colesterol plasmático e área de lesão não apresentou diferença significativa.

4.3 Pressão arterial e frequência cardíaca

Os valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca em grupos de camundongos fêmeas conscientes e livres de estresse foram apresentados na tabela 3. Foi verificado que os grupos de animais FWT e FCT não apresentaram diferenças significativas entre si, mas quando comparamos o grupo FHC ao FWT temos um significativo aumento na PAS de 18%, na PAD de 15% resultando em um acréscimo de 15% na PAM.

O tratamento com SNAC no grupo HC produziu uma significativa redução de cerca de 10% na pressão arterial sistólica, resultando em um decréscimo ao redor de 12% na pressão arterial média. Assim, a hipertensão verificada no grupo FHC foi prevenida pelo tratamento com a SNAC, uma vez os valores da pressão arterial deste grupo foram similares aos obtidos nos camundongos controles (FCT) ou wild-type (FWT). Os valores de

frequência cardíaca foram alterados pela dieta hipercolesterolêmica e o tratamento com SNAC impediu essa alteração.

Tabela 3. Pressão arterial e frequência cardíaca em camundongos fêmeas C57Bl6 e LDLr-/-.

	FWT	FCT	FHC	FSNAC
Peso (g)	21±0,4	19±0,3	17±0,6	18±0,7
PAS (mmHg)	122 ± 3,0 ^{a,d}	134 ± 4,3 ^{a,b}	145 ± 4,5 ^{b,c,d}	132 ± 3,8 ^c
PAD (mmHg)	101 ± 2,9 ^e	109 ± 4,1	116± 3,1 ^e	109 ± 2,5
PAM (mmHg)	110 ± 2,3 ^g	116 ± 3,9	126 ± 2,9 ^{f,g}	111 ± 3,4 ^f
FC (bpm)	557 ± 16,8	556 ± 10,6 ^h	594 ± 10,5 ^{h,i}	554 ± 9,9 ⁱ

PAS pressão arterial sistólica; PAD pressão arterial diastólica; PAM pressão arterial média; FC frequência cardíaca. Valores expressos em médias ± EPM (n= 8-13). Comparações estatísticas: expoentes iguais são diferentes entre si: Anova seguido de teste Tukey-Kramer.

P<0,05 para: a,b,c,h,i

P< 0,001 para: d,e,f,g.

O peso corpóreo e área de lesão não se correlacionaram.

4.4.1 Pressão arterial sistólica

Tabela 4. Pressão arterial sistólica de camundongos machos e fêmeas C57Bl6 e LDLr-/ dos respectivos grupos.

PAS	WT	CT	HC	SNAC
♂ (mmHg)	127 ± 2 ^{a,b,c}	141 ± 3 ^a	142 ± 2 ^b	145 ± 2 ^{c,d}
♀ (mmHg)	122 ± 3	134 ± 4	145 ± 3	132 ± 3 ^d

PAS pressão arterial sistólica; Valores expressos em médias ± EPM (n= 8-13). Comparações estatísticas: expoentes iguais são diferentes entre si: Anova seguido de teste Tukey-Kramer. P<0,01 para: a; P< 0,001 para: b,c; P<0,0001 para: d.

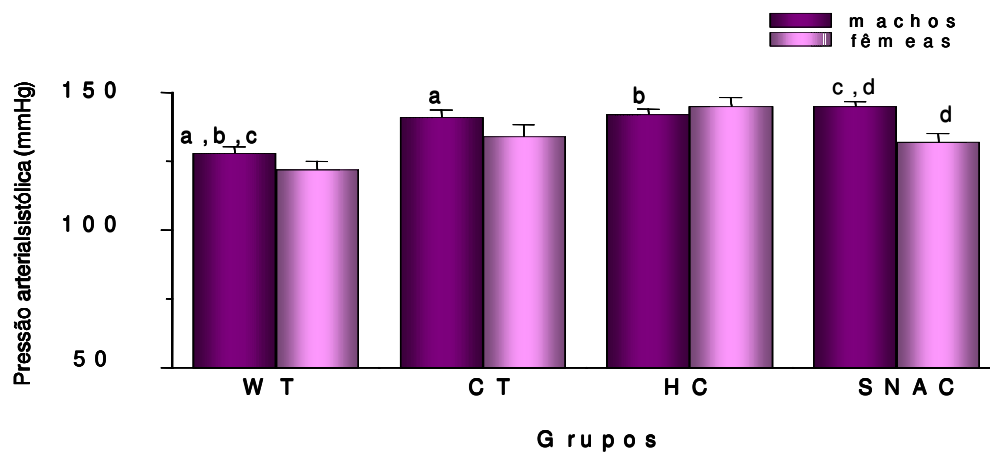


Figura 4. Pressão arterial sistólica de camundongos LDLr/- e C57Bl/6 machos e fêmeas. Valores expressos em médias $\pm$ EPM ($n=4 - 13$). Comparação estatística: expoentes iguais são diferentes entre si: Anova seguido de teste Tukey-Kramer.

$P < 0,01$ para: a.

$P < 0,001$ para: b, c.

$P < 0,0001$ para: d.

A figura 4 apresenta a comparação dos valores de pressão arterial sistólica caudal em camundongos fêmeas e machos conscientes e livres de estresse. Nos grupos de camundongos MCT, MHC, MSNAC, foi verificada uma pressão arterial sistólica significativamente mais elevada em relação ao grupo de camundongos MWT, ou seja, um aumento de 10%, 11 % e 13% respectivamente, nos valores basais de pressão arterial sistólica em relação ao grupo MWT. Assim, nos camundongos machos verificou-se que o aumento dos níveis de pressão arterial sistólica relaciona-se a condição *knockout* e associada ao sexo, e que o tratamento com o SNAC no período de quinze dias não impediu a hipertensão. Nos camundongos fêmeas verificou-se que o aumento dos níveis de pressão arterial sistólica não se relaciona à condição *knockout* mas foi induzido pela dieta. Sobretudo, ao contrário do verificado em machos, o tratamento com o SNAC no período de

quinze dias preveniu em 100% a hipertensão, sendo que no grupo FHC o mesmo grau de aumento pressório foi verificado em ambos sexos.

4.4.2 Pressão arterial diastólica

Tabela 5. Pressão arterial diastólica de camundongos machos e fêmeas C57Bl6 e LDLr-/-.

PAD	WT	CT	HC	SNAC
♂ (mmHg)	108 ± 2 ^{a,b,c}	124 ± 2 ^{a,d}	119 ± 2 ^b	120 ± 2 ^{c,e}
♀ (mmHg)	101 ± 3	109 ± 4 ^d	116 ± 3	109 ± 3 ^e

PAD pressão arterial diastólica. Valores expressos em médias ± EPM (n= 8-13). Comparação estatística: expoentes iguais são diferentes entre si: Anova seguido de teste Tukey-Kramer.

$P < 0,01$ para: a;

$P < 0,001$ para: b,c;

$P < 0,05$ para: d,e.

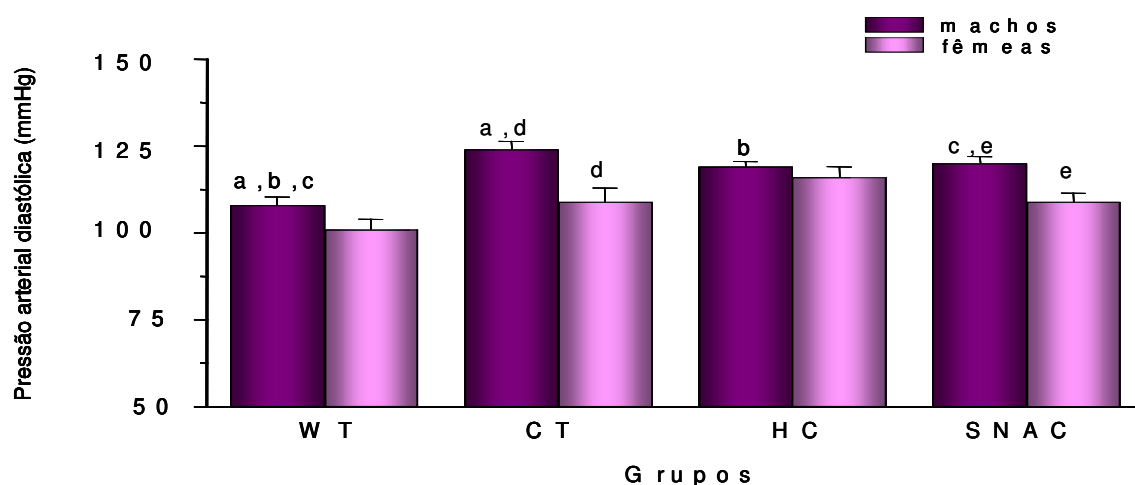


Figura 5. Pressão arterial diastólica de camundongos LDLr-/ e C57Bl/6 machos e fêmeas. Valores expressos em médias ± EPM, n= 4 – 13/grupo. Comparação estatística: expoentes iguais são diferentes entre si: Anova seguido de teste Tukey-Kramer.

