



TCC/UNICAMP
F226a
3261 FEF/1220

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA

ADRIANA MACHADO DE FARIA

**HIPERTENSÃO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL:
DIFERENÇAS RELACIONADAS AO GÊNERO**

Campinas
2006

9.201



ADRIANA MACHADO DE FARIA

**HIPERTENSÃO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL:
DIFERENÇAS RELACIONADAS AO GÊNERO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado à Faculdade de Educação Física da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Bacharel em Educação Física.

Marta Helena Krieger
Orientadora

Campinas
2006

ADRIANA MACHADO DE FARIA

**HIPERTENSÃO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL:
DIFERENÇAS RELACIONADAS AO GÊNERO**

Este exemplar corresponde à redação final do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, defendido por Adriana Machado de Faria e aprovado pela Comissão julgadora em: 21/11/2006.

Marta Helena Krieger
Orientadora

Amarylis Claudine Bonito Azeredo Wanschel

Mara Patrícia Traina Chacon¹Mikahil

Campinas
2006

DEDICATÓRIA

À minha família; que haja sempre uma estrela brilhando a favor de nossa união.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^ª Dr^ª Marta Helena Kriger, pelos conselhos sempre úteis e pela paciência comigo durante todo esse tempo de trabalho.

Aos componentes da banca examinadora, Mara Patrícia e Amarylis, por terem dado sua valiosa contribuição neste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, pela amizade e companheirismo.

Aos meus pais, Mara e Ildfonso, e irmão Daniel, pelo apoio incondicional.

Às minhas amigas de infância, Flávia, Araceli e Heloísa: que vocês vençam todas as etapas da vida com essa perseverança que lhes é particular.

Aos meus amigos de faculdade, por fazerem valer a pena.

Ao Cesar, por motivar todos os meus projetos e tomar conta do meu coração.

Enfim, a todas as pessoas que contribuíam direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

DE FARIA, Adriana Machado. **Hipertensão e Disfunção Endotelial: Diferenças relacionadas ao gênero**. 48f. Trabalho de conclusão de curso (graduação) – Faculdade de Educação Física. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

RESUMO

A instalação da aterosclerose está relacionada à disfunção endotelial, sendo esta caracterizada por hipertensão e vasoreatividade alterada. Mulheres na pré-menopausa, devido à ação do estrogênio, apresentam vasos mais protegidos que homens. Os objetivos do estudo foram verificar pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC) *in vivo* e vasodilatação *in vitro* em segmentos de aortas, em resposta à Acetilcolina (ACh) e ao Nitroprussiato de Sódio (SNP), após constrição com Fenilefrina (Phe) em camundongos fêmeas. Os resultados também foram comparados a obtidos em machos sob mesmo tratamento; para posterior correlação com a prática de exercícios físicos regulares, uma vez que estes auxiliam na manutenção da saúde e integridade vascular. As fêmeas foram divididas e tratadas por 15 dias em: Grupo selvagem (WT) - C57BL6 e Grupo Controle (CT) - LDLr^{-/-}, alimentados com dieta comercial e Grupo Hipercolesterolêmico (HC) - LDLr^{-/-}, com dieta rica em colesterol e lipídios. Os grupos CT e WT não apresentaram diferenças na PA média e FC, bem como no relaxamento vascular. O grupo HC apresentou aumento na PA sistólica (7,6%) e FC (6,4%) e menor responsividade contrátil em relação ao CT, indicando que a aterogênese associou-se à hipertensão, aumento da FC e vasoreatividade alterada. Comparando-se com machos, as fêmeas apresentaram menor responsividade à Phe em todos os grupos e menor sensibilidade ao SNP, dentro do grupo WT; sugerindo diferenças de gênero no controle da motricidade arterial.

Palavras-chaves: Aterosclerose; disfunção endotelial; estrogênio.

DE FARIA, Adriana Machado. **Hypertension and Endothelial Dysfunction: Gender related differences**. 48f. Trabalho de conclusão de curso (graduação) – Faculdade de Educação Física. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

ABSTRACT

The installation of atherosclerosis is related with endothelial dysfunction, which is characterized by hypertension and altered vasoreactivity. Women in pre-menopause show vessels more protected than men, due to the effects of estrogen. The goals of the study was verify arterial pressure (AP), heart reat (HR) *in vivo* and vasodilation *in vitro* in aorta segments, pre-contracted with Phenylefrine (Phe), in response to Acetylcholine (Ach) and Sodium Nitroprusside (SNP), in female mice, aimed next correlation with results obtained in males under the same treatment. Physical exercises helps in maintaining vascular health and integrity, therefore the analysis was associated with regular exercises practice. The females were subscribed and treated for 15 days in: Wild Type Group (WT) – C57BL6 and Control Group (CT) – LDLr^{-/-}, fed with commercial diet and Hypercholesterolemic Group (HC) – LDLr^{-/-}, with high cholesterol diet. No differences were observed in mean AP and HR, as well in the vascular relaxation, between CT and WT groups. HC group showed high systolic AP (7.6%) and HR (6.4%) and lower contractile responsivity to CT group, indicating that atherogenesis is related with hypertension, HR increased and altered vasoreactivity. Females in relation to males showed high sensitivity to SNP in WT group, and lower responsivity to Phe in both groups, suggesting gender differences in arterial motricity control.

Keywords: Atherosclerosis; endothelial dysfunction; estrogen

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reatividade Vascular à Fenilefrina – Fêmeas	26
Figura 2	Reatividade Vascular ao Nitroprussiato de Sódio – Fêmeas	26
Figura 3	Reatividade Vascular à Fenilefrina – Machos	28
Figura 4	Reatividade Vascular ao Nitroprussiato de Sódio – Machos	28
Figura 5	Reatividade Vascular ao N-Nitro L-Arginina Metil Éster	31
Figura 6	Reatividade Vascular ao Cloreto de Potássio – Fêmeas	32
Figura 7	Reatividade Vascular ao Cloreto de Potássio – Machos	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Pressão Arterial e Frequência Cardíaca – Fêmeas	22
Tabela 2	Pressão Arterial e Frequência Cardíaca – Machos	23
Tabela 3	Pressão Arterial e Frequência Cardíaca – Fêmeas x Machos	24
Tabela 4	Reatividade Vascular – Fêmeas	25
Tabela 5	Reatividade Vascular – Machos	27
Tabela 6	Reatividade Vascular à Fenilefrina – Fêmeas x Machos	29
Tabela 7	Reatividade Vascular ao Nitroprussiato de Sódio – Fêmeas x Machos	29
Tabela 8	Reatividade Vascular ao N-Nitro L-Arginina Metil Éster e à Fenilefrina	30
Tabela 9	Reatividade Vascular ao Cloreto de Potássio	33
Tabela 10	Reatividade Vascular ao Cloreto de Potássio e à Fenilefrina	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
Ad libitum	À vontade
ANOVA	Análise de variância
CEEA/IB	Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia
CML	Células musculares lisas
CT	Controle
DCV	Doenças cardiovasculares
DE	Disfunção endotelial
EC50	Concentração molar do agonista que gera uma resposta de 50% da máxima
eNOS	Óxido Nítrico Sintase endotelial
FC	Frequência cardíaca
HC	Hipercolesterolêmico
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LDLox	LDL oxidada
LDLr-/-	<i>Knockout</i> para o receptor de LDL
L-NAME	N – Nitro L Arginina Metil Éster
NO	Óxido nítrico
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
Pd2	Logaritmo negativo da concentração molar do agonista que gera uma resposta de 50% da máxima
Phe	Fenilefrina
RH	Reposição hormonal
SNP	Nitroprussiato de sódio
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
WT	<i>Wild Type</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Endotélio e aterosclerose	10
1.2 Endotélio e estrogênio	12
1.3 Endotélio e exercício físico	13
1.4 Justificativa	16
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Animais	18
3.2 Freqüência cardíaca e pressão arterial	19
3.3 Reatividade vascular “ <i>in vitro</i> ”	19
4. ANÁLISE DOS RESULTADOS	21
5. RESULTADOS	22
5.1 Freqüência cardíaca e pressão arterial	22
5.2 Reatividade vascular “ <i>in vitro</i> ”	24
5.3 Reatividade à Acetilcolina	30
6. DISCUSSÃO	34
6.1 Freqüência cardíaca e pressão arterial	34
6.2 Reatividade vascular “ <i>in vitro</i> ”	35
6.3 Reatividade à Acetilcolina	37
7. CONCLUSÃO	39
SUGESTÃO PARA PESQUISAS FUTURAS	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 ENDOTÉLIO E ATEROSCLEROSE

A parede vascular é formada por três camadas distintas: íntima, média e adventícia (YUN et al, 2005). A camada adventícia, mais externa, é constituída por tecido conjuntivo e algumas fibras elásticas; servindo de suporte aos vasos. A camada média constitui-se de fibras elásticas e células musculares lisas, que devido a sua capacidade contrátil, são responsáveis pela variação do tônus vascular. Já, a camada íntima é formada basicamente por células endoteliais com características endócrinas, pois produzem e liberam substâncias que agem localmente e à distância em vários territórios do organismo. Tais células funcionam como sensores biológicos, uma vez que captam alterações no meio, como mudanças de pressão ou no equilíbrio oxidativo, emitindo respostas que objetivam reequilibrar o ambiente vascular (NASCIMENTO et al, 2003).

O endotélio íntegro é capaz de controlar o tônus vascular, através da produção e liberação de fatores constritores e dilatadores do vaso; além de exercer outras funções como antiinflamatórias específicas e controle do estado de coagulabilidade sanguínea, contribuindo assim para a manutenção da homeostase (AMODEO, HEIMANN, 2003).

O endotélio é responsável pela manutenção das alterações funcionais e adaptativas através da secreção de várias substâncias com atividades pró e anticoagulantes, e da expressão de receptores capazes de promover a adesão de moléculas, bem como exercer ações vasoativas. A homeostase vascular é o resultado da regulação dinâmica dessas funções (FONSECA et al, 2003).

Uma das principais substâncias vasodilatadoras liberadas pelo endotélio é o Óxido Nítrico (NO), o qual possui funções protetoras, regulatórias e também deletérias (LAURINDO et al, 2003). No endotélio funcional ocorre a secreção do NO através de diversos estímulos. Este gás se difunde para o músculo liso, adjacente ao endotélio, e ativa a Guanilato Ciclase, enzima responsável pela formação de GMPc a partir de GMP. O GMPc promove a abertura de canais de Ca^{2+} , fazendo com que a concentração deste diminua no meio intracelular,

relaxando o músculo liso e dilatando, portanto, o vaso. As células endoteliais formam uma camada vascular contínua e isso garante ao NO exercer suas ações de forma eficiente (NASCIMENTO et al, 2003).

A manutenção de um tônus vascular depende do equilíbrio entre as concentrações dos fatores vasodilatadores e vasoconstritores derivados do endotélio. A Disfunção Endotelial (DE) associa-se à perda da biodisponibilidade (relação entre síntese e degradação) do NO no ambiente vascular (LAURINDO et al, 2003) dificultando, desta forma, a vasodilatação, sendo este o principal fator desencadeante da doença aterosclerótica vascular em animais e humanos. Essa disfunção ocorre bem antes das manifestações estruturais da aterosclerose e sua avaliação pode prever eventos cardiovasculares, sendo um marcador da atividade da doença aterosclerótica (MONCADA, 2006).

A aterosclerose é uma doença associada à inflamação e DE. É definida como a modificação e o acúmulo de lipídeos na parede das artérias, formando placas, os ateromas, desencadeando lesões na parede vascular e conseqüente disfuncionalidade de suas células (NASCIMENTO et al, 2003). O Óxido Nítrico (NO) é a principal substância antiaterogênica, devido à sua ação dilatadora e por dificultar a adesão e agregação plaquetárias.

