

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO - UNIFENAS
ARIANE BORGES DE FIGUEIREDO

**CARACTERIZAÇÕES MORFOFUNCIONAIS TESTICULARES E CARDÍACAS EM
CAMUNDONGOS KNOCK OUT PARA RECEPTOR DO LDL**

Alfenas - MG
2018

ARIANE BORGES DE FIGUEIREDO

**CARACTERIZAÇÕES MORFOFUNCIONAIS TESTICULARES E CARDÍACAS EM
CAMUNDONGOS KNOCK OUT PARA RECEPTOR DO LDL**

Tese apresentada à Universidade José do Rosário
Vellano - UNIFENAS, como parte das exigências para
obtenção do título de doutora em Reprodução,
sanidade e bem-estar animal.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Dias Garcia

**Alfenas - MG
2018**

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Biblioteca Central da UNIFENAS

Figueiredo, Arianne Borges de

Caracterizações morfofuncionais testiculares e cardíacas em camundongos knock out para receptor do LDL / Arianne Borges de Figueiredo. — Alfenas, 2018.

66 f.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Reprodução, Sanidade Bem-Estar Animal – Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2018.

1. Andrógenos. 2. Doenças cardiovasculares. 3. LDL.
I. Universidade José do Rosário Vellano. II. Título

CDU 616.1(043)

Samira Vidal da Silva Ramos
CRB6 3474



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

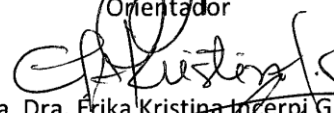
Título: "Caracterizações morfofuncionais testiculares e cardíacas em camundongos knockout para receptor do LDL".

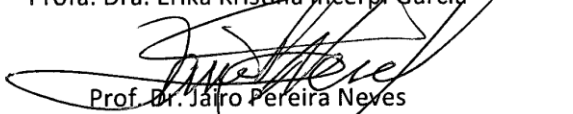
Autor: Ariane Borges de Figueiredo

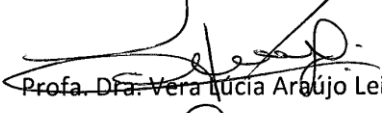
Orientador: Prof. Dr. José Antônio Dias Garcia

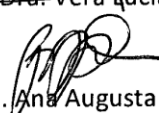
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **DOCTORA EM REPRODUÇÃO, SANIDADE E BEM-ESTAR ANIMAL** pela Comissão Examinadora.


Prof. Dr. José Antônio Dias Garcia
Orientador

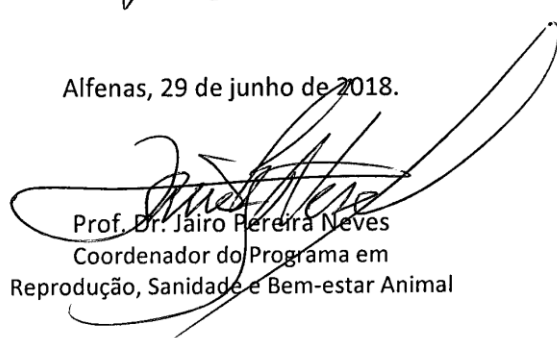

Profa. Dra. Erika Kristina Inzerpi Garcia


Prof. Dr. Jairo Pereira Neves


Profa. Dra. Vera Lúcia Araújo Leite


Profa. Dra. Ana Augusta Pagnano Derussi

Alfenas, 29 de junho de 2018.


Prof. Dr. Jairo Pereira Neves
Coordenador do Programa em
Reprodução, Sanidade e Bem-estar Animal

Dedico aos meus pais e à minha família.

AGRADECIMENTOS

A DEUS.

Ao meu orientador José Antônio Dias Garcia pela amizade, suporte, orientação e conclusão deste título.

Ao Paulo Cesar Garcia Naves, biomédico e técnico do biotério da UNIFENAS, pelos ensinamentos na prática da pesquisa.

À secretária Jaqueline dos Santos pela competência e eficiência nos documentos que solicitava.

Ao IFSULDEMINAS – Campus Machado – pelo Programa de Incentivo à Qualificação (PIQ) e a todos os gestores que remanejaram meus horários para conclusão deste curso.

Ao amigo Cloves Gomes de Carvalho Filho pela caminhada acadêmica conjunta e apoio incondicional e sua esposa Janice.

Aos colegas de classe e colegas do curso de Ciências Biológicas do IFSULDEMINAS, Campus Machado, pela amizade e incentivo.

À UNIFENAS pela estrutura física que possibilitou a execução desta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e enriquecimento deste material.