$P < 0,01$ para: a;

$P < 0,001$ para: b,c;

$P < 0,05$ para: d,e.

A figura 5 apresenta a comparação dos valores de pressão arterial diastólica caudal em camundongos fêmeas e machos conscientes e livres de estresse. Os grupos de animais MCT, MHC, MSNAC, apresentaram uma pressão arterial diastólica significativamente mais elevada em relação aos camundongos MWT, ou seja, um aumento de 15%, 10 % e 11 % respectivamente nos valores basais de pressão arterial diastólica em relação ao grupo de camundongos MWT. Assim, verificou-se que o aumento dos níveis de pressão arterial diastólica relacionou-se a condição *knockout* associada ao sexo. Contudo, nos camundongos fêmeas verificou-se que o aumento dos níveis de pressão arterial diastólica não se relacionou à condição *knockout*, mas foi induzido pela dieta. Sobretudo, ao contrário do verificado em machos, o tratamento com o SNAC no período de quinze dias impediu em 100% a hipertensão.

4.4.3 Pressão arterial média

Tabela 6. Pressão arterial média de camundongos machos e fêmeas C57Bl6 e LDLr-/-.

PAM	WT	CT	HC	SNAC
♂ (mmHg)	115 ± 2 ^{a,b,c}	130 ± 2 ^{a,d}	126 ± 2 ^b	128 ± 2 ^{c,e}
♀ (mmHg)	109 ± 2	116 ± 4 ^d	126 ± 3	111 ± 3 ^e

PAM pressão arterial média. Valores expressos em médias ± EPM (n= 8-13). PAM pressão arterial média; Comaração estatística: expoentes iguais são diferentes entre si: Anova seguido de tese Tukey-Kramer.

P<0,001 para: a,c;

P<0,01 para: b;

P<0,0001 para: e;

P<0,005 para: d.

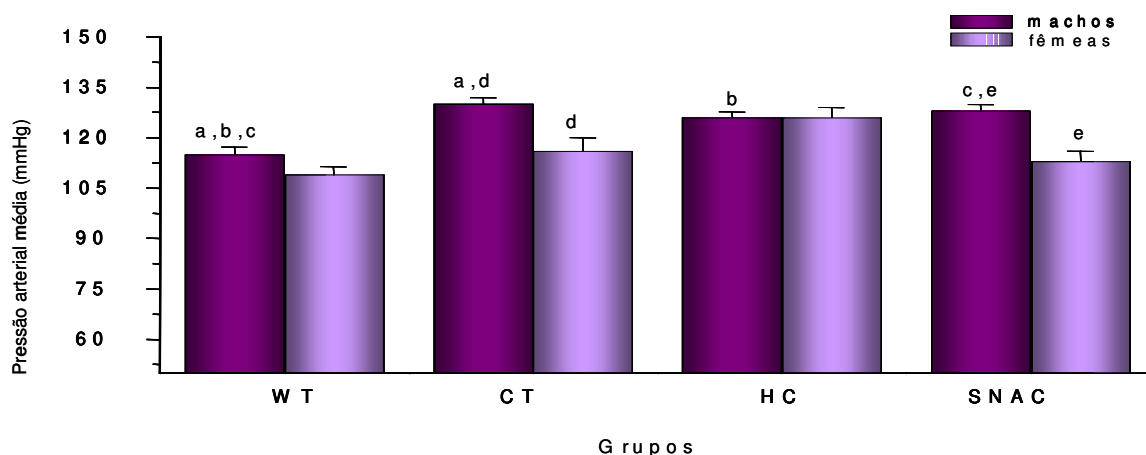


Figura 6. Pressão arterial média de camundongos LDLr^{-/-} e C57Bl/6 machos e fêmeas. Valores expressos em médias $\pm$ EPM, (n=4 – 13). Comparação estatística: expoentes iguais são diferentes entre si: Anova seguido de teste Tukey-Kramer.

$P < 0,001$ para: a, c;

$P < 0,01$ para: b;

$P < 0,0001$ para: e;

$P < 0,005$ para: d.

A figura 6 apresenta a comparação dos valores resultantes de pressão arterial média caudal em camundongos conscientes e livres de estresse. Nos grupos de camundongos machos foi observada uma pressão arterial média significativamente mais elevada em relação aos camundongos MWT, ou seja, um aumento de 13%, 10% e 11% respectivamente nos valores basais de pressão arterial média em relação ao grupo MWT. Assim, verificou-se que o aumento dos níveis de pressão arterial média relacionou-se à condição *knockout* associada ao sexo, e que o tratamento com a SNAC no período de quinze dias não previne a hipertensão.

A correlação entre área de lesão e pressão arterial média (PAM) não apresentou diferença significativa.

4.4.4 Frequência cardíaca

Tabela 7. Frequência cardíaca de camundongos machos e fêmeas C57Bl6 e LDLr-/-.

FC	WT	CT	HC	SNAC
♂ (bpm)	579 ± 10 ^{a,b,c}	521 ± 8 ^{a,d}	516 ± 9 ^{b,e}	517 ± 11 ^{c,f}
♀ (bpm)	557 ± 16	556 ± 10 ^d	593 ± 10 ^e	554 ± 10 ^f

FC frequência cardíaca. Valores expressos em médias ± EPM (n= 8-13).; Comparação estatística: expoentes iguais são diferentes entre si. Anova seguido de tese Tukey-Kramer.

P<0,001 para: a,b,c,e;

P<0,05 para: d,f.

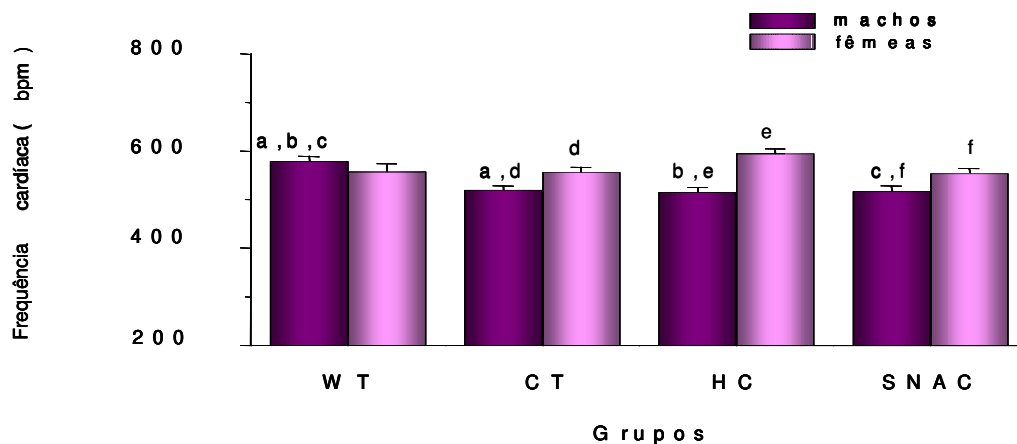


Figura 7. Frequência cardíaca de camundongos LDLr-/ e C57Bl/6 machos e fêmeas. Valores expressos em médias ± EPM, n=4 – 13 por grupo; Comparação estatística: expoentes iguais são diferentes entre si: Anova seguido de tese Tukey-Kramer.

P<0,001 para: a,b,c,e;

P<0,05 para: d,f.

A figura 7 ilustra a comparação dos valores de frequência cardíaca dos camundongos machos e fêmeas concientes e livres de estresse. Foi verificado que o grupo de camundongos fêmeas FHC apresentou um aumento de 7% em relação à frequência

cardíaca do grupo FCT e o tratamento com SNAC impediu esse acréscimo no grupo FSNAC. Nos grupos de camundongos MCT, MHC e MSNAC, foi observada frequência cardíaca significativamente menor em relação aos camundongos MWT, ou seja, um decréscimo de 10%, 11% e 11% respectivamente em relação aos valores do grupo MWT.