A aterosclerose apresenta-se, muitas vezes, acompanhada de hipertensão arterial. A hipertensão é mais comum em homens com 30-45 anos, em relação à mulheres na mesma idade e à mulheres na pré – menopausa, sugerindo diferenças de gênero nos mecanismos de controle fisiológico da pressão arterial e efeitos protetores dos hormônios sexuais femininos (KHALIL, 2005).

Indivíduos e animais com doença aterosclerótica em fases adiantadas apresentam diminuição da vasodilatação mediada pelo aumento do fluxo e vasoconstrição paradoxal após infusão de Ach (BAHIA et al, 2004). Sobretudo, estudos em nosso laboratório demonstraram que a vasodilatação mediada pelos receptores de Ach se encontra aumentada em estágios iniciais da doença aterosclerótica nos camundongos LDLr^{-/-} (KRIEGER et al, 2006).

A avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio é um indicador da integridade do mesmo. Sendo importante para o entendimento da etiopatogenia da aterosclerose e para avaliação dos resultados de intervenções preventivas e terapêuticas. A função vasomotora dependente do endotélio “in vitro”, mediada pelo NO, pode ser testada com a utilização, em sistemas de aorta isolada, da Acetilcolina (Ach). A Ach promove a abertura de

canais de Ca^{2+} no endotélio, possibilitando sua entrada na célula e conseqüente ligação à calmodulina, composto este que ativa a Óxido Nítrico Sintase endotelial (eNOS), produzindo assim uma maior quantidade de NO (NILIUS, DROOGMANS, 2001). Caso o endotélio não esteja íntegro, tem sido descrito ocorrer vasoconstrição, podendo esta ser devido ao efeito paradoxal da Ach ao agir diretamente sobre as células da musculatura lisa, entre outros fatores. Enquanto que a administração de Nitroprussiato de Sódio (SNP) “in vitro” mostra o relaxamento independente do NO sintetizado no endotélio, podendo-se avaliar a funcionalidade das CML, pois o SNP é um doador de NO, cuja ação se dá diretamente sobre o músculo liso vascular, ativando a Guanilato Ciclase, promovendo assim o relaxamento do vaso (WANSTALL et al, 2001).

A utilização do camundongo *knockout* para o receptor de LDL (Low Density Lipoprotein) permite o estudo das disfunções endoteliais na fase inicial do processo aterogênico, uma vez que os animais desenvolvem lesões na área aórtica proximal quando submetidos a uma dieta rica em colesterol e lipídeos (SANTOS et al, 2006), o que permite a simulação da hipercolesterolemia familiar humana.

1.2 ENDOTÉLIO E ESTROGÊNIO

Observa-se que, do ponto de vista vascular, as mulheres na pré-menopausa encontram-se hemodinamicamente mais protegidas do que homens da mesma idade, sendo menor, portanto, a incidência de doenças cardiovasculares (DCV) sob estas condições. Durante a menopausa, há um aumento nos fatores de risco, igualando o número de ocorrências entre homens e mulheres (GEBARA et al, 2003; GORDON et al, 1978). Observa-se, nesse período, que se encontram associados à elevação do colesterol total e LDL colesterol, ao aumento dos níveis de fibrinogênio e à diminuição do potencial fibrinolítico (GEBARA et al, 1995).

Essa maior proteção durante a pré-menopausa se deve à presença do estrogênio (GEBARA et al, 2003), o qual possui grande afinidade pelo endotélio e CML, devido à presença de receptores específicos (receptores homólogos α e β) em ambas estruturas (POWERS et al, 1991; TOSTES et al, 2003). A ligação do hormônio ao receptor atua sobre as CML, modificando

membranas e canais de íons, inibindo assim o influxo de Ca^{2+} extracelular, estando o hormônio em concentrações suprafisiológicas (MUGGE et al, 1993; GEBARA et al, 2003). Por outro lado, em concentrações fisiológicas, essa ligação estimula a abertura dos canais de K^+ ativados pelo Ca^{2+} , promovendo a manutenção do tônus vascular relaxado (WELLMAN et al, 1996), além de agir sobre as células endoteliais, aumentando a transcrição e a atividade da enzima eNOS (LAU, 2002; LU et al, 2004), por meio de um receptor específico e, conseqüentemente, potencializando a secreção de NO.

Além dos efeitos não genômicos citados, o estrogênio exerce também ações genômicas, como o aumento da expressão gênica de importantes enzimas vasodilatadoras, como a prostaciclina e a Óxido Nítrico Sintase, e a alteração da sensibilidade das CML ao NO (GEBARA et al, 2003). A redução do estrogênio circulante (menopausa) ou a perda dos receptores hormonais induzem a um processo hipertensivo e aterogênico (GEBARA et al, 2003).

Os hormônios sexuais levam então ao relaxamento vascular através da modificação da síntese/liberação/bioatividade dos fatores relaxantes e constritores do endotélio (KHALIL, 2005). Estudos comprovaram que há maior liberação de NO em mulheres na pré - menopausa em relação a homens (FORTE et al, 1998; ORSHALL, KHALIL, 2004), explicando em parte a menor incidência de doenças cardiovasculares nessa parcela da população.

O estrogênio e o exercício físico, bem como o estresse de cisalhamento do sangue na parede do vaso (shear stress), aumentam os níveis de expressão da eNOS (CARVALHO et al, 2003; SUVORAVA et al, 2004), além de diminuir os níveis de LDL - colesterol e aumentarem a proteção evitando que seja oxidado (LDLox) (WAKATSUKI et al, 2004), o que seria altamente tóxico às células endoteliais (HOLVOET, COLLEN, 1994). São, portanto, fatores importantes na prevenção da aterosclerose e de outras DCV.

1.3 ENDOTÉLIO E EXERCÍCIO FÍSICO

O estilo de vida sedentário tem resultado em um aumento da morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares, como indicam estudos comparativos de indivíduos com diferentes níveis de exercícios diários (LEON et al, 1997; MANSON et al, 2002). Segundo

um estudo realizado por Patel et al (2005), indivíduos que apresentaram menor potencial vasodilatador que a média observada dos sujeitos analisados, mostraram menor capacidade na realização de exercícios físicos em relação ao tempo. Indicando, assim, que a função endotelial encontra uma íntima relação com a capacidade de realização de esforços. Essa relação se dá, uma vez que o endotélio possui funções secretoras, metabólicas e imunológicas; regulando o fluxo sanguíneo, a adesão e agregação plaquetárias, a coagulação e fibrinólise e as respostas imunológicas (PATEL et al, 2005). Os exercícios regulares, associados à dieta com baixo nível de colesterol e o não tabagismo, são fundamentais na preservação da integridade e funcionalidade endotelial, protegendo então contra eventos cardiovasculares adversos (DUCKLES et al, 2005; LESNIAK et al, 2001).

O exercício físico regular está associado a diversas adaptações fisiológicas benéficas, envolvendo a musculatura esquelética, o músculo cardíaco, o volume sanguíneo e modificações metabólicas (O'CONNOR et al, 1989). Em parte, tais benefícios estão relacionados ao aumento da expressão da enzima eNOS vascular (SUVORAVA et al, 2004), e conseqüentemente da biodisponibilidade de NO endógeno, verificado tanto em animais como em humanos (HAMBRECHT et al, 2000, 2003; KOJDA et al, 2001). Essa melhora na biodisponibilidade de NO pode determinar uma maior capacidade de realização de exercícios através de sua ação vasodilatadora (SUVORAVA et al, 2004); reduzindo a progressão de DCV (O'CONNOR et al, 1989). Além da vasodilatação, o NO possui propriedades antioxidantes, antiproliferativas e antiapoptóticas (GEWALTIG, KOJDA, 2002).

A inatividade física, também denominada de sedentarismo, tem sido relacionada à reduzida expressão vascular da eNOS. Sendo que esta redução constitui-se de um dos mecanismos chaves para desencadear a DE (SUVORAVA et al, 2004). Tal condição aumenta então o risco de adversidades cardiovasculares, à medida que altera a função endotelial de indivíduos saudáveis, prejudicando a vasodilatação dependente do endotélio. Contudo, Suvorava et al (2004), observou que a atividade contrátil e o relaxamento induzidos por doadores de NO, ou seja, independentes do endotélio, não se mostram alterados em relação a esta condição.

Um outro ponto a ser ressaltado, é que o sedentarismo, além de estar associado à diminuição da expressão da eNOS também promove o aumento do estresse oxidativo, condição presente em certas DCV, tal como a aterosclerose. Assim, o estresse oxidativo pode inibir a atividade catalítica da enzima Guanilato Ciclase (LABER et al, 2002), fundamental no processo

de produção de NO. A disfunção endotelial encontra-se associada aos processos de inflamação vascular, menor atividade da eNOS e/ou estresse oxidativo (SUVORAVA et al, 2004).

De forma resumida, são propostos dois mecanismos que explicam a regulação da expressão e a atividade da eNOS pelo exercício: (1º) o exercício físico aumenta a frequência cardíaca (FC) e induz a hiperemia ativa, os quais promovem um aumento no fluxo sanguíneo e conseqüentemente no estresse de cisalhamento. Este último além de aumentar a expressão vascular da eNOS, ativa a produção de NO (BUSSE, FLEMUNG, 1998; UEMATSU et al, 1995); (2º) o exercício também aumenta o consumo de oxigênio e a geração de espécies reativas de oxigênio, como o superóxido e o peróxido de hidrogênio (JI, 1999) que, como observado em determinados estudos, podem aumentar a expressão e atividade da eNOS (CAI et al, 2001; DRUMMOND et al, 2000; KOJDA, HARRISON, 1999; LAUER et al, 2002).

Retomando a questão hormonal, em mulheres na pós-menopausa, Harvey et al (2005), observou que a vasodilatação mediada pelo fluxo foi marcadamente reduzida quando comparada à pré - menopausa; contudo tal alteração foi revertida com a realização de exercícios regulares. Tais resultados mostraram que o exercício e a reposição hormonal (RH) melhoram a função endotelial na pós-menopausa, normalizando-a. Apoiando o achado, Wong e Wong (1999), verificaram também que a RH e a prática regular de exercícios físicos conferem proteções cardiovasculares em mulheres sob as mesmas condições. Sendo então, o exercício, uma alternativa não farmacológica.

Vale ressaltar ainda que, assim como o exercício auxilia na manutenção da função endotelial, esta, por sua vez, influencia de forma benéfica a capacidade de realização de atividades físicas. Há vários fatores vasorreativos que contribuem para manter um fluxo sanguíneo adequado em músculos sob diferentes condições fisiológicas (MOMKEN et al, 2004), sendo que a redução severa no fluxo sanguíneo, como observado no sedentarismo, exerce ações deletérias na capacidade oxidativa muscular e na atividade enzimática relacionada (BRASS et al, 2000; CLYNE et al, 1985).

A DE induzida pelo sedentarismo é, então, um importante evento patofisiológico. Essa mudança desfavorável na função vascular pode ser prevenida ou revertida pela prática de exercícios físicos diários de baixa intensidade ou por um curto período de exercício de alta intensidade (SUVORAVA et al, 2004).

A prática regular de exercícios exerce efeitos benéficos em pacientes com DCV, reduzindo o grau de DE, ou mesmo tornando estável uma placa já existente; e também em indivíduos saudáveis, mantendo a função endotelial normal; uma vez que eleva a síntese e biodisponibilidade de NO e reduz o estresse oxidativo. Isso é um exemplo de como o estilo de vida complementa a medicina e a farmacologia na prevenção de doenças e manutenção da saúde cardiovascular.

1.4 JUSTIFICATIVA

Esta monografia foi baseada no projeto de pesquisa desenvolvido na iniciação científica, cujo título é “Disfunção endotelial arterial em camundongos LDLr^{-/-} fêmeas sob dieta rica em colesterol”. O mesmo foi realizado no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Unicamp, sob o apoio da agência financiadora PIBIC/CNPq.

No presente trabalho objetivou-se estabelecer um paralelo entre os benefícios da prática regular de exercícios físicos e as disfunções cardiovasculares estudadas, bem como outras pesquisas que vinham se desenvolvendo no laboratório.

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais foram analisar a frequência cardíaca, pressão arterial e resposta vasoreativa em anéis isolados de artérias aortas (porção descendente) de camundongos fêmeas knockout LDLr^{-/-}. As seguintes questões foram elaboradas e constituíram-se dos objetivos específicos do presente estudo:

- A alteração na vasoreatividade da artéria aorta “*in vitro*” é produto da manipulação genética ou está relacionada à dieta rica em colesterol e lipídeos e conseqüente aterosclerose?

- As fêmeas apresentam a mesma disfunção endotelial verificada em machos?

- As fêmeas *knockout* LDLr^{-/-}, sob dieta comercial, apresentam respostas aos vasodilatadores similares às do camundongo selvagem (WT)?

A partir dos resultados e conclusões foi elaborada uma proposta para pesquisas futuras, relacionando a prática de exercícios físicos regulares com a saúde cardiovascular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram obtidos e mantidos em biotério aclimatado com ciclos de claro e escuro, com uma temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, camundongos LDLr^{-/-} (camundongos *knockout* para o receptor de LDL) e seu background (Wild Type, WT), os quais foram criados no Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). A utilização dos animais foi aprovada pelo Comitê Institucional para Ética em Experimentação Animal do Instituto de biologia, Unicamp (CEEA/IB - Unicamp), sob protocolo 849-1. Foram utilizados de 6 a 8 camundongos fêmeas por grupo, com peso médio de 19g, e com 12 a 15 semanas de idade.

Os Camundongos fêmeas foram divididos em três grupos, sendo que ambos receberam dieta e água *ad libitum*.

1. Grupo selvagem (WT): camundongos C57BL6, os quais receberam dieta comercial;
2. Grupo Controle (CT), camundongos LDLr^{-/-}, alimentados com dieta comercial;
3. Grupo Hipercolesterolêmico (HC), camundongos LDLr^{-/-}, mantidos sob uma dieta contendo 20% de gordura, 1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico (manipulação ITAL/ Campinas).

Após 15 dias de dieta, foi aferida a pressão arterial (PA) e a FC por meio de pletismografia caudal dos camundongos e os mesmos foram sacrificados por deslocamento cervical, para toracotomia, seguida da coleta da aorta abdominal, sendo a porção descendente para os estudos *in vitro*.

Os machos passaram pelo mesmo protocolo experimental, sendo que foram utilizados os dados coletados em pesquisas paralelas em nosso laboratório (SANTOS, 2005; KRIEGER et al, 2006).

3.2 FREQUÊNCIA CARDÍACA E PRESSÃO ARTERIAL

A pressão arterial e a frequência cardíaca foram aferidas “*in vivo*”, através de um método denominado pletismografia caudal. Para isso, foi utilizado um protocolo para adaptação dos camundongos ao sistema Kent Scientific (XBP1000) de medida de PA caudal e FC, descrito segundo Santos (2005). O mesmo constitui de 6 sessões de adaptação, compostas de 15 ciclos de medidas cada, executadas durante o ciclo claro dos animais. Em seguida, a PA e a FC de cada animal foram aferidas no dia do sacrifício, utilizando-se 30 ciclos de medidas. Os dados foram arquivados em planilhas eletrônicas, sendo consideradas as faixas de valores de FC (470 a 650 bpm) e volume caudal (25 a 50 μ L) consideradas normais para este sistema de medidas.

3.3 REATIVIDADE VASCULAR “*IN VITRO*”

Seguindo o protocolo de Krieger et al (2006), foram retirados de 1 a 2 anéis de aproximadamente 2 mm de comprimento da área proximal da aorta de cada animal, os quais foram em seguida acoplados a um sistema de ganchos e mantidos em uma solução de Krebs-Hanseleit, com a seguinte composição (em mM): NaCl 115,0; KCl 4,6; CaCl₂·2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄·7H₂O 12,4; NaHCO₃ 25,0; Glicose 11,0 e ácido ascórbico 0,11; com um PH de 7,4, a 37°C. Os anéis foram mantidos sob uma tensão basal de 0,5 g, durante 20 min para sua estabilização. Esse sistema foi acoplado a um transdutor de força isométrico (Narco Biopac-System, modelo F-60), o qual foi conectado a um polígrafo (Narco Bio-System, modelo DMP-4), para registro da tensão desenvolvida pelos anéis. Doses cumulativas de Acetilcolina (Ach, 10⁻¹⁰ a 10⁻⁴M) foram aplicadas no segmento aórtico, após a máxima contração promovida por Fenilefrina (Phe, 10⁻¹⁰ a 10⁻⁵M), definida quando três concentrações consecutivas do mesmo não geraram aumento de tensão. Em seguida os anéis foram lavados com a Solução de Krebs-Hanseleit e após estabilização, foi realizada uma segunda contração com Phe, numa concentração equivalente a 80% da máxima (10⁻⁶M), para verificar a resposta a doses cumulativas de Nitroprussiato de Sódio

(SNP, 10^{-10} a 10^{-4} M). A partir daí, foram obtidas curvas concentração-efeito. A resposta aos vasorreagentes utilizados foi avaliada pela determinação do valor pD_2 , que corresponde ao logaritmo negativo da concentração molar do agonista que determina uma resposta igual a 50% da resposta máxima (EC50), em cada experimento.

4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Foram realizadas análises estatísticas comparando-se os resultados obtidos entre as fêmeas dos grupos HC e WT, com base no grupo CT, e comparando-os com resultados obtidos em machos sob mesmo tratamento em pesquisas realizadas anteriormente no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Unicamp (SANTOS, 2005; KRIEGER et al, 2006).

Os dados obtidos foram expressos como médias aritméticas, incluindo-se seus respectivos erros padrão; sendo comparados entre os diferentes grupos e entre os gêneros. O Teste t de Student, não pareado, foi utilizado para comparar as médias dos valores entre os sexos, enquanto a Análise de Variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey, foi utilizada para comparar os valores entre os vários grupos dentro do mesmo sexo. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0,05.

Os resultados foram organizados em tabelas e gráficos e foram tratados com a utilização dos softwares Microsoft Excel, Graph Pad Prism e Graph Pad InStat, sendo então apresentados a seguir.

5. RESULTADOS

5.1 FREQUÊNCIA CARDÍACA E PRESSÃO ARTERIAL

Os valores obtidos através de pletismografia caudal, referentes à pressão arterial e a frequência cardíaca nos camundongos fêmeas e machos estão apresentados nas tabelas a seguir, com as respectivas análises estatísticas.

Na **tabela 1** foram apresentados os valores de pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) e FC das fêmeas dos grupos WT, CT e HC. O grupo CT apresentou uma PAS 9% maior em relação ao WT, contudo, não são observadas diferenças significativas nos valores de PAD, PAM e FC entre os mesmos. As fêmeas LDLr-/- sob dieta rica em colesterol e lipídeos (HC) apresentaram um aumento na PAS de 7,6% e de 16% em relação aos grupos CT e WT, respectivamente. O que também se repercutiu nos valores de PAD e PAM, tendo um aumento de 13% em ambos, comparando-se ao grupo WT. Verificou-se também um acréscimo de 6,4% na FC em relação ao CT.

Tabela 1
Pressão Arterial e Frequência Cardíaca em camundongos fêmeas

	WT	CT	HC
Peso (g)	21 ± 0,4	19 ± 0,3	17 ± 0,6
PAS (mmHg)	122 ± 3,0	134 ± 4,3*	145 ± 4,5**
PAD (mmHg)	101 ± 2,9	109 ± 4,1	116 ± 3,1***
PAM (mmHg)	110 ± 2,3	116 ± 3,9	126 ± 2,9****
FC (bpm)	557 ± 16,8	556 ± 10,6	594 ± 10,5*****

Pressão Arterial e Frequência Cardíaca em camundongos fêmeas Wild Type (WT), LDLr-/- (CT) em dieta comercial e LDLr-/- sob dieta rica em colesterol e lipídeos (HC). PAS = Pressão arterial sistólica; PAD = Pressão arterial diastólica; PAM = Pressão arterial média; FC = Frequência cardíaca. Média ± EMP (n = 8-13). Anova seguido de teste de Tuckey – Kramer. * p < 0,05 comparado à WT; ** p < 0,05 comparado à CT e p < 0,0001 comparado à WT; *** p < 0,003 comparado à WT; **** p < 0,001 comparado à WT; ***** p < 0,02 comparado à CT.

Em contraste ao observado nas fêmeas, como pode ser visto na **tabela 2**, os machos do grupo CT se apresentaram hipertensos em relação ao grupo WT, tendo uma PAS 9%, PAD 13% e PAM 11,6% maiores, embora tenham apresentado uma FC 10% inferior. Os camundongos sob dieta rica em colesterol e lipídeos (HC) apresentaram PAS 10%, PAD e PAM 9% maiores e FC 11% menor em relação ao grupo WT. Os grupos CT e HC não apresentaram diferenças significativas de PA e FC entre si.

Tabela 2
Pressão Arterial e Frequência Cardíaca em camundongos machos

	WT	CT	HC
Peso (g)	27,9 ± 0,4	25,4 ± 0,8	23,1 ± 0,5
PAS (mmHg)	127,6 ± 2,32	140,6 ± 2,72*	141,9 ± 1,96**
PAD (mmHg)	108,3 ± 2,39	124,3 ± 2,43**	118,7 ± 1,58***
PAM (mmHg)	115 ± 2,34	130 ± 2,04**	126 ± 1,68****
FC (bpm)	579 ± 9,9	520 ± 8,1**	516 ± 9,1**

Pressão Arterial e Frequência Cardíaca em camundongos machos Wild Type (WT), LDLr-/- (CT) em dieta comercial e LDLr-/- sob dieta rica em colesterol e lipídeos (HC). PAS = Pressão arterial sistólica; PAD = Pressão arterial diastólica; PAM = Pressão arterial média; FC = Frequência cardíaca. Média ± EMP (n = 8-49). Anova seguido de teste de Tuckey – Kramer. * p < 0,001 comparado à WT; ** p < 0,0001 comparado à WT; *** p < 0,0005 comparado à WT; **** p < 0,0002 comparado à WT.

A **tabela 3** compara a PA e a FC de camundongos machos e fêmeas. Não foram observadas diferenças entre os gêneros no grupo WT. No grupo CT as fêmeas apresentaram diminuição de 12% na PAD e 11% na PAM em relação aos machos, e a FC foi 6,5% maior. No grupo HC, a FC das fêmeas foi 13% maior que a dos machos, entretanto não são observadas diferenças significativas na PA.