4.4 Peso ventricular esquerdo relativo

Tabela 8. Peso ventricular esquerdo relativo de camundongos machos e fêmeas C57Bl6 e LDLr-/-.

PVE	WT	CT	HC	SNAC
♂ (mg/g)	3 ± 0,04 ^a	3,3 ± 0,07 ^b	4,2 ± 0,09 ^{a,b,c,d,e,f,g}	3,4 ± 0,23 ^c
♀ (mg/g)	2,9 ± 0,11 ^d	2,85 ± 0,07 ^e	3 ± 0,13 ^f	2,9 ± 0,06 ^g

PVE Peso ventricular esquerdo relativo (mg/g peso corpóreo) Valores expressos em médias ± EPM (n= 4-6). Comparação estatística: expoentes iguais são diferentes entre si: Anova seguido de tese Tukey-Kramer.

$P < 0,001$ para: a, b, c, d, e, f, g

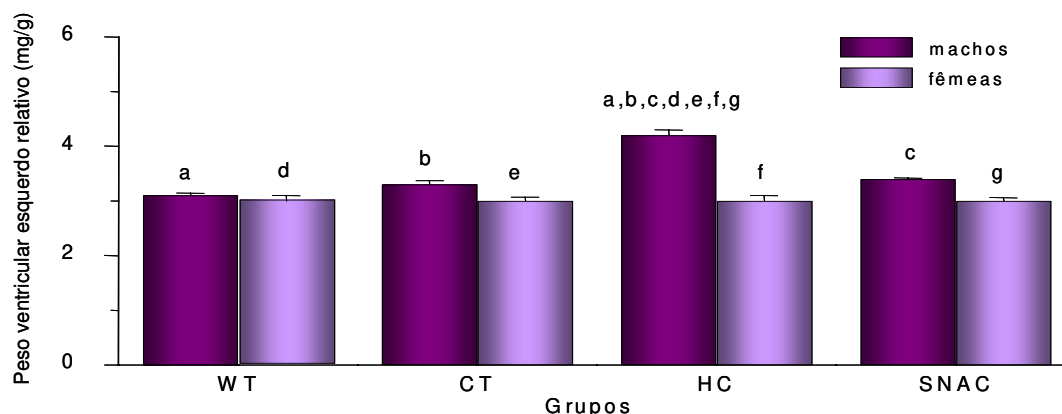


Figura 8. Peso ventricular esquerdo relativo (mg/g peso corpóreo) em camundongos LDLr-/ e C57Bl/6 machos e fêmeas. Valores expressos em médias ± EPM, (n=4 – 6); Comparação estatística: expoentes iguais são diferentes entre si: Anova seguido de tese Tukey-Kramer.

$P < 0,001$ para: a, b, c, d, e, f, g

A figura 8 apresenta a comparação entre os valores obtidos de peso ventricular esquerdo em camundongos fêmeas e machos. Verificou-se que os camundongos do grupo MCT não apresentaram diferenças estruturais cardíacas em relação aos camundongos MWT, contudo o grupo de camundongos MHC desenvolveu marcado incremento no peso ventricular esquerdo relativo, o qual foi 1,25 vez maior em relação aos camundongos MCT e 1,35 vez maior em relação aos camundongos MWT ($4,16 \pm 0,10$ vs $3,34 \pm 0,09$ vs $3,08 \pm 0,04$ mg/g de peso corporal, respectivamente). O tratamento com SNAC impediu o aumento do peso ventricular esquerdo relativo em camundongos tratados com SNAC, quando comparados com o grupo MHC ($3,57 \pm 0,39$ vs $4,16 \pm 0,10$ mg/g de peso corporal respectivamente). Os pesos dos ventrículos esquerdos dos camundongos FCT, FWT e FSNAC não mostraram diferenças significativas. Porém quando comparamos o grupo MHC com o grupo FHC podemos observar um aumento de 39% no peso ventricular esquerdo relativo.

4.5 Expressão da óxido nítrico sintase (NOS)

4.5.1 Imunoreatividade para óxido nítrico sintase endotelial (NOSe)

A análise imunoistoquímica para verificação da expressão de NOSe foi feita em cortes histológicos transversais da aorta descendente. O grupo de camundongos FWT (A), não apresentou imunoreatividade para NOSe, contudo nos camundongos FCT foi verificada uma área imunorreativa de 9%, dispersa na região adventícia e subendotelial (B), sendo que nos camundongos alimentados com dieta hipercolesterolêmica, houve uma área imunorreativa 3%, expressão bem mais marcada na camada íntima (endotélio) e região subendotelial (C). A análise mostrou também, que o aumento verificado nos camundongos

do grupo FCT e do grupo FHC, foi prevenido pelo tratamento com SNAC no período de quinze dias, o que pode ser visualizado na figura 9 (D).

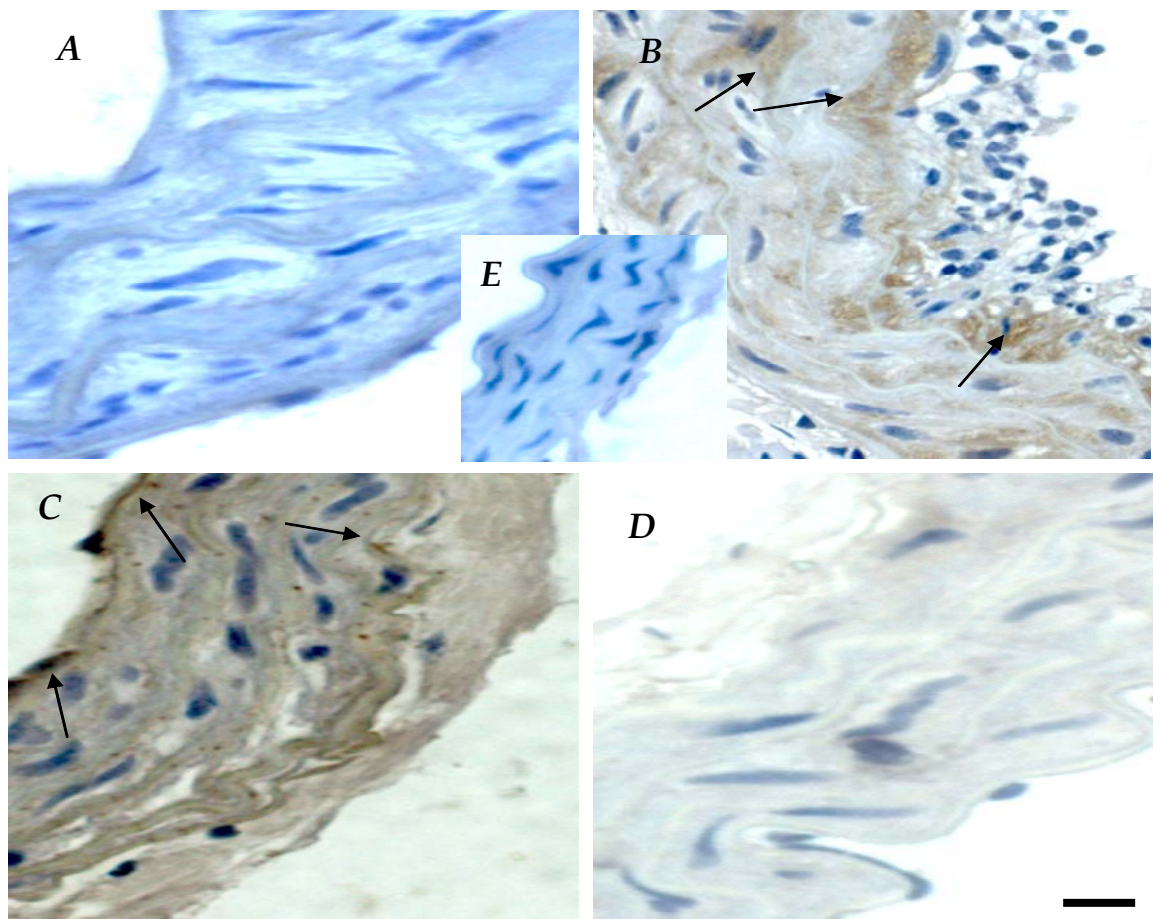


Figura 9. Fotomicrografias da região do arco aórtico de camundongos fêmeas LDLr-/- e WT, mostrando a expressão de NOSe. Os cortes foram submetidos à imunoistoquímica para NOSe e contracoloração com Hematoxilina de Harris (HE). O painel (A) representa o grupo FWT, (B) o grupo FCT, (C) o grupo FHC, (D) o grupo FSNAC e (E) como controle negativo. Barra = 10 μ m.