Tabela 3
Pressão Arterial e Frequência Cardíaca – Fêmeas x Machos

	WT		CT		HC	
	F	M	F	M	F	M
PAS (mmHg)	122 ± 3	127,6 ± 2,32	134 ± 4,3	140,6 ± 2,72	145 ± 4,5	141,9 ± 1,96
PAD(mmHG)	101 ± 2,9	108,3 ± 2,39	109 ± 4,1*	124,3 ± 2,43	116 ± 3,1	118,7 ± 1,58
PAM(mmHg)	110 ± 2,3	115 ± 2,34	116 ± 3,9*	130 ± 2,04	126 ± 2,9	126 ± 1,68
FC (bpm)	557 ± 16,8	579 ± 9,9	556 ± 10,6*	520 ± 8,1	594 ± 10,5*	516 ± 9,1

Comparação da pressão arterial e frequência cardíaca entre camundongos fêmeas (F) e machos (M) Wild Type (WT), LDLr^{-/-} (CT) em dieta comercial e LDLr^{-/-} sob dieta rica em colesterol e lipídeos (HC). PAS = Pressão arterial sistólica; PAD = Pressão arterial diastólica; PAM = Pressão arterial média; FC = Frequência cardíaca. Média ± EMP. Teste t de Student não pareado. * p < 0,05 em relação aos machos.

5.2 REATIVIDADE VASCULAR “IN VITRO”

A resposta vascular à 1^a e 2^a aplicações de Phe, que antecederam a administração de Ach e de SNP, respectivamente, nos anéis de aorta de camundongos fêmeas e machos está expressa nas tabelas e gráficos a seguir, juntamente com a resposta de relaxamento vascular ao SNP.

A **tabela 4** apresenta a resposta dos anéis de aortas à 1^a e 2^a aplicação de Phe e à de SNP, em camundongos fêmeas. Os grupos WT e CT responderam às drogas similarmente, diferindo de forma significativa apenas na resposta máxima à 1^a aplicação de Phe (48% maior no grupo CT). O grupo HC apresentou uma menor responsividade à contração mediada por Phe, em relação ao CT, tendo uma resposta máxima 57% e 63% menor na 1^a e 2^a aplicações, respectivamente. Ao ser comparado com o WT, o grupo HC apresentou um aumento na sensibilidade, apresentando um EC50 45,5% inferior, na 1^a aplicação de Phe. Isso também foi verificado na resposta ao SNP, cujo EC50 do Grupo HC foi 73% menor em relação ao WT.

Tabela 4
Reatividade Vascular em camundongos fêmeas

	WT	CT	HC
Phe*			
RM (g.f)	0,051 ± 0,006	0,097 ± 0,014 a	0,042 ± 0,010 b
Pd2	7,070 ± 0,059	7,132 ± 0,23	7,397 ± 0,140 c
EC50	8,906 ± 1,17.10 ⁻⁸	10,754 ± 3,55.10 ⁻⁸	4,856 ± 1,37.10 ⁻⁸ d
N	6	5	5
Phe**			
RM (g.f)	0,166 ± 0,033	0,271 ± 0,049	0,100 ± 0,032 e
N	5	6	5
SNP			
RM (%)	100	100	100
Pd2	7,423 ± 0,11	7,892 ± 0,19	7,988 ± 0,11 f
EC50	4,285 ± 1,09.10 ⁻⁸	2,132 ± 1,02.10 ⁻⁸	1,157 ± 0,26.10 ⁻⁸ g
N	5	6	5

Valores médios ± EMP da resposta máxima (RM), do logaritmo negativo da concentração que induz 50% da resposta máxima (Pd2) e da concentração que induz 50% da resposta máxima (EC50), à 1ª aplicação de Fenilefrina que antecede a aplicação de Acetilcolina (Phe*), à 2ª aplicação de Fenilefrina, que antecede a aplicação de Nitroprussiato de Sódio (Phe**) e à aplicação de Nitroprussiato de Sódio (SNP), em camundongos fêmeas Wild Type (WT), LDLr^{-/-} (CT) em dieta comercial e LDLr^{-/-} sob dieta rica em colesterol e lipídeos (HC). Anova seguido de teste de Tuckey – Kramer. a p < 0,01 WTxCT; b p < 0,01 CTxHC; c p < 0,05 WTxHC; d p < 0,05 WTxHC; e p < 0,03 CTxHC; f p < 0,006 WTxHC; g p < 0,03 WTxHC.

Nas figuras 1 e 2 observa-se a tensão gerada pela administração de Phe e o relaxamento via SNP, respectivamente, em ambos os grupos. O início da resposta à Phe foi na concentração de 10⁻¹⁰M no Grupo CT e na de 10⁻⁸M nos grupos WT e HC; contudo, em ambos os grupos a resposta máxima foi atingida na concentração de 10⁻⁵M. Em relação à resposta ao SNP, os grupos iniciaram o relaxamento na concentração de 10⁻⁹M nos grupos WT e CT e na de 10⁻¹⁰M no grupo HC. Contudo, ambos atingiram 100% de relaxamento ao SNP na concentração de 10⁻⁵M, mostrando ausência de alteração na responsividade ao SNP das fêmeas em relação aos diferentes grupos experimentais.

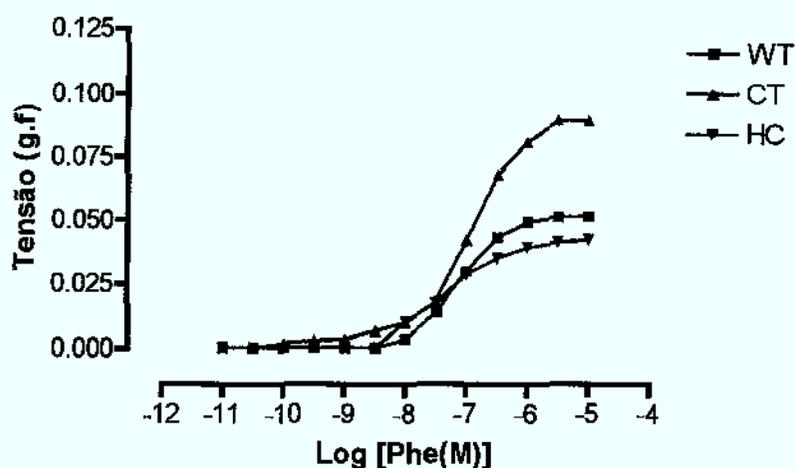


Figura 1. Reatividade vascular à Fenilefrina – Fêmeas. Curvas concentração - efeito induzidas por doses crescentes de Fenilefrina (Phe) em anéis de aortas de camundongos fêmeas Wild Type (WT), LDLr^{-/-} (CT) sob dieta comercial e LDLr^{-/-} com dieta rica em colesterol e lipídeos (HC).

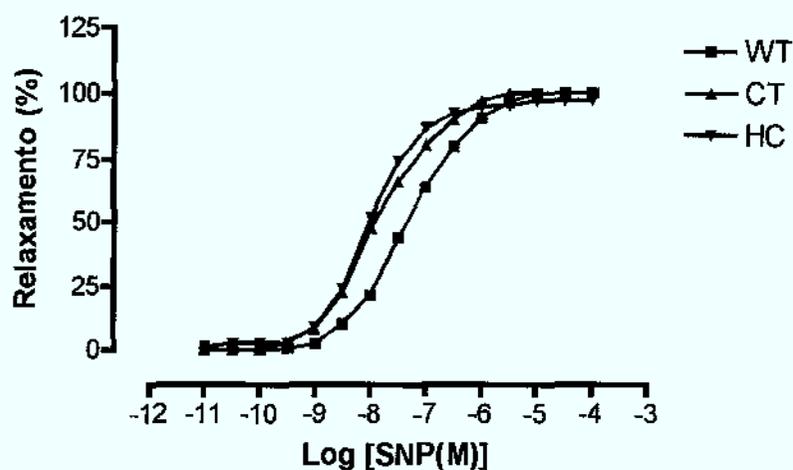


Figura 2. Reatividade vascular ao Nitroprussiato de Sódio – Fêmeas. Porcentagem de relaxamento induzida por doses crescentes de Nitroprussiato de Sódio (SNP) em anéis de aortas pré-contraídos com Fenilefrina, em camundongos fêmeas Wild Type (WT), LDLr^{-/-} (CT) sob dieta comercial e LDLr^{-/-} com dieta rica em colesterol e lipídeos (HC).

A **tabela 5** apresenta a resposta dos anéis de aortas à administração de Phe e de SNP, em camundongos machos. Os grupos WT, CT e HC responderam às drogas de forma similar, não apresentando diferenças significativas na sensibilidade e na responsividade ao SNP sob pré-contração com Phe.

Tabela 5
Reatividade Vascular em camundongos machos

	WT	CT	HC
Phe			
RM (g.f)	0,22 ± 0,03	0,19 ± 0,03	0,17 ± 0,03
Pd2	7,32 ± 0,15	7,36 ± 0,15	7,10 ± 0,19
EC50	6,16 ± 1,65.10 ⁻⁸	6,06 ± 2,42.10 ⁻⁸	10,49 ± 4,24.10 ⁻⁸
N	6	6	4
SNP			
RM (%)	100	100	100
Pd2	8,02 ± 0,14	8,15 ± 0,09	7,95 ± 0,12
EC50	1,12 ± 0,34.10 ⁻⁸	0,83 ± 0,17.10 ⁻⁸	1,30 ± 0,34.10 ⁻⁸
N	4	9	5

Valores médios ± EMP da resposta máxima (RM), do logaritmo negativo da concentração que induz 50% da resposta máxima (Pd2) e da concentração que induz 50% da resposta máxima (EC50), em resposta à aplicação de Fenilefrina e de Nitroprussiato de Sódio (SNP), em camundongos machos Wild Type (WT), LDLr^{-/-} (CT) em dieta comercial e LDLr^{-/-} sob dieta rica em colesterol e lipídeos (HC). Anova seguido de teste de Tuckey – Kramer.

Nas **figuras 3 e 4** são apresentados a tensão gerada pela administração de Phe e a resposta ao relaxamento via SNP, respectivamente, em ambos os grupos de camundongos machos. O início da resposta à Phe foi na concentração de 10⁻⁸M nos grupos CT e WT e na de 10⁻⁹M no grupo HC; contudo, em ambos os grupos a resposta máxima foi atingida na concentração de 10⁻⁵M. Com a administração de SNP, os grupos CT e WT iniciaram o relaxamento na concentração de 10⁻¹⁰M e o grupo HC na de 10⁻⁸M. Além disso, ambos atingiram 100% de relaxamento ao SNP na concentração de 10⁻⁶M.

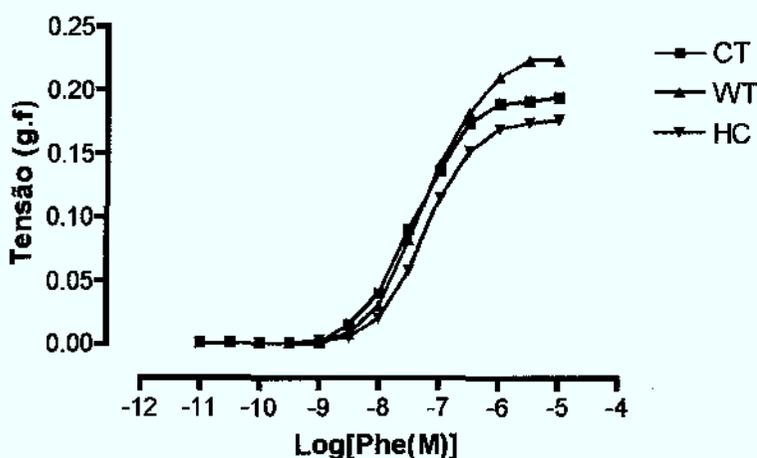


Figura 3. Reatividade vascular à Fenilefrina – Machos. Curvas concentração - resposta induzidas por doses crescentes de Fenilefrina (Phe) em anéis de aortas de camundongos machos Wild Type (WT), LDLr^{-/-} (CT) sob dieta comercial e LDLr^{-/-} com dieta rica em colesterol e lipídeos (HC).

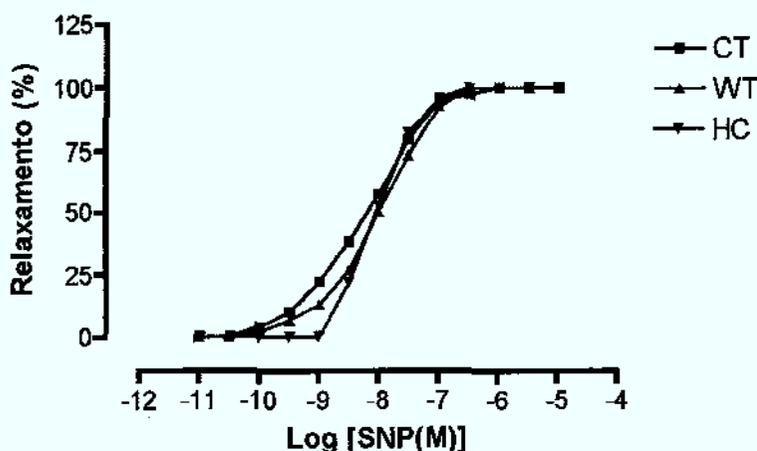


Figura 4. Reatividade vascular ao Nitroprussiato de Sódio – Machos. Porcentagem de relaxamento induzida por doses crescentes de Nitroprussiato de Sódio (SNP) em anéis de aortas pré-contraídos com Fenilefrina, em camundongos machos Wild Type (WT), LDLr^{-/-} (CT) sob dieta comercial e LDLr^{-/-} com dieta rica em colesterol e lipídeos (HC).

As tabelas 6 e 7 apresentam a comparação entre os gêneros da reatividade vascular em resposta à Phe e ao SNP, respectivamente. As fêmeas apresentaram diminuição na responsividade à Phe, obtendo a resposta máxima 77%, 49% e 75% menor que os machos dos grupos WT, CT e HC, respectivamente. Contudo, não apresentaram diferenças de sensibilidade em resposta à Phe, o que pode ser observado pela semelhança no EC50 entre os gêneros.

A sensibilidade ao SNP nas fêmeas foi reduzida em relação aos machos no grupo WT, sendo que apresentaram aumento de 74% no EC50; contudo, nos grupos CT e HC essa diferença de sensibilidade não foi observada. A resposta máxima foi de 100% em ambos os grupos e gêneros, não tendo então diferenças de responsividade ao SNP.

Tabela 6
Reatividade Vascular à Fenilefrina – Fêmeas x Machos

		Phe		
		Pd2	EC50	RM (g.f)
WT	F	7,07 ± 0,059	8,906 ± 1,17.10 ⁻⁸	0,051 ± 0,006
	M	7,32 ± 0,15	6,16 ± 1,65.10 ⁻⁸	0,22 ± 0,03
	p	0,1532	0,2054	0,0002*
CT	F	7,132 ± 0,23	10,754 ± 3,55.10 ⁻⁸	0,0972 ± 0,014
	M	7,36 ± 0,15	6,06 ± 2,42.10 ⁻⁸	0,19 ± 0,03
	p	0,4082	0,2903	0,018*
HC	F	7,397 ± 0,14	4,856 ± 1,37.10 ⁻⁸	0,042 ± 0,010
	M	7,10 ± 0,19	10,49 ± 4,24.10 ⁻⁸	0,17 ± 0,03
	p	0,2533	0,2057	0,0027*

Comparação da resposta máxima (RM), do logaritmo negativo da concentração que induz 50% da resposta máxima (Pd2) e da concentração que induz 50% da resposta máxima (EC50), em resposta à aplicação de Fenilefrina (Phe) entre camundongos machos (M) e fêmeas (F) Wild Type (WT), LDLr^{-/-} (CT) em dieta comercial e LDLr^{-/-} sob dieta rica em colesterol e lipídeos (HC), com os respectivos valores de p. Médias ± EMP. Teste t de Student não pareado. * valores de p considerados significativos.

Tabela 7
Reatividade Vascular ao Nitroprussiato de Sódio – Fêmeas x Machos

		SNP		
		Pd2	EC50	RM (%)
WT	F	7,423 ± 0,11	4,285 ± 1,09.10 ⁻⁸	100
	M	8,02 ± 0,14	1,12 ± 0,34.10 ⁻⁸	100
	p	0,0114*	0,0415*	x
CT	F	7,892 ± 0,19	2,132 ± 1,02.10 ⁻⁸	100
	M	8,15 ± 0,09	0,83 ± 0,17.10 ⁻⁸	100
	p	0,1943	0,1469	x
HC	F	7,988 ± 0,11	1,157 ± 0,26.10 ⁻⁸	100
	M	7,95 ± 0,12	1,30 ± 0,34.10 ⁻⁸	100
	p	0,8164	0,7408	x

Comparação da resposta máxima (RM), do logaritmo negativo da concentração que induz 50% da resposta máxima (Pd2) e da concentração que induz 50% da resposta máxima (EC50), em resposta à aplicação de Nitroprussiato de Sódio (SNP) entre camundongos machos (M) e fêmeas (F) Wild Type (WT), LDLr^{-/-} (CT) em dieta comercial e LDLr^{-/-} sob dieta rica em colesterol e lipídeos (HC), com os respectivos valores de p. Médias ± EMP. Teste t de Student não pareado. * valores de p considerados significativos.

5.3 REATIVIDADE À ACETILCOLINA

Foram encontradas dificuldades na obtenção de uma vasoconstricção de maior porte na curva gerada pela administração de Phe e posterior vasodilatação via Ach. Inúmeras tentativas foram feitas para solucionar esse problema. Para testarmos a hipótese de que o endotélio estava lesionado e isto ter impedido o relaxamento do vaso, aplicamos em alguns camundongos de ambos os grupos a N - Nitro - L - Arginina Metil Éster (L-NAME; 0,3mM), após administração de Ach, com a aorta pré - contraída com Phe. O L-NAME, como pode ser observado na **tabela 8** e na **figura 5** expostos abaixo, gerou uma responsividade contrátil 56%, 63% e 56% superior em relação à induzida pela aplicação de Phe, nos camundongos WT, CT e HC, respectivamente. Após a aplicação de L-NAME, verificou-se a resposta à adição de L-Arginina (9mM), substrato da NOS endotelial, objetivando reverter a contração gerada, o que não foi observado.

Tabela 8

Reatividade Vascular ao N - Nitro L - Arginina Metil Éster e Fenilefrina

	WT	CT	HC
L-NAME			
RM (g.f)	0,115 ± 0,03	0,260 ± 0,07	0,095 ± 0,01
N	3	2	5
Phe *			
RM (g.f)	0,051 ± 0,006	0,097 ± 0,014	0,042 ± 0,010
N	6	5	5

Valores médios ± EMP da resposta máxima (RM, g.f) à aplicação de N-Nitro L-Arginina Metil Éster (L-NAME) e de Fenilefrina (Phe*), em camundongos fêmeas Wild Type (WT), LDLr/- (CT) em dieta comercial e LDLr/- sob dieta rica em colesterol e lipídeos (HC).

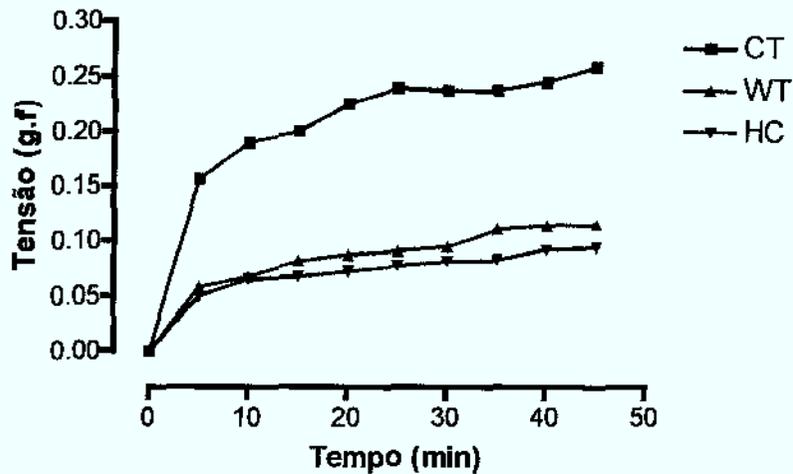


Figura 5. Reatividade vascular ao N-Nitro L – Arginina Metil Éster. Média da tensão em função do tempo de anéis de aortas, gerada pela aplicação de N-Nitro - L-Arginina Metil Éster (L-NAME) em camundongos fêmeas Wild Type (WT), LDLr^{-/-} (CT) sob dieta comercial e LDLr^{-/-} com dieta rica em colesterol e lipídeos (HC).

Uma outra hipótese para a falta de resposta dos anéis de aortas à Ach em fêmeas, foi a baixa tensão desenvolvida em resposta à estimulação com Phe. Foram realizadas então 5 despolarizações consecutivas com 60mM de KCl (Cloreto de Potássio), em anéis de aorta de camundongos controles fêmeas e machos, previamente à aplicação de Phe, buscando um maior efeito contrátil por parte deste. As tensões desenvolvidas pelos anéis de aorta em resposta ao KCl, podem ser observadas nas **figuras 6 e 7** e nas **tabelas 9 e 10**, expostos a seguir.

As **figuras 6 e 7** e a **tabela 9** apresentam valores médios de tensão máxima desenvolvida pelos anéis de aortas em resposta a cinco aplicações consecutivas de 60 mM de KCl, em camundongos controles fêmeas e machos, respectivamente. Pode-se observar que as tensões foram crescentes em ambos os gêneros, à medida que foram sendo aplicadas novas doses de KCl. Através da **tabela 10**, observa-se que o KCl promoveu um aumento na responsividade, produzindo contrações 73% e 58,5% maiores em relação à 1ª aplicação de Phe, nas fêmeas e nos machos, respectivamente. Contudo, essa diferença desapareceu na 2ª aplicação de Phe, representando uma ampliação no efeito contrátil do mesmo após a administração de KCl. A contração com KCl nas fêmeas foi 24,5% menor que nos machos, ou seja, as fêmeas apresentam uma menor responsividade ao KCl. A resposta contrátil à Phe sem a prévia administração de KCl foi significativamente menor em fêmeas do que em machos (50% menor), porém essa mesma diferença não foi observada na contração mediada por Phe após a sensibilização com KCl.

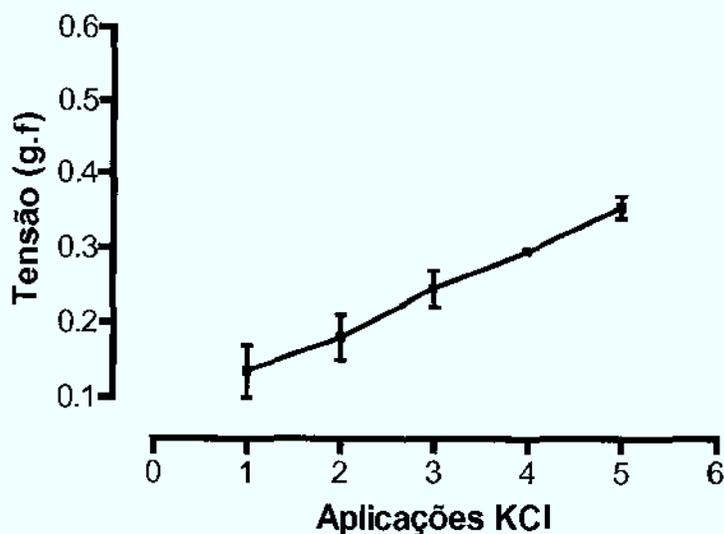


Figura 6. Reatividade vascular ao Cloreto de Potássio – Fêmeas. Valores médios \pm EMP da tensão máxima desenvolvida pelos anéis de aortas em resposta a aplicações consecutivas de 60 mM de Cloreto de Potássio (KCl) em camundongos fêmeas LDLr^{-/-} controles, sob dieta comercial (n = 2).