4.5.2 Imunoreatividade para óxido nítrico sintase neuronal (NOSn)

A análise imunoistoquímica para verificação da expressão de NOSn foi feita em cortes histológicos transversais da região da aorta ascendente. Foi verificada uma área imunorreativa dispersa na região da túnica média (camada muscular). Não foi verificada

imunorreatividade de NOSn nas aortas dos camundongos FWT (A), porém, foi verificado a presença de expressão desta nos camundongos do grupo FCT (B), e grupo FHC (C) área imunorreativa (22% e 6% respectivamente) nas camadas adventícia, muscular e endotelial, havendo portanto, diferenças entre esses grupos. O tratamento com SNAC (figura 10 D), no período de quinze dias preveniu o aumento na expressão da NOSn.

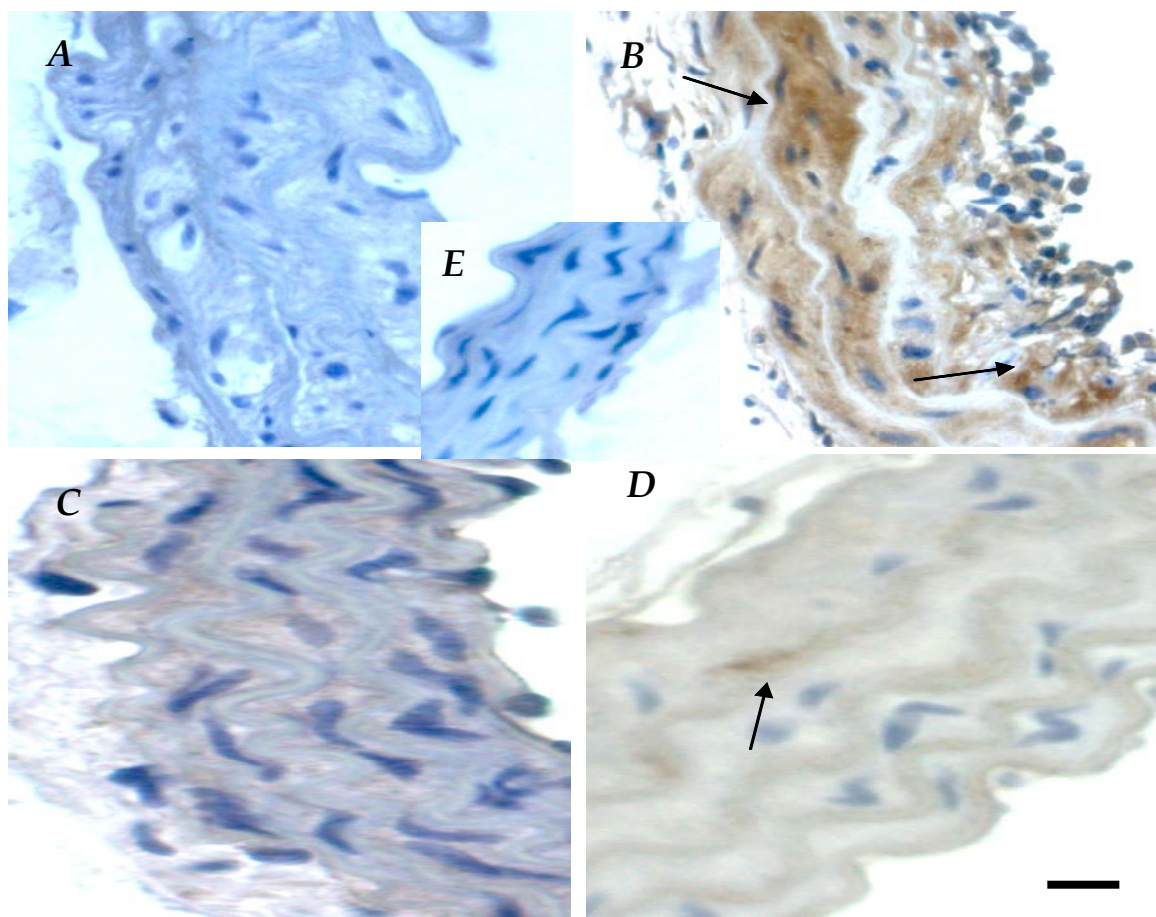


Figura 10. Fotomicrografias da região do arco aórtico de camundongos fêmeas LDLr-/- e WT, mostrando a expressão de NOSn. Os cortes foram submetidos a imunohistoquímica para NOSn e contracoloração com Hematoxilina de Harris (HE). O painel (A) representa o grupo FWT, (B) o grupo FCT, (C) o grupo FHC, (D) o grupo FSNAC e (E) como controle negativo. Barra = 10 μ m.

4.5.3 Imunoreatividade para óxido nítrico sintase induzida (NOSi)

A análise imunohistoquímica para verificação da expressão de NOSi foi feita em cortes histológicos transversais da região da aorta ascendente. Foi verificada área imunorreativa dispersa e expressiva tanto no grupo FCT (B), como no grupo FHC (C) (5% e 2% respectivamente). O tratamento com SNAC impediu o aumento da imunoreativa (D). Não houve expressão de NOSi nas aortas dos camundongos FWT (A) e controle negativo (E).