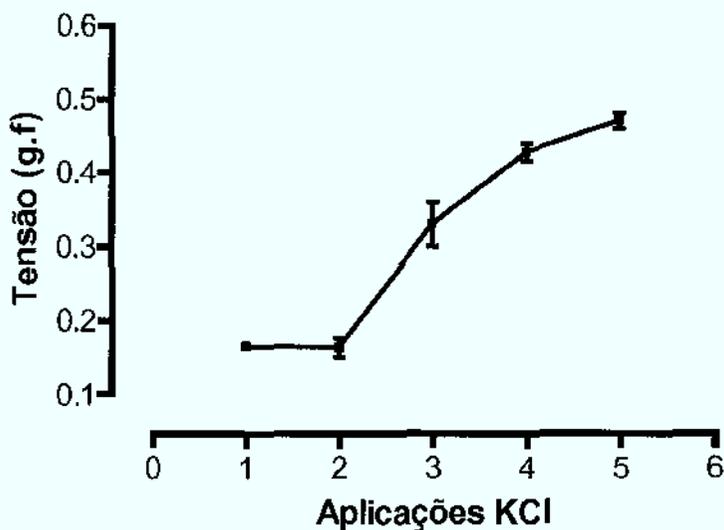


Figura 7. Reatividade vascular ao Cloreto de Potássio – Machos. Valores médios \pm EMP da tensão máxima desenvolvida pelos anéis de aortas em resposta a aplicações consecutivas de 60 mM de Cloreto de Potássio (KCl) em camundongos machos LDLr^{-/-} controles, sob dieta comercial (n = 2).

Tabela 9
Reatividade Vascular ao Cloreto de Potássio

	KCl				
	1ª aplicação	2ª aplicação	3ª aplicação	4ª aplicação	5ª aplicação
Fêmeas	0,135 ± 0,035	0,180 ± 0,030	0,245 ± 0,025	0,295 ± 0,005	0,355 ± 0,015
Machos	0,165 ± 0,005	0,163 ± 0,013	0,330 ± 0,030	0,428 ± 0,012	0,470 ± 0,009

Valores médios de tensão máxima ± EMP (g.f), desenvolvida por anéis de aortas de camundongos fêmeas e machos controles (n = 2), em resposta a cinco aplicações consecutivas de 60mM de Cloreto de Potássio (KCl).

Tabela 10
Reatividade Vascular ao Cloreto de Potássio e à Fenilefrina

	Machos	Fêmeas
KCl (g.f)	0,470 ± 0,01a	0,355 ± 0,01b
Phe* (g.f)	0,195 ± 0,03	0,097 ± 0,01c
Phe** (g.f)	0,218 ± 0,09	0,185 ± 0,13

Valores médios de tensão máxima ± EMP desenvolvida por anéis de aortas de camundongos machos e fêmeas controles (n = 2-6), em resposta à 5ª aplicação de 60mM de Cloreto de Potássio (KCl) e às aplicações de Fenilefrina, sem a administração prévia (Phe*) ou pré administrada (Phe**) com KCl. Teste t de Student não pareado, para comparações dos grupos dentro do mesmo gênero e Anova seguido de teste de Tuckey-Kramer, para comparações entre os gêneros. a p = 0,0019 em relação à Phe* (Macho x Macho); b p = 0,0001 em relação à Phe* (Fêmea x Fêmea) e p = 0,0237 em relação aos machos; c p = 0,018 em relação aos machos.

6. DISCUSSÃO

6.1 FREQUÊNCIA CARDÍACA E PRESSÃO ARTERIAL

Nas fêmeas a hipertensão e o aumento da FC, apresentados pelos camundongos do grupo HC, parecem estar relacionados à dieta rica em colesterol e lipídeos, e não à manipulação genética dos camundongos *knockout* para o receptor de LDL, uma vez que as fêmeas CT e WT não apresentaram diferenças significativas de PAM e de FC. Fato este que não foi observado nos machos, cujos grupos CT e HC se mostraram hipertensos quando comparados ao WT; estando esta hipertensão provavelmente relacionada à manipulação genética dos camundongos e dependente do gênero. Apoiando tal observação, em um estudo realizado por Trieu e Uckun (1998), foi verificado que camundongos machos *knockout* para o receptor de LDL apresentam uma hipertensão, diferindo do observado em fêmeas. Segundo os mesmos autores, a hipertensão verificada apenas nos camundongos machos *knockout* para o receptor de LDL, pode ser explicada diante da maior suscetibilidade dos machos à aterosclerose, pois apresentam valores aumentados de P-selectina, um marcador para agregação plaquetária. (LIP et al, 1995, 1997).

Outra diferença observada é a de que as fêmeas HC tiveram aumento na FC, enquanto que os machos CT e HC apresentaram diminuição da mesma. Hipotetizamos que a bradicardia registrada nos machos tenha sido desenvolvida como uma resposta reflexa em decorrência dos elevados valores de pressão arterial. Já nas fêmeas, o aumento observado, associado à ausência de desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, mostra que o impacto da hipertensão deve representar menor repercussão nos danos aos órgãos – alvos e, ainda, podem representar uma resposta em fase inicial de estresse ou adaptação a condição hipertensiva.

As diferenças entre os gêneros são fatores que modificam a PA e a FC, sendo que os hormônios sexuais e o maior número de receptores podem proteger contra o desenvolvimento da hipertensão em fêmeas (HINOJOSA-LABORDE et al, 2000; MCBRIDE et al, 2005) enquanto que o aumento dos andrógenos em machos pode aumentar a PA dos mesmos (FOGARI et al, 2005; HECKELLHOFF, 2001, 2005; ILIESCU, HECKELHOFF, 2006; SONG et al, 2004).

Os resultados indicam que as fêmeas estudadas apresentaram uma maior proteção vascular que os machos em relação ao desenvolvimento da hipertensão, como já havia sido retratado na literatura (GOTO et al, 2000; KOJDA et al, 2001; VIRDIS et al, 2002). A maioria dos estudos mostra que essa maior proteção se deve à ação benéfica do estrogênio (GOTO et al, 2000; HUANG, KALEY, 2004; KHALIL, 2005; TOSTES et al, 2006; VIRDIS et al, 2002) e à maior quantidade de receptores hormonais presentes em seus vasos (GOTO et al, 2000; COLLINS et al, 1995).

Embora haja essa diferença de gênero no controle da PA (MCBRIDE et al, 2005; QUINKLER et al, 2005), em condições patológicas, como no caso da aterosclerose desenvolvida pelos camundongos LDLr^{-/-} com dieta rica em colesterol e lipídeos, não foram observadas diferenças significativas de PA entre os sexos quando sob aterogênese. Contudo, este trabalho compreendeu apenas quinze dias de indução, e um maior período poderia revelar tal dimorfismo sexual. Tolbert et al (2001), mostraram nos camundongos deficientes para a Óxido Nítrico Sintase induzível que, após a lesão da parede vascular, os efeitos protetores do estrogênio são reduzidos, sugerindo que o mesmo modula a expressão da enzima, além de exercer uma função na formação da camada neointima.

Sabe-se que o endotélio íntegro é responsável pelo controle do tônus vasomotor (AMODEO, HEIMANN, 2003; BRANDES et al, 2000; GOTO et al, 2000; VIRDIS et al, 2002) e, conseqüentemente, da PA. A DE pode alterar a vasomotricidade local, modificando o tônus vascular e gerando eventos ateroscleróticos e aterotrombóticos, que são acompanhados em muitos casos por hipertensão arterial (AMODEO, HEIMANN, 2003; BAHIA et al, 2004; GOTO et al, 2000; JONES et al, 2004; TADDEI et al, 1993; VIRDIS et al, 2002; VOETSCH et al, 2004).

6.2 REATIVIDADE VASCULAR "IN VITRO"

A avaliação da função endotelial é importante para o entendimento da etiopatogenia da aterosclerose (BAHIA et al, 2004). A Ach age sobre as células endoteliais via receptores muscarínicos, promovendo uma resposta vasodilatadora dependente da liberação

endotelial de NO; enquanto que a vasodilatação mediada pelo doador de NO, SNP, é independente do endotélio, agindo diretamente sobre as células musculares lisas (BAHIA et al, 2004; WANSTALL et al, 2001; WOLFLE, DE WIT, 2005.).

Em relação à resposta contrátil nas fêmeas LDL_r^{-/-}, supõe-se que a dieta rica em colesterol e lipídeos tenha levado à diminuição na responsividade contrátil, uma vez que teve uma resposta máxima menor que o grupo CT; e tenha levado também a uma hipersensibilidade do vaso à Phe e ao SNP, em relação ao WT, apresentando um EC50 inferior, indicando assim a necessidade de uma menor concentração de Phe e SNP para atingir um relaxamento de 50% do máximo. Com relação à resposta de relaxamento via SNP, o grupo CT não apresentou diferenças em relação ao WT e ao HC.

A dieta rica em colesterol e lipídeos eleva potencialmente o LDL plasmático circulante (STAPRANS et al, 2005), como foi observado em pesquisas realizadas em nosso laboratório (WANSCHERL, 2006), o que provocou disfunções endoteliais, associadas também ao desenvolvimento da aterosclerose (VIRDIS et al, 2002). A integridade do endotélio é de grande importância na regulação da motricidade arterial, devido à liberação de substâncias dilatadoras e constritoras pela parede do vaso (ARNAL et al, 1999; DIMMELER, ZEIHNER, 2004; GOTO et al, 2000). A disfunção dessa camada de células endoteliais, como ocorre, por exemplo, na aterogênese, prejudica a liberação desses fatores, alterando a motricidade do vaso, como foi observado nos camundongos *knockout* com dieta rica em colesterol e lipídeos.

As fêmeas *knockout* com dieta comercial apresentaram respostas aos vasoconstritores e vasodilatadores semelhantes ao camundongo selvagem, apoiando nossa hipótese de que a disfunção endotelial e conseqüente alteração na motricidade vascular das fêmeas não é evidenciada na condição *knockout*. Contudo, verificada somente após a sensibilização com a administração da dieta rica em colesterol e lipídeos.

Nos machos, não foram observadas diferenças na resposta vascular à Phe e ao SNP entre os grupos experimentais. A análise entre os sexos, mostrou a existência de diferenças na resposta máxima (responsividade) à Phe, sendo esta menor nas fêmeas; e na concentração de drogas necessária para promover 50% de relaxamento via SNP, sendo maior nas fêmeas do grupo WT. Além disso, as fêmeas apresentaram diferenças entre os grupos no relaxamento via SNP, o que não ocorreu com os machos, cujas aortas apresentaram comportamentos semelhantes. Esses dados indicam a participação dos estrógenos no controle da motricidade arterial.