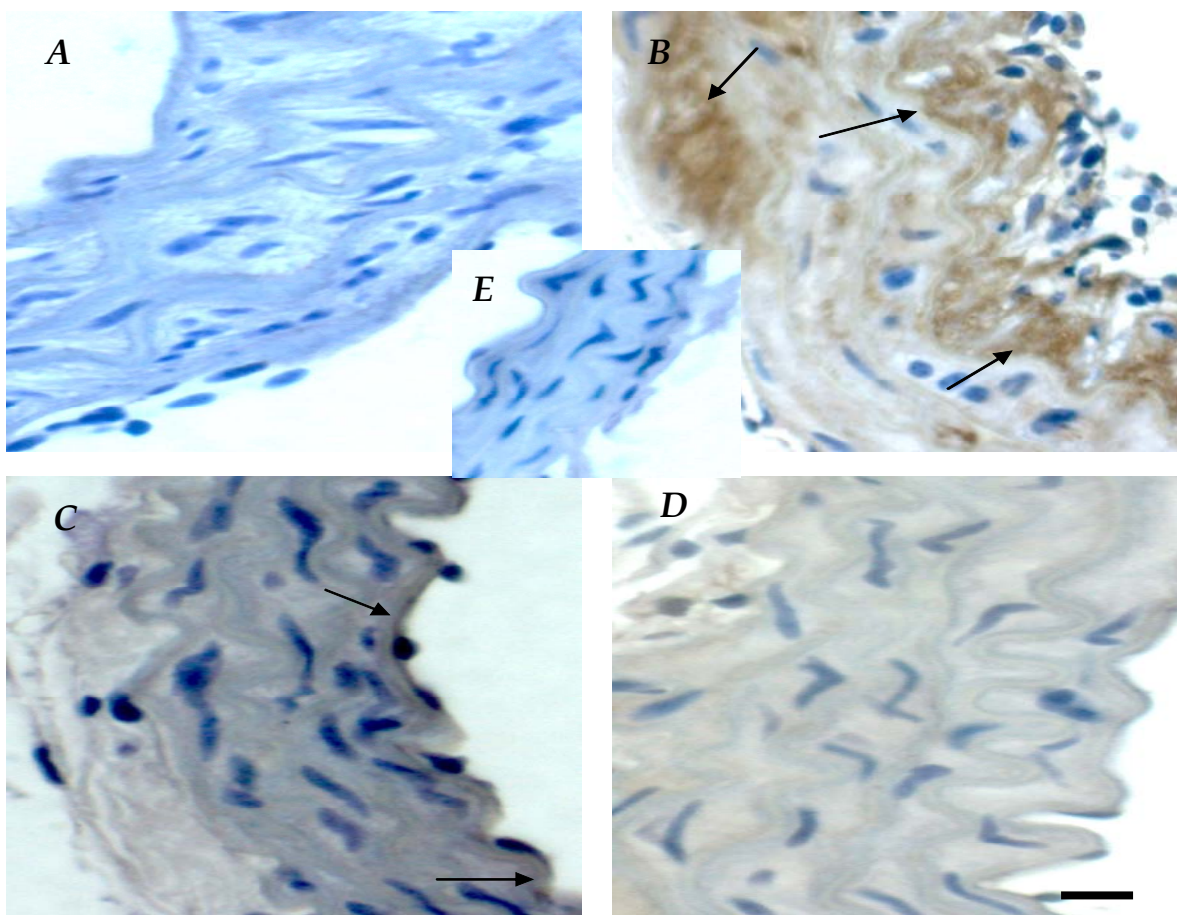


Figura 11. Fotomicrografias da região do arco aórtico de camundongos fêmeas LDLr^{-/-} e WT mostrando a expressão de NOSi. Os cortes foram submetidos a imunoistoquímica para NOSi e contracoloração com Hematoxilina de Harris (HE). O painel (A) representa o grupo FWT, (B) o grupo FCT, (C) o grupo FHC, (D) o grupo FSNAC e (E) como controle negativo. Barra = 10 μ m.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que os camundongos LDLr^{-/-} fêmeas HC apresentaram uma menor formação de área de lesão que os machos, evidenciando um dimorfismo sexual em relação ao tamanho de formação da área de lesão, o qual foi dependente dos valores lipídêmicos em fêmeas, e o mesmo foi mais acentuado em machos segundo Krieger *et al* (2006). Tal evidência foi reforçada, também pelo fato de que o tratamento com a SNAC preveniu em 50% a formação da placa aterosclerótica sem promover alterações no perfil lipídico em ambos os sexos. Outra importante verificação foi de que as fêmeas apresentaram o fenótipo hipertenso somente induzido pela dieta hipercolesterolêmica, enquanto que os machos foram mais lábeis e apresentaram tal fenótipo em função da deleção gênica, sobretudo, a evidência de que nos machos o tratamento com SNAC preveniu a formação da área de lesão de maneira que parece não estar associada a alterações hemodinâmicas presentes tanto na deleção gênica (MCT) como na dieta (MHC).

A comparação dos resultados das avaliações hemodinâmicas em machos e fêmeas, revelou a existência de uma menor alteração nas fêmeas do que a vista em machos, sugerindo que estas foram sujeitas a uma maior proteção, provavelmente relacionada ao estrógeno circulante. Camundongos fêmeas LDLr^{-/-} alimentados com ração comercial não apresentaram lesões ateroscleróticas significativas, fato anteriormente verificado por Tangirala *et al* (1995) e Walif, *et al* (1997). Neste modelo de estudo, a dieta hipercolesterolêmica durante quinze dias induziu a formação de placa aterosclerótica em ambos os sexos, mas como destacamos acima verificamos uma maior deposição de placas de aterosclerose em camundongos machos, aproximadamente o dobro do valor visto em

fêmeas sob o mesmo tratamento. Tal evidência não havia sido detectada na fase inicial da aterogênese, somente havia sido descrita em fases tardias por Tangirala *et al* (1995) e Walif *et al* (1997). Nesses estudos, machos LDLr^{-/-} formaram o dobro do valor da área de lesão do que o visto em fêmeas alimentados com dieta hipercolesterolêmica após 6 meses. E, ainda, é ressaltado por diversos autores, o fato, do aumento das dimensões da área de lesão, tanto a extensão da área de lesão aórtica como o conjunto da área de lesão da aorta descendente, não mostrarem correlação positiva com as concentrações de colesterol plasmáticos, corroborando, assim, com os resultados obtidos na fase inicial do presente trabalho. Estudos, tanto com camundongos deficientes para o receptor de LDL como para a apoE, indicaram que o estrógeno (E₂) participa da redução da aterosclerose por mecanismos adicionais independentes dos níveis colesterol plasmáticos (Farhat *et al*, 1996; Olsen *et al*, 1996; Banka, 1998). Assim, encontra-se bem claro na atual literatura que os efeitos protetores do estrógeno na aterogênese se relacionam aos seguintes fatores: vasodilatação, diminuição da resistência periférica, diminuição da reatividade vascular para estímulos vasoconstritores, diminuição da proliferação das células musculares lisas, proteção contra a oxidação da LDL, modulação dos mediadores inflamatórios, favorecimento da modulação da homocisteína (Rifici e Khachadurian, 1992, Bar, *et al* 1993, Adams *et al*, 1990 e van der Mooren *et al*, 1998). March *et al*, (1999) mostraram que em camundongos LDLr^{-/-} fêmeas deficientes para E₂, tanto a terapia de reposição hormonal com 17 α -E₂ tanto com 17 β -E₂ (vias de ação independentes do receptor de estrógeno e vias de ação dependentes do receptor respectivamente) diminuíram as concentrações de colesterol similarmente resultados desse estudo indicam que camundongos LDLr^{-/-} representam um modelo

apropriado para o desenvolvimento de pesquisas sobre os mecanismos pelos quais o estrógeno protege contra aterosclerose.

Verificamos que a SNAC exerce um efeito preventivo na fase inicial da aterogênese em fêmeas, provavelmente à semelhança do que ocorreu em machos, ou seja, por meio de um efeito antiinflamatório (Santos, 2005) e antioxidante (Krieger *et al*, 2005). No presente estudo verificamos que esta proteção foi cerca de 50% e independe do sexo. Estudos adicionais com fêmeas ovariectomizadas encontram-se em andamento para que possamos elucidar o papel do estrógeno neste tratamento preventivo.

Constatamos que fêmeas sob dieta hipercolesterolêmica exibiram níveis pressóricos elevados e ambos grupos HC tanto de machos como de fêmeas tiveram um aumento em torno de 12% na pressão arterial sistólica. Contudo, nos camundongos machos o tratamento com SNAC não foi capaz de exercer efeito preventivo na hipertensão, verificado em fêmeas. Assim, a hipertensão neste modelo animal parece apresentar dimorfismo sexual tanto na sua gênese como na sua manutenção, se correlacionarmos as diferenças encontradas em função da deleção do gene e da dieta hipercolesterolêmica. Uma vez que a deleção do gene que codifica a expressão do receptor de LDL para produção do *knockout* este pareceu ser o fator responsável pelo aumento na pressão arterial desta cepa de animais machos. Tal resultado também foi verificado em estudo preliminar e descrito por Trieu e Ukum (1998). Segundo estes autores, a hipertensão verificada somente aos camundongos machos LDLr-/-, pode ser explicada devido à maior suscetibilidade dos machos à aterosclerose, pois estes apresentaram um aumento na expressão de P-selectina, um marcador para agregação plaquetária (Lip *et al*, 1995 e 1997).

Segundo Johnson *et al*, (1997) a deleção do gene para P-selectina no camundongo LDLr^{-/-} reduz a aterosclerose proeminentemente em machos, contudo como verificado neste estudo, a P-selectina um mediador de adesão importante somente em fases iniciais da aterogênese, sendo que não foram verificadas diferenças em fases mais adiantadas.

Quanto ao segundo aspecto evidenciado por nós, relativo à verificação de que o tratamento com SNAC preveniu a manutenção da hipertensão nas fêmeas sob dieta hipercolesterolêmica; hipotetizamos que uma disfunção endotelial associada à aterosclerose causada pela dieta hiperlipídica foi o fator de maior preponderância na gênese e na manutenção da hipertensão de fêmeas.

Tal hipótese encontra subsídios no fato de que a disfunção endotelial pode contribuir para o aumento da resistência periférica e da pressão arterial, uma vez que o endotélio, como regulador do fluxo sanguíneo tecidual, é um dos principais fatores ligados ao controle da resistência periférica por alterar a produção de mediadores que são secretados pelo endotélio como NO e endotelina (Panza *et al*, 1990).

Assim, por meio da avaliação da imunoreatividade das NOS constitutivas, pudemos propor a utilização de suas expressões como um indicador desta disfunção, considerando os aspectos abaixo discriminados.

Aumentos na expressão de NOSe têm sido relatados em vários modelos animais de aterosclerose induzida pela dieta (Minor *et al*, 1990; Channon *et al*, 2000). As NOS constitutivas geralmente têm sido descritas como protetoras contra o desenvolvimento da aterosclerose (Channon *et al*, 2000). Estudos em camundongos apoE^{-/-} e deficientes de NOSe mostram que estes desenvolvem maiores lesões ateroscleróticas em relação aos

apoE^{-/-}, indicando um papel protetor da NOSe na aterosclerose (Kuhlencordt *et al*, 2001; Van Haperen *et al*, 2002).