6.3 REATIVIDADE À ACETILCOLINA

Um endotélio vascular saudável é necessário para que haja uma resposta vasodilatadora à Ach, mediada pela liberação de NO (FURCHGOTT, ZAWADASKI, 1980; VOETSCH et al, 2004). O L-NAME, em ambos os grupos, gerou uma contração superior à induzida pela aplicação de Phe. Desta forma, descartou-se a possibilidade de o endotélio estar lesionado e isto ter impedido a atuação da Ach, uma vez que o L-NAME inibe as Óxido Nítrico Sintases (NOS) constitutivas, bloqueando a liberação basal de NO pelo endotélio (GÖDECKE et al, 1998; KAUSSER et al, 2000; NASCIMENTO et al, 2003; ORSHALL, KHALIL, 2004; ZHOU et al, 2005), resultando então na contração observada. Recentemente, Zhou et al (2005), verificaram que o L-NAME, na presença de Ach, aumentou a vasoconstricção induzida por Phe em vasos de camundongos normais com endotélio intacto, porém não em vasos sem endotélio. O efeito do L-NAME, provavelmente, independe da atividade da NOS, uma vez que não é revertido pelo excesso de L – arginina, substrato para a produção de NO (AMODEO and HEIMANN, 2003; NASCIMENTO et al, 2003), podendo representar, portanto, um verdadeiro mecanismo contrátil, através da estimulação da produção de vasoconstritores como, por exemplo, as espécies reativas de oxigênio.

A despolarização dos vasos com KCl estimula a entrada de Cálcio do espaço extracelular (ORSHALL, KHALIL, 2004; TOSTES et al, 2003), promovendo a contração do vaso. As respostas à aplicação de Phe, sem a prévia administração de KCl, ou mesmo as respostas isoladas ao KCl, foram significativamente menores em fêmeas que em machos, contudo essa diferença entre os gêneros não foi observada na contração via Phe, após a aplicação prévia de KCl. Além disso, as diferenças de tensão geradas entre a 1ª aplicação de Phe e a de KCl não foram mantidas entre a 2ª aplicação de Phe e a de KCl, em ambos os sexos. Portanto, verificou-se que o KCl sensibilizou os anéis de aortas, aumentando a liberação de Cálcio, ampliando assim a responsividade à Phe dos vasos em ambos os gêneros, contudo em maior proporção nas fêmeas. Outro ponto observado foi que a contração provocada por KCl nas fêmeas foi significativamente menor que nos machos, como já havia sido retratado por Orshall e Khalil (2004), que sugerem que o estrogênio inibe a alta contração induzida por KCl e pelo influxo de Ca^{2+} . Esses dados confirmam novamente que as fêmeas têm maior tônus relaxante, uma vez que a aplicação de Phe

gerou um efeito comparável ao dos machos apenas após sua sensibilização com KCl. Apesar da maior resposta contrátil à Phe observada, não foram descritos os resultados obtidos pela aplicação de Ach, devido aos mesmos terem variado muito entre si e ao baixo número de experimentos reprodutíveis, não sendo possível, então, realizar maiores análises a cerca da dilatação em fêmeas via Ach.

7. CONCLUSÕES

1. A hipertensão desenvolvida pelos camundongos fêmeas do grupo HC, parece ter sido relacionada à dieta rica em colesterol e lipídeos, e não à manipulação genética dos camundongos *knockout* para o receptor de LDL; diferentemente dos machos, cuja hipertensão verificada nos grupos CT e HC em relação ao WT relacionou-se provavelmente à condição *knockout*, sendo assim uma variável dependente do gênero. Tais constatações demonstraram que há diferenças de gênero nos mecanismos de controle da pressão arterial.

2. As fêmeas *knockout* com dieta comercial apresentaram respostas aos vasoconstritores e vasodilatadores semelhantes ao camundongo selvagem, apoiando a hipótese de que a disfunção endotelial e conseqüente alteração na motricidade vascular nas fêmeas é produto da dieta rica em colesterol e lipídeos e não da condição *knockout*.

3. Supõe-se que a dieta rica em colesterol e lipídeos tenha promovido disfunção endotelial que foi verificada por meio de alteração na vasomotricidade dos camundongos fêmeas LDLr^{-/-}, os quais apresentaram uma menor responsividade e maior sensibilidade em resposta à Phe, em relação ao CT e ao WT, respectivamente; bem como uma maior sensibilidade ao SNP em relação ao WT. Já, nos machos, foi observado o contrário do que nas fêmeas, a responsividade e a sensibilidade às substâncias utilizadas não foram alteradas com a dieta rica em colesterol e lipídeos, indicando que também há diferenças de gênero no controle da motricidade arterial.

4. A hipertensão arterial desenvolvida pelas fêmeas sob dieta rica em colesterol e lipídeos foi acompanhada por alterações na sensibilidade à Phe e ao SNP, em relação ao WT, e na responsividade à Phe, em relação ao CT. Portanto, os resultados sugerem que os efeitos protetores do estrogênio são reduzidos em condições patológicas, como a disfunção endotelial.

5. As fêmeas apresentaram menor responsividade em resposta à contração via Phe e KCl, uma vez que as tensões máximas obtidas foram significativamente inferiores às dos machos; hipotetizamos que seja por apresentarem vasos mais protegidos em relação ao desenvolvimento da hipertensão e disfunção endotelial, indicando efeitos benéficos do estrogênio. Este pode, portanto, contribuir para os menores riscos cardiovasculares de mulheres na pré-menopausa.

SUGESTÃO PARA PESQUISAS FUTURAS

Como discutido no presente manuscrito, os exercícios físicos regulares constituem-se de importante estratégia de prevenção dos riscos cardiovasculares, sendo que estão associados a uma variedade de efeitos benéficos metabólicos e vasculares, reduzindo a mortalidade e a incidência de eventos cardiovasculares adversos.

Um estudo realizado por Suvorava et al, 2004, apresentou uma análise da vasorreatividade entre camundongos machos Wild Type (C57BL6) sedentários em relação aos praticantes de exercícios. A autora observou que a resposta à Ach foi menor nos sedentários, sugerindo a presença de disfunção endotelial. Já, a resposta contrátil e a vasodilatação independente do endotélio não diferiram entre os grupos. A atividade física e a dieta com baixo teor de colesterol preservam a vasodilatação dependente do endotélio, auxiliando também na redução e controle da pressão arterial (GALETTA et al, 2006; JENSEN-URSTAD et al, 1999; SARKAR et al, 2006).

Baseado no estudo citado e nas reflexões apresentadas neste trabalho fica, portanto, como proposta para pesquisas futuras, verificar se o exercício físico regular realizado concomitantemente com a administração de dieta rica em colesterol e lipídeos previne as alterações de pressão arterial e motricidade vascular observadas nos camundongos fêmeas e machos, analisando desta forma o papel protetor do estrogênio e do exercício na manutenção da função endotelial.

Para tal objetivo, pretendemos submeter os camundongos *knockout*, tanto fêmeas como machos, a prática diária de 15 minutos de natação e, concomitantemente, administrar uma dieta rica em colesterol e lipídeos. O tratamento dos animais terá uma duração de 15 a 30 dias. Posteriormente, serão realizadas as análises através de comparações entre os grupos e entre os gêneros, por meio da avaliação de pressão arterial, frequência cardíaca e vasorreatividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMODEO, C.; HEIMANN, J. C. Endotélio e hipertensão arterial sistêmica: mecanismos de lesão / novo alvo terapêutico? *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. v.13, n.1, p.121-129, jan/fev. 2003.

ARNAL, J. F.; DINH-XUAN, A.T.; PUEYO, M. et al. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci*, v.55, n.8-9, p.1078-1087, jun. 1999.

BAHIA, L.; AGUAR, L.G.K.; VILLELA, N.R. et al. Endotélio e aterosclerose. *Rev Socerj*, v. 17 n. 1, p. 26-32, jan/fev. 2004.

BRANDES, R.P.; SCHMITZ-WINNENTHAL, F.H.; FELETOU, M. et al. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild type and endothelial NO synthase knockout mice. *PNAS*, v.97, n.17, p.9747-9752, ago. 2000.

BRASS, E.P.; WANG, H.; HIATT, W.R. Multiple skeletal muscle mitochondrial DNA deletions in patients with unilateral peripheral arterial disease. *Vasc Med*, v.5, n.4, p.225-230, 2000.

BUSSE, R.; FLEMING, I. Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors. *J Vasc Res*, v.35, n.2, p.73-84, mar/abr. 1998.

CAI, H.; DAVIS, M.E.; DRUMMOND, G.R. et al. Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 21, n.10, p.1571-1576, out. 2001.

CARVALHO, M.H.C.; FORTES, Z.B.; PASSAGLIA, R.C.A.T. et al. Funções normais do endotélio - uma visão geral. In: Da LUZ, P. L.; LAURINDO, F. R. M.; CHAGAS, A. C. P. *Endotélio e doenças Cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 17-32.

CLYNE, C.A.; MEARS, H.; WELLER, R.O. et al. Calf muscle adaptation to peripheral vascular disease. *Cardiovasc Res*, v.19, n.8, p.507-512, ago. 1985.

COLLINS, P.; ROSANO, G.M.; SARREL, P.M. et al. 17β - Estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease. *Circulation*, v.92, n. 1, p.24-30, jul. 1995.

DIMMELER, S.; ZEIHNER, A.M. Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis? *J Mol Med*, v.82, n.10, p.671-677, out. 2004.

DRUMMOND, G.R.; CAI, H.; DAVIS, M.E. et al. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res*, v.86, n.3, p.347-354, fev. 2000.

DUCKLES, S.P.; KRAUSE, D.N.; STIRONE, C. et al. Estrogen and mitochondria: a new paradigm for vascular protection? *Clin Cardiol*, v.28, n.9, p.433-436, set. 2005.

FOGARI, R.; PRETI, P.; ZOPPI, A. et al. Serum testosterone levels and arterial blood pressure in the elderly. *Hypertension*, v.28, n.8, p.625-630, ago. 2005.

FONSECA, F.A.H.; KUYMJIAN, V.; IZAR, C.O.M. Lípidos e Endotélio. In: Da LUZ, P.L.; LAURINDO, F.R.M.; CHAGAS, A.C.P. *Endotélio e doenças Cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu, 2003. p.281-295.

FORTE, P.; KNEALE, B.J.; MILNE, E. et al. Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. *Hypertension*, v.32, n.4, p.730-734, out. 1998.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v.288, n.5789, p.373-376, nov. 1980.

GALETTA, F.; FRANZONI, F.; PLANTINGA, Y. et al. Ambulatory blood pressure monitoring and endothelium – dependent vasodilation in the elderly athletes. *Biomed Pharmacother*, v.60, n.8, p.443-447, set. 2006.

GEBARA, O.C.E.; VIEIRA, N.W.; ALDRIGHI, J.M. Interações entre estrogênios e endotélio. In: Da LUZ, P.L.; LAURINDO, F.R.M.; CHAGAS, A.C.P. *Endotélio e doenças Cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu, 2003. p.281-295.

GEBARA, O.C.E.; WAJNGARTEN, M.; BARRETTO, A.C. et al. Menopausa, terapêutica de reposição hormonal e doença arterial coronária. *Arq Bras Cardiol*, v.64, n.4, p.355-358, abr. 1995.

GEWALTIG, M.T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res*, v.55, n.2, p.250-260, ago. 2002.

GÖDECKE, A.; DECKING, U.K.; DING, Z. et al. Coronary hemodynamics in endothelial NO Synthase knockout mice. *Am Heart Ass*, v.82, n.2, p.186-194, fev. 1998.

GORDON, T.; KANNEL, W.B.; HJORTLAND, M.C. et al. Menopause and coronary heart disease. *Ann Intern Med*, v.89, n.2, p.157-161, ago. 1978.