Contudo, um paradoxal aumento da extensão das lesões foi descrito nos camundongos que superexpressam NOSe (Ozaki *et al*, 2002). Assim, a maior expressão de NOSe vista nas fêmeas *knockout* em relação ao seu background C57Bl/6, pode ser considerada como uma alteração em resposta à deleção gênica. Enquanto, que o aumento marcante na expressão da NOSn pode ser considerado um mecanismo emergencial na produção de NO que esta isoforma pode desempenhar. Este mecanismo compensatório está descrito na aterosclerose de humanos (Wilcox *et al*, 1997). Ao contrário das isoformas constitutivas, a NOSi é independente da regulação pelo cálcio e é expressa em resposta a estímulos pró-inflamatórios pela ativação de citocinas (Nathan e Xie, 1994). A ativação da NOSi em resposta a estímulos inflamatórios leva a uma produção bem maior de NO, sendo na ordem de 10⁶ a 10⁹ vezes quando comparado com a produção de NO pelas isoformas constitutivas (Michel e Ferno, 1997).

Verificamos que o tratamento com SNAC previne a alteração na expressão das isoformas constitutivas de NOS, as quais foram separadamente discutidas. A imunorreatividade das três isoformas de NOS na aorta de camundongos HC fêmeas, mostraram uma expressão diminuída em relação ao grupo CT, não encontramos explicação para tal fato, uma vez que em machos HC verificamos que a expressão é maior que o CT (Krieger *et al*, 2005) e que tais alterações encontravam-se correlacionadas à hipertensão. Talvez o fato mais característico em fêmeas, seja o impedimento de tais incrementos na

expressão das NOS promovidos pelo tratamento preventivo da SNAC no desequilíbrio redox.

Outro aspecto hemodinâmico de relevância refere-se ao fato de que as fêmeas não apresentaram hipertrofia ventricular esquerda (HVE) como os machos, e ainda, que nestes a administração de SNAC promoveu 100% de prevenção, indicando, novamente, que a gênese e manutenção da hipertensão difere em ambos os sexos.

Por outro lado, podemos nos voltar para as alterações hormonais onde estudos sugerem que a diferença de sexo constitui-se um fator modificador da pressão arterial, suportado pelo fato de que hormônios sexuais em humanos protegem contra o desenvolvimento de hipertensão em fêmeas (Hinojosa e Laborde, 2000) e de que o aumento de andrógenos em machos pode aumentar a pressão arterial (Reckelhoff, 2001). Diversos estudos mostraram que a castração de ratos machos SHR e hipertensos DOCA-sal sensíveis resultam na redução da pressão arterial e que o tratamento com testosterona em ratos castrados promove a hipertensão (Crofton e Share, 1997; Reckelhoff, 2001). Enquanto que em ratos fêmeas Dahl sal-sensíveis neonatos tratados com testosterona desenvolvem pressão arterial elevada comparadas às fêmeas não tratadas (Rowland e Fregly, 1992). Outros estudos em ratos Dahl sal -sensíveis (Hinojosa *et al*, 2000; Rowland e Fregly, 1992; Reckelhoff, 2001; Bayorh *et al*, 2001; Sasaki *et al*, 2000), em ratos DOCA-sal (Crofton e Share, 1997 e David *et al*, 2001) e ratos SHR (Packer *et al*, 2001) mostraram que a pressão arterial é maior em machos do que em fêmeas, e ainda que as fêmeas ovariectomizadas aceleraram o desenvolvimento de hipertensão para um nível que não difere dos machos nas mesmas condições. Assim, nestes modelos experimentais tem sido

atribuído ao estrógeno o papel protetor por meio de mecanismos que promovem um aumento na síntese de vasodilatadores como NO, prostaciclina, AMPc e adenosina e uma redução na síntese de moléculas vasoconstritoras e como endotelina, homocisteína, angiotensina II e atividade da renina .

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que:

1. Camundongos *knockout* fêmeas para o receptor de LDL sob dieta hipercolesterolêmica por um período de 15 dias, desenvolveram lesões ateroscleróticas na aorta proximal ascendente 50% menores em relação aos camundongos machos *knockout* para o receptor de LDL sob o mesmo tratamento. Tais evidências sugerem o papel protetor do estrógeno presente nas fêmeas adultas.
2. Foi verificado que a administração da SNAC reduz em 50% o desenvolvimento do ateroma, tanto em fêmeas como em machos. Evidenciando não haver relação com o dimorfismo sexual.
3. O perfil lipídico das fêmeas mostrou valores mais elevados, tanto de COL como de TG plasmáticos nos camundongos sob dieta hipercolesterolêmica com relação aos controle. O tratamento com SNAC não modificou os altos teores induzidos pela dieta hipercolesterolêmica.
4. Camundongos fêmeas LDLr-/- sob dieta aterogênica evidenciaram aumento de cerca de 10% na pressão arterial, quando comparados aos respectivos camundongos selvagens (WT). O tratamento com SNAC preveniu totalmente a hipertensão induzida pela dieta hipercolesterolêmica. Contudo, nos machos tal hipertensão foi

verificada ocorrer em camundongos LDLr^{-/-} sem dieta hipercolesterolêmica, e o tratamento com SNAC não produziu efeito preventivo na hipertensão. Tais resultados indicam que a gênese da hipertensão é diferente nos dois sexos, sugerindo a participação das vias androgênicas.

5. A frequência cardíaca das fêmeas LDLr^{-/-} sob diferentes tratamentos não mostrou alterações. Contudo, os machos apresentaram uma redução associada à hipertensão;
6. As fêmeas não apresentaram hipertrofia ventricular esquerda associada à hipertensão, a qual foi evidenciada nos machos sob as mesmas condições. Assim o conjunto de alterações hemodinâmicas indica que as fêmeas sofreram um menor impacto nas alterações cardiovasculares estudadas do que camundongos machos.
7. A expressão de NOSe foi evidenciada na aorta das fêmeas LDLr^{-/-} sob dieta comercial, contudo ausente nas WT. Sob dieta hipercolesterolêmica também houve expressão, porém bem menos evidente. Tais expressões foram reduzidas pelo tratamento com a SNAC. Estas alterações indicaram a participação da NOSe na disfunção endotelial presente neste modelo.
8. A expressão de NOSn foi evidenciada na aorta das fêmeas LDLr^{-/-} sob dieta comercial, contudo ausente nas WT. Sob dieta hipercolesterolêmica a sua imunorreatividade foi expressiva, porém

em menor evidência do que no CT. Tais expressões foram reduzidas pelo tratamento com a SNAC. Estas alterações sugerem o papel emergencial desta isoforma no processo de aterogênese presente neste modelo.

9. A expressão de NOSi foi evidenciada na aorta das fêmeas LDLr/- sob dieta comercial, contudo ausente nas WT. Sob dieta hipercolesterolêmica a sua imunorreatividade foi expressiva, porém em menor evidência do que no CT. Tais expressões foram reduzidas pelo tratamento com a SNAC. Estas alterações sugerem o papel na inflamação desta isoforma, participando no processo de aterogênese, o qual foi prevenido pelo tratamento com SNAC neste modelo.

Quadro Resumo Comparativo das Respostas dos camundongos LDLr-/- Machos e Fêmeas

♀	Peso (g)	Área de lesão (µm ²)	Colesterol Tt. Plasma (mg/dl)	Triglicérides Plasma (mg/dl)	Pressão Arterial Média (mmHg)	Frequência Cardíaca (bpm)	Expressão das NOS aórticas
FWT	21 ± 0,4	Ausente	67 ± 3,3	52 ± 4,3	110 ± 2,3	557 ± 17	Ausente
FCT	19 ± 0,3	13 ± 4	199 ± 6,8	72 ± 3,9	116 ± 3,9	556 ± 11	Marcada Expressão
FHC	17 ± 0,6	44 ± 6	1676 ± 62,4	210 ± 19,7	126 ± 2,9	594 ± 11	Expressão difusa
FSNAC	18 ± 0,7	22 ± 5	1635 ± 62,4	242 ± 20	111 ± 3,4	554 ± 10	Ausente
♂	Peso (g)	Área de lesão (µm ²)	Colesterol Tt. Plasma (mg/dl)	Triglicérides Plasma (mg/dl)	Pressão Arterial Média (mmHg)	Frequência Cardíaca (bpm)	Expressão das NOS aórticas
MWT	28 ± 0,4	Ausente	—	—	115 ± 2	579 ± 10	Ausente
MCT	25 ± 0,8	12 ± 1	144 ± 2,3	128 ± 2	130 ± 2	521 ± 8	Marcada Expressão
MHC	23 ± 0,5	92 ± 4	684 ± 14	156 ± 7	126 ± 2	516 ± 9	Expressão difusa
MSNAC	21 ± 0,3	47 ± 2	550 ± 6	135 ± 13	128 ± 2	517 ± 11	Ausente

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams MR, Kaplan JR, Manuck SB et al. Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17- beta estradiol in ovariectomized monkey lack of an effect of added progesterone. **Arteriosclerosis** 10:1051-7, 1990.

Aji W, Ravalli S, Szabolcs M, Jiang X, Sciacca RR, Michler ER, Cannon JP. L-arginine prevents xanthoma development and inhibits atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. **Circulation** 95:430-437, 1997.

Akkad AA., Halligan AW, Abrams K, and al Azzawi F. Differing responses in blood pressure over 24 hours in normotensive women receiving oral or transdermal estrogen replacement therapy. **Obstet Gynecol** 89:97-103, 1997.

August P, Oparil S, Hypertension in women. **J Clin Endocrinol Metab** 84:1862-6, 1999.

Banka CL. Non-genomic actions of estrogens: estrogens as antioxidants. In estrogen and the vessel wall. G Rubanyi, editor **Hawood Academic Publishers**, Newark, NJ.91-106, 1998.

Bar J, Tepper R, Fuchs J, Pardo Y, Goldberger S, Ovadia J. The effect of estrogen replacement therapy on platelet aggregation and adenosine triphosphate in postmenopausal womwn. **Obstet Gyneco** 81:261-4, 1993.

Bayorh MA, Socci RR, Eatman D. Wang M, Thierry Palmer M.The role of gender in salt-induced hypertension.. **Clin Exp Hypertens** 23: 241-55, 2001.

Biecker E, Sägesser H, Reichen J. Vasodilatador mRNA levels are increased in the livers of portal hypertensive NO-synthase 3-deficient mice. **European Journal of Clinical Investigation** 34:283-9, 2004.

- Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. **Science** 272:685-88, 1996.
- Burt VL, Whelton P, Roccella EJ et al. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-91 **Hypertension** 25: 305-13, 1995.
- Bult H. Reestenosis: a challenge for pharmacology. **TIPS** 21:274-279, 2000.
- Calara F, Silvestre M, Casanada F, Yuan N, Napoli C, Palinski W. Spontaneous plaque rupture and secondary thrombosis in apolipoprotein E-deficient and LDL receptor-deficient mice. **J Pathol** 195:257-63, 2001.
- Channon KM, Qian H, George SE. Nitric oxide in atherosclerosis and vascular injury. **Arterioscler Throm Vasc Biol** 20:1873-1881, 2000.
- Collins P, Rosano GM, Sarrel PM, Ulrich L, Adamopoulos S, Beale CM, McNeill JG, Poole-Wilson PA. 17 β -estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease. **Circulation** 92:24-30, 1995.
- Crofton JT, Share L. Gonadal hormones modulate deoxycorticosterone-salt hypertension in male and female rats. **Hypertension** 29:494-9, 1997.
- David FL, Carvalho MH, Cobra AL et al Ovarian hormones modulate endothelin-1 vascular reactivity and mRNA expression in DOCA- salt hypertensive rats. **Hypertension** 38:692-6, 2001.

David LF, Carvalho CHM, Cobra NLA, Nigro D, Fortes BZ, Rebouças NA, Tostes ACR. Ovarian hormones modulate endothelin-1 vascular reactivity and mRNA expression in Doca-Salt hypertensive rats. **Hypertension** 38[part2]:692-696, 2001.

Dominiczak AF, Negrin DC, Clark JS, Brosnan MJ, McBride MW, Alexander MY. Genes and hypertension: from gene mapping in experimental models to vascular gene transfer strategies. **Hypertension** 35:164-172, 2000.

Dubey RK, Imthurn B, Zacharia LC, Jacson EK. Hormonereplacement therapy and cardiovascular disease: what went wrong and where do we go from here? **Hypertension** 44:789-795, 2004.

Eiserich JP, Patel RP, O'Donnel VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reaction and modification of biomolecules. **Mol Aspects Med** 19:221-357, 1998.

Elhage, R, Arnal JF, Pieraggi MT, Duverger N, Fiévet C, Faye JC, Bayard F. 17 β -Estradiol prevents fatty streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 17:2679-2684, 1997.

Faraci FM, Simund CD, Shesely EG, Maeda N and Heistad DD. Responses of carotid artery in mice deficient in expression of the gene for endothelial NO synthase. **Am J Physiol** 274:H564-H570, 1998.

Farhat MYMC, Lavigne e Rawell PW. The vascular protective effects of estrogen. **FASEB J** 10:615-624, 1996.

Ford PC, Lorkovic IM. Mechanistic aspects of the reactions of nitric oxide with transition-metal complexes. **Chem Rev** 102:993-1017, 2002.

Garcia JAD, Santos L, Moura AL, Santos KFR, Wanschel ACBA, Goto K, Fujii K, Kansui Y, Iida M. Changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor in hypertension and ageing: response to chronic treatment with renin-angiotensin system inhibitors. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** 31:650-5, 2004.

Gebara, O.C.E. Interações entre estrogênios e endotélio. In: da Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP. **Endotélio e doenças cardiovasculares**. São Paulo: Atheneu, 21:281-295, 2003.

Grady D. Hormonotherapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. **Ann Inter** 117:1016-1037, 1992.

Groves PH, Banning AP, Penny WJ, Newby, ac, Cheadle HA, Lewis MJ. The effects of exogenous nitric oxide on smooth muscle cell proliferation following porcine carotid angioplasty. **Cardio Res** 30:87-96, 1995.

Harrison-Bernard LM, Schulman IH, Raij L. Postovariectomy hypertension is linked to increased renal AT1 receptor and salt sensitivity. **Hypertension** 42:1157-1163, 2003.

Hinojosa-Laborde C, Lange DL, Haywood JR. Role of female sex hormones in the development and reserval of Dahl hypertension. **Hypertension** 35: 484-9, 2000.

Hodgin BJ, Maeda N. Estrogen and mouse models of atherosclerosis. **Endocrinology** 143:4495-4501, 2002.

Holm P. Significant reduction of the antiatherogenic effect of estrogen by long-term inhibition of nitric oxide synthesis in cholesterol-clamped rabbits. **J Clin Invest** 100:821-828, 1997.

Hough JL, Zilvermist, DB.1986. Effect of 17 beta estradiol on aortic cholesterol content and metabolism in cholesterol-fed rabbits. **Arteriosclerosis** 6:57-63 1986.

Huang PL. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. **Nature** 377:239-242, 1995.

Ignarro LJ, Napoli C, Loscalzo J. Nitric oxide and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide an overview. **Circ Res** 90:21-28, 2002.

Ignarro LJ, Napoli C. Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis. **Curr Atheroscler Rep** 6:281-7, 2004.

Johnson JL, Jackson CL. Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse. **Atherosclerosis** 154:399-406, 2001.

Johnson RC, Chapman SM, Dong ZM, Ordovas JM, Mayadas TN, Herz J, Hynes RO, Schaefer EJ, e Wagner DD. Absence of P-selectin delays fatty streak formation mice. **J Clin Invest** 99:1037-1043, 1997.

Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius red staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J** 11:447-55, 1979.

Kannel WB, Hjortand MC, McNamara PM, Gordon L. Menopause and risk of cardiovascular disease: the framingham study. **Am Intern Méd** 85:447-452, 1976.

Khalil, AR. Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension. **Hypertension** 46:249-254, 2005.

K-Lafamme A, Oster L, Cardinal R, de Champlain J. Role of NO and angiotensin II in the early development of endothelial functions impairment and cardiac hypertrophy in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. **Can J Physiol Pharmacol** 76: 665-75, 1998.

Knowles JW. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS Apoe mice are ameliorated by enalapril treatment. **J. Clin. Invest.** 105:451:458, 2000.

Krege J H, Hodgin B J, Hagaman R J, Smithies O. A noninvasive computadorized tail cuff system for measuring pressure in mice, **Hypertension** 25:1111-1115, 1995.

Krieger MH, Shishido SM, Laurindo FRM, Wanschel ABCA, Estrela HF, Dos Santos L, De Oliveira MG, Franchini K G, Spadari-Bratfisch RC, Santos KFR Antiatherogenic effects of S-nitroso-*N*-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. **Nitric Oxide Biochem.** 14(1):1-88, 2006.

Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, Picard MH, Huang PL. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. **Circulation** 104:448-454, 2001.

Leygue EH, Dotzlaw B, Lu C, Glor PH, Watson e Murphy LC. Estrogen receptor beta: mine is longer than yours? **J Clin Endocrinol Metab** 83:3754-3755, 1998.

Lip GY, Blann AD, Zarifis J, Beevers M, Lip PL e Beevers DG. **J Hypertensions** 13:1674-1678, 1995.

Lip GYH, Blam AD, Jones AF, Lip PL, e Beevers DG. Relation of endothelium, trombogenesis, and hemorheology in systemic hypertension to ethnicity and left ventricular. **Am J Cardiol.** 80:1566-1571, 1997.

Marín J, Martínez MAR. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. **Pharmacol Ther** 75:111-134, 1997.

Marsh MM, Walker RV, Curtiss KL, Banka LC. Protection against atherosclerosis by estrogen is independent of plasm cholesterol levels in LDL receptor-deficient mice. **Journal Lipid Research** 40:893-900, 1999.

Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. **N. Engl. J. Med.** 340:1801-1811, 1999.

Mendelson ME. Genomic and nongenomic effects of estrogen in vasculature. **Am J Cardiol**;90:3F-6F, 2002

Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? **J Clin Invest** 100:2146-52, 1997.

Minor RL Jr, Myers PR, Guerra R Jr, Bates JN, Harrison DG. Diet –induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. **J Clin Invest** 86:2109-16, 1990.

Mitchell GF, Parise H, Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Vita JA, Varsan RS, Levy D. Changes in arterial stiffness and wave reflection with advancing age in healthy men and woman: the Framingham **Heart Study Hypertension** 43:1239-1245, 2004.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric-oxide – Physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev** 43:109-142, 1991.

Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell** 78:915-8, 1994.

Nathan L, and Chaudhuri G. Estrogen and arterosclerosis. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 37:477-515, 1997.

Nathan L. Testosterone inhibits early atherogenesis by conversion to estradiol: critical role of aromatase. **Proc Natl Acad Sci USA.** 98:3589-3593, 2001.

Olsen NJ, Kovacs WJ. Gonadal steroids and immunity. **Endocr Rev** 17:369-384, 1996.

Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. **Am J Physiol Regul Inter Comp Physiol** 286:R233-R249, 2004.

Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Hirase T, Namiki M, Inoue N, Hirata K, Yasui H, Sakurai H, Yoshida Y, Masada M, Yokoyama M. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. **J Clin Invest** 119:331-340, 2002.

Packer CS, Pelaez NJ, Kramer JA. Estrogen protects against hypertension in the spontaneously hypertensive rat, but its protective mechanism is unrelated to impaired arterial muscle relaxation. **J Gender Specific Med** 4:20-7, 2001.

Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. **Atherosclerosis** 68:231-40, 1987.

Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. **N Engl J Med** 323:22-27, 1990.

Peng N, Clark JT, Wei CC, Wyss JM. Estrogen depletion increase blood pressure and hypothalamic norepinephrine in middle-aged spontaneously hypertensive rats. **Hypertension** 41:1164-1167, 2003.

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

Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. **Hypertension** 37:1199-208, 2001.

Reckelhoff JF, Fortepiani LA. Novel mechanisms responsible for post-menopausal hypertension. **Hypertension** 43:918-923, 2004.

Ricardo KFS, Shishido SM, de Oliveira MG e Krieger MH. Characterization of hypotensive effect of S-nitroso-N-acetyl-L-cysteine (SNAC) in normotensive and hypertensive conscious rats. **Nitric Oxide** 7:57-66, 2002.

Rifici VA, Khachadurian AK. The inhibition of low-density lipoprotein oxidation by 17-beta estradiol. **Metabolism**, 41:1110-14, 1992.

Roberts A, Thompson JS. Inbred mice and their hybrids as an animal model for atherosclerosis research. **Adv Exp Med Biol** 67:313-27, 1976.

Rosenfeld ME, Polinsky P, Virmani R, Kauser K, Rubanyi G, Schwartz SM. Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the apoE knockout mouse. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 20:2587-92, 2000.

Rowland NE, Fregly MJ. Role of gonadal hormones in hypertension in the Dahl salt-sensitive rat. **Clin Exp Hypertens** A14:367-75, 1992.

Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. **Nature** 353:265-7, 1991.

Rudic RD. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. **J Clin Invest** 101:731:736, 1998.

Sasaki T, Ohno Y, Otsuka K, Suzawa T, Suzuki H, Saruta T. Oestrogen attenuates the increases in blood pressure and platelet aggregation in ovariectomized and salt-loaded Dahl salt-sensitive rats. **J Hypertension** 18:911-17, 2000.

Seely EW, Walsh BW, Gerhard MD and Williams GH. Estradiol with or without progesterone and ambulatory blood pressure in postmenopausal women. **Hypertension** 33:1190-1194, 1999.

Shesely EG. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase
Proc Natl Acad Sci USA 93:13176-13181, 1996.

Shishido SM, Spadari-Bratfisch RC, de Oliveira MG, Laurindo FRM, Krieger MH.
Hemodynamically-independent prevention of left ventricular hypertrophy in
hypercholesterolemic LDLr^{-/-} mice by S-nitroso-N-acetylcysteine. **Circulation Research** ,
2005 (submitted).

Song L, Leung C, Schindler C. Lymphocytes are important in early atherosclerosis. **J Clin Invest** 108:251-59, 2001.

Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J.
S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically
active compounds. **Proc Natl Acad Sci U S A** 89:444-8, 1992.

Tangirala KR, Rubin M E, Palinski W. Quantitation of atherosclerosis in murine models:
correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the
extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and alipoprotein E-deficient mice.
Journal Lipid Research 36:2320-2328, 1995.

Thompson J, Khalil RA. Gender differences in the regulation of vascular tone. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 30:1-15, 2003.

Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MH. Effects of estrogen on the vascular system.
Braz J Med Biol Res 36(9):1143-1158, 2003.

Trieu VN, Uckun FM. Male-associated hypertension in LDL-R deficient mice. **Biochem Biophys Res Commun** 247:277-9, 1998.

van der Mooren MJ, Mijatovic V, van Baal WM, Stehouwer CD. Hormone replacement therapy in postmenopausal women with specific risk factors for coronary artery disease. **Maturitas** 30:27-36, 1998.

van Haperen R, de Waard M, van Deel E, Mees B, Kutryk M, van Aken T, Hamming J, Grosveld F, Duncker DJ, de Crom R. Reduction of blood pressure, plasma cholesterol, and atherosclerosis by elevated endothelial nitric oxide. **J Biol Chem** 277:48803-7, 2002.

Van Snick. Interleukin-6: an overview. **Annu Rev Immunol** 8:253-78, 1990.

Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in hypertension. **J Hypertens Suppl** 14:83-93, 1996.

Vesselinovitch D, Wissler RW, Doull J. Experimental production of atherosclerosis in mice. 1: effects of various synthetic diet and radiation on survival time, food consumption and body weight in mice. **J Atheroscler Res** 8:483-95, 1968.

Vesselinovitch D, Wissler RW. Experimental production of atherosclerosis in mice. 2: effects of atherogenic and high-fat diets on vascular changes in chronically and acutely irradiated mice. **J Atheroscler Res** 8:497-523, 1968.

Walif Aji, Stefano Ravalli, Matthias Szabolcs, Xian-cheng Jiang, Robert R. Sciacca, Robert E. Michler, Paul J. Cannon. L-Arginine Prevents Xanthoma Development and Inhibits Atherosclerosis in LDL Receptor Knockout Mice. **Circulation**. 95:430-437, 1997.

Wang YR, Yen CH, Sun YF, Laun YT. Gender-dependent response in blood pressure changes following the inhibition of nitric oxide synthase. **Chin J Physiol** 46:91-4, 2003.

Weiner CP. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 91:5212-5216, 1994.

Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. **Arterioscler Throm Vasc.** 17:2479-88, 1997.

Zatz R, Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. **Hypertension** 32:958-64, 1998.

Zhu Y, Bian Z, Lu P, Karas RH, Bao L, Cox D, Hodgins J, Shaul PW, Thoren P, Smithies O, Gustafsson JA, Mendelson ME. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor β . **Science** 295:505-508, 2002.