GOTO, K.; FUGII, K.; ONAKA, U. et al. Renin-Angiotensin system blockade improves endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertension*, v.36, n.4, p.575-580, out. 2000.

HAMBRECHT, R.; ADAMS, V.; ERBS, S. et al. Regular physical activity improved endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, v.107, n.25, p.3152-3158, jul. 2003.

HAMBRECHT, R.; WOLF, A.; GIELEN, S. et al. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*, v.342, n.7, p.454-60, fev. 2000.

HARVEY, P.J.; PICTON, P.E.; SU, W.S. et al. Exercise as an alternative to oral estrogen for amelioration of endothelial dysfunction on postmenopausal women. *Am Heart J*, v.149, n.2, p.291-297, fev. 2005.

HECKELHOFF, J.F. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension*, v.37, n.5, p.1199-1208, mai. 2001.

HECKELHOFF, J.F. Sex steroids, cardiovascular disease, and hypertension: unanswered questions and some speculations. *Hypertension*, v.45, n.2, p.170-174, fev. 2005.

HINOJOSA-LABORDE, C.; LANGE, D.L.; HAYWOOD, J.R. Role of female sex hormones in the development and reserval of Dahl hypertension. *Hypertension*, v.35, n.1, p.484-489, jan. 2000.

HOLVOET, P.; COLLEN, D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB J*, v.8, n.15, p.1279-1284, dez. 1994.

HUANG, A.; KALEY, G. Gender – specific regulation of cardiovascular function: estrogen as key player. *Microcirculation*, v.11, n.1, p.9-38, jan/fev. 2004.

ILIESCU, R.; HECKELHOFF, J.F. Testosterone and vascular reactivity. *Clin Sci (Lond)*, v.111, n.4, p.251-252, out. 2006.

JENSEN-URSTAD, K.; BOUVIER, F.; JENSEN-URSTAD, M. Preserved vascular reactivity in elderly male athletes. *Sc, J Med Sci Sports*, v.9, n.2, p.88-91, abr. 1999.

JL, L.L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med*, v.222, n.3, p.283–292, dez. 1999.

JONES, R.D.; JONES, T.H.; CHANNER, K.S. The influence of testosterone upon vascular reactivity. *Eur J Endocrinol*, v. 151, n.1, p.29-37, jul. 2004.

KAUSSER, K.; DA CUNHA, V.; FITCH, R. et al. Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Heart circ Physiol*, v.278, n.5, p.H1679-H1685, mai. 2000.

KHALIL, R.A. Sex hormones as potencial modulators of vascular function in hypertension. *Hypertension*, v.46, n.2, p.249-254, ago. 2005.

KOJDA, G.; CHENG, Y.C., BURCHFIELD, J. et al. Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene. *Circulation*, v.103, n.23, p.2839–44, jun. 2001.

KOJDA, G.; HARRISON, D.G. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*, v.43, n.3, p.562-571, ago. 1999.

KRIEGER, M.H.; SANTOS, K.F.; SHISHIDO, S.M. et al. Antiatherogenic effects of S – nitroso – N – acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide Biochem*, v.14, n.1, p.1-88, fev.2006.

LABER, U.; KOBER, T.; SCHMITZ, V. et al. Effect of hypercholesterolemia on expression and function of vascular soluble guanylyl cyclase. *Circulation*, v.105, n.7, p.855-860, fev. 2002.

LAUER, N.; HARRISON, D. G.; KOJDA, G. Hydrogen peroxide supports upregulation of eNOS induced by exercise. *Free Rad Biol Méd*, v.33, n.2, p.S367, 2002. Suplemento. Resumo.

LAURINDO, F.R.M.; LIBERMAN, M.; LEITE, P.F. Substâncias vasodilatadoras produzidas pelo endotélio. In: Da LUZ PL, LAURINDO FRM, CHAGAS ACP. *Endotélio e doenças Cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu, 2003. p.33-42.

LAU, Y.T. Receptor-dependent and genomic-independent actions of estrogen in vascular protection. *Chang Gung Med J*, v.25, n.10, p.636-644, out. 2002.

LEON, A.S.; MYERS, M.J.; CONNETT, J. Leisure time physical activity and the 16-year risks of mortality from coronary heart disease and all-causes in the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *Int J Sports Med*, v.3, p.S208-215, jul. 1997. Suplemento.

LESNIAK, W.; KOLASINSKA-KLOCH, W.; KIEC, B. Vascular endothelium – function, disorders and clinical modification probes. *Folia Med Cracov*, v.42, n.1-2, p.5-14, 2001.

LIP, G.Y.; BLANN, A.D.; ZARIFIS, J.; BEEVERS, M.; LIP, P.L.; BEEVERS, D.G. Soluble adhesion molecule P-selectin and endothelial dysfunction in essential hypertension: implications for atherogenesis? A preliminary report. *J. Hypertens*, v.13, p.1674-1678, Dez. 1995.

LIP, G.Y.H.; BLAM, A.D.; JONES, A.F.; LIP, P.L.; BEEVERS, D.G. Relation of endothelium, thrombogenesis, and hemorheology in systemic hypertension to ethnicity and left ventricular. *Am J Cardiol*, v.80, n.12, p.1566-1571, Dez. 1997.

LU, Q.; PALLAS, D.C.; SURKS, H.K. et al. Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U SA*, v.101, n.49, p.17126-17131, dez. 2004.

MANSON, J.E.; GREENLAND, P.; LACROIX, A.Z. et al. Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women. *N Engl J Med*, v.347, n.10, p.716-725, set. 2002.

MCBRIDE, S.M.; FLYNN, F.W.; REN, J. Cardiovascular alteration and treatment of hypertension: do men and women differ? *Endocrine*, v.28, n.2, p.199-207, nov. 2005.

MOMKEN, I.; LECHÊNE, P.; VENTURA-CLAPIER, R. et al. Voluntary physical activity alterations in endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.287, n.2, p.H914–H920, ago. 2004.

MUGGE, A.; RIEDEL, M.; BARTON, M. et al. Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17β -oestradiol in vitro. *Cardiovasc Res*, v.27, n.11, p.939-942, nov. 1993.

NASCIMENTO, C.A.; PATRIARCA, G.; HEIMANN, J.C. Estrutura orgânica do endotélio vascular. In: Da LUZ PL, LAURINDO FRM, CHAGAS ACP. *Endotélio e doenças Cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu, 2003. p.1-16.

NILIUS, B.; DROOGMANS, G. Íon channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiologic Reviews*, v.81, n.4, p.1415-1459, out. 2001.

O'CONNOR, G.T.; BURING, J.E.; YUSUF, S. et al. An overview of randomized trials of rehabilitation with exercise after myocardial infarction. *Circulation*, v.80, n.2, p.234-244, ago. 1989.

ORSHALL, J.M.; KHALIL, R.A. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v.286, n.2, p.R233-R249, fev. 2004.

PATEL, A.R.; KUVIN, J.T.; SLINEY, K.A. et al. Peripheral vascular endothelial function correlates with exercise capacity in women. *Clin Cardio*, v.28, n.9, p.433-436, set. 2005.

POWERS, R.F.; MANI, S.K.; CODINA, J. et al. Dopaminergic and ligand - independent activations os steroid hormone receptors. *Science*, v.254, p.1636-1639, 1991.

QUINKLER, M.; BUJALSKA, I.J.; KAUR, K. et al. Androgen receptor - mediated regulation of the alpha - subunit of the epithelial sodium channel in human kidney. *Hypertension*, v.46, n.4, p.787-798, out. 2005.

SANTOS, K.F.R.; SHISHIDO, S.M.; LAURINDO, F.R.M. et al. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide Biochem*, v.14, n.1, p.1-88, fev.2006.

- SANTOS, L. *Efeito antiinflamatório da S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) na aterogênese em camundongos*. 2005. 62f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- SARKAR, K.; SINHA, A.K.; MEHTA, J.L. The role of statins in endothelial dysfunction in hypertension. *Curr Opin Cardiol*, v.21, n.4, p.316-321, jul. 2006.
- SONG, D.; ARIKAWA, E.; GALIPEAU, D. et al. Androgens are necessary for the development of fructose-induced hypertension. *Hypertension*, v.43, n.3, p.667-672, mar. 2004.
- STAPRANS, I.; PAN, X.M.; RAPP, J.H. et al. The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res*, v.49, n.11, p.1075-1082, nov. 2005.
- SUVORAVA, T.; LAUER, N.; KOJDA, G. Physical Inactivity Causes Endothelial Dysfunction in Healthy Young Mice. *J Am Coll Cardiol*, v.44, n.6, p.1320-1327, set. 2004.
- TADDEI, S.; VIRDIS, A.; MATTEI, P. et al. Vasodilation to acetyl - 4 cholinein primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension*, v.21, n.6, p.929-933, jun. 1993.
- TOLBERT, T.; THOMPSON, J.A.; BOUCHARD, P. et al. Estrogen - induced vasoprotection is independent of inducible nitric oxide synthase expression: evidence from the mouse carotid artery ligation model. *Circulation*, v.104, n.22, p.2740-2745, nov. 2001.
- TOSTES, R.C.; NIGRO, D.; FORTES, Z.B. et al. Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res*, v.36, n.9, p.1143-1158, set. 2003.
- TRIEU, V.N.; UCKUN, F.M. Male-associated hypertension in LDL-R deficient mice. *Biochem, Bioph Research Commun*, v.247, n.2, p.277-279, Jun. 1998.
- UEMATSU, M.; OHARA, Y.; NAVAS, J.P. et al. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol Cell Physiol*, v.269, n.6, p.C1371-1378, dez. 1995.
- VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; SUDANO, I. et al. Endothelial function in hypertension: role of gender. *J Hypertension*, v.20, n.2, p.S11-16, mai. 2002. Suplemento.

VOETSCH, B.; JIN, R.C.; LOSCALZO, J. Nitric oxide insufficiency and atherothrombosis. *Histochem Cell Biol*, v.122, n.4, p.353-367, out. 2004.

YUN, A.J.; DOUX, J.D.; BAZAR, K.A. et al. Adventitial dysfunction: an evolutionary model for understanding atherosclerosis. *Med Hypotheses*, v.65, n.5, p.962-965. 2005.

WAKATSUKI, A.; IKENOUE, N.; SHINOHARA, K. et al. Small low-density lipoprotein particles and endothelium - dependent vasodilation in postmenopausal women. *Atherosclerosis*, v.177, n.2, p.329-336, dez. 2004.

WANSCHER, A.C.B.A. *Aterogênese em camundongos fêmeas LDLr^{-/-}: efeito da S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC)*. 2006. 59f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

WANSTALL, J.C.; JEFFERY, T.K.; GAMBINO, A. et al. Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion. *Br J Pharmacol*, v.134, n.3, p.463-472, out. 2001.

WELLMAN, G.C.; BONEV, A.D.; NELSON, M.T. et al. Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxid, and Ca²⁺ - dependent K⁺ channels. *Circ Res*, v.79, n.5, p.1024-1030, nov. 1996.

WOLFLE, S.E.; DE WIT, C. Intact endothelium – dependent dilation and conducted responses in resistance vessels of hypercholesterolemic mice in vivo. *J Vase Res*, v.42, n.6, p.475-482, nov/dez. 2005.

WONG, S.; WONG, J. Is physical activity as effective in reducing risk of cardiovascular disease as estrogen replacement therapy in postmenopausal women? *Int J Nurs Stud*, v.36, n.5, p.405-414, out. 1999.

ZHOU, Y.; VARADHARAJ, S.; ZHÃO, X. et al. Acetylcholine causes endothelium – dependent contraction of mouse arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.289, n.3, p.H1027-1032, set. 2005.