RESUMO

As variações nos lipídeos e lipoproteínas são consideradas um fator de risco para doenças cardiovasculares, como a aterosclerose. Este estudo avaliou o efeito da dislipidemia genética e alimentar nas características morfofuncionais testiculares e se sua relação com as doenças cardiovasculares desenvolvidas por dietas hiperlipídicas em camundongos geneticamente modificados, ausente do receptor do LDL (Ldlr^{-/-}) e em camundongos selvagens (*wild type*). Além de avaliar a reposição da testosterona na proteção do sistema cardiovascular de camundongos Ldlr^{-/-} alimentados ou não com dieta hiperlipídica. No primeiro trabalho, foram selecionados camundongos Ldlr^{-/-}, divididos em quatro grupos (n=10): S: animais alimentados com dieta padrão (Nuvital®) para roedores e sem aplicação de testosterona; ST: animais alimentados com dieta padrão (Nuvital®) para roedores e com aplicação de testosterona (0,01ml por semana); HL: animais alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico) e sem aplicação de testosterona; HLT: animais alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico) e com aplicação de testosterona (0,01ml por semana). Na análise do perfil lipídico, os camundongos que receberam dietas hiperlipídicas (HL e HLT) apresentaram dislipidemia mista severa com aumento dos níveis séricos do colesterol total, LDL, VLDL e triglicérides, quando comparados com os camundongos dos grupos S e ST. Contudo os camundongos dos grupos HLT apresentaram aumento nos níveis séricos de HDL quando comparados com os camundongos do grupo HL. Os camundongos do grupo S e ST apresentaram níveis séricos de HDL aumentados em relação aos demais grupos estudados. No segundo trabalho, observou-se que a dislipidemia gerada pela deficiência do receptor de LDL (Ldlr^{-/-}) tem uma relação positiva com o aumento da produção de ânions de superóxido vascular, aumento da expressão de CD40 e FasL no testículo. A deleção genética do receptor de LDL (Ldlr^{-/-}) em camundongos associados a uma dieta hiperlipídica aumentou o dano sistêmico e testicular. Em conclusão, os distúrbios metabólicos dos lipídeos gerados pela deleção do gene LDL induziram a disfunção testicular, por mecanismos envolvendo estresse oxidativo, inflamação e apoptose, prejudicando a espermatogênese e a esteroidogênese testicular. Sugere-se também que a testosterona possa causar indiretamente a hipertrofia de cardiomiócitos.

Palavras-chave: Andrógenos. Doenças cardiovasculares. LDL.

ABSTRACT

Variations in lipids and lipoproteins are considered a risk factor for cardiovascular diseases, such as atherosclerosis. This study evaluated the effect of genetic and alimentary dyslipidemia on testicular morphofunctional characteristics and whether its relation with the cardiovascular diseases developed by hyperlipidic diets in genetically modified mice, absent LDL receptor (Ldlr^{-/-}) and *wild type* mice. In addition to evaluating the replacement of testosterone in the protection of the cardiovascular system of Ldlr^{-/-} mice fed or not with a hyperlipidic diet. In the first study, Ldlr^{-/-} mice were selected, divided into four groups (n = 10): S: animals fed standard diet (Nuvital®) for rodents and without testosterone application; ST: animals fed standard diet (Nuvital®) for rodents and with testosterone application (0.01 ml per week); HL: animals fed a hyperlipid diet (20% total fat, 1.25% cholesterol and 0.5% cholic acid) and without testosterone application; HLT: animals fed a hyperlipid diet (20% total fat, 1.25% cholesterol and 0.5% colic) and with testosterone application (0.01 ml per week). In the analysis of the lipid profile, the mice that received hyperlipidic diets (HL and HLT) presented severe mixed dyslipidemia with increased serum levels of total cholesterol, LDL, VLDL and triglycerides, when compared to the mice of the S and ST groups. However, the HLT group showed an increase in serum HDL levels when compared to the mice in the HL group. The mice from the S and ST groups had increased serum HDL levels in relation to the other groups studied. In the second study, it was observed that the dyslipidemia generated by the LDL receptor deficiency (Ldlr^{-/-}) has a positive relation with the increase in the production of vascular superoxide anions, increased expression of CD40 and FasL in the testis. Genetic deletion of the LDL receptor (Ldlr^{-/-}) in mice associated with a hyperlipidic diet increased both systemic and testicular damage. In conclusion, the metabolic disorders of the lipids generated by the deletion of the LDL gene induced testicular dysfunction, by mechanisms involving oxidative stress, inflammation and apoptosis, impairing spermatogenesis and testicular steroidogenesis. It is also suggested that testosterone may indirectly cause hypertrophy of cardiomyocytes

Key words: Androgens. Cardiovascular diseases. LDL.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 do artigo 1	Western blot analysis of CD40 (A) expression and FasL protein expression in the testis (B). Values were expressed as mean $\pm$ SEM. n = 10 / group. Different letters indicate significant differences between groups (p <0.05).....	37
Figura 1 do artigo 2	Corte histológico do ventrículo esquerdo de camundongos: no painel superior (coloração HE), mostrando a diferença entre os diâmetros dos cardiomiócitos; no painel inferior (coloração picrosírius red, mostrando depósito de colágeno em vermelho no meio intersticial do tecido muscular cardíaco.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 do artigo 1	Plasma lipids, serum C-reactive protein (CRP) and superoxide anion concentration in the aorta.	35
Tabela 2 do artigo 1	Analysis of the epidemium content	36
Tabela 1 do artigo 2	Tabela 1 - Efeitos dos tratamentos com testosterona nos triglicerídeos séricos, frações de colesterol, glicose, insulina e Homa-ir em camundongos LDLr -/- alimentados com dieta padrão e hiperlipídica.	53
Tabela 2 do artigo 2	Parâmetros da aorta e do ventrículo esquerdo (VE)	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEP	Comitê de ética de pesquisa
DAC	Doença arterial coronariana
FasL	<i>Fas ligand</i>
GSH-Px	<i>Enzyme glutathione peroxidase</i>
HDL	<i>High density lipoproteins</i>
HOMA	Índice de Homa – dosagens de insulínia
HVE	Hipertrofia ventricular esquerda
IKK	Inibidor Kappa b quinase
IMC	Índice de massa corpórea
IP	Via intraperitoneal
LDL	Low density lipoprotein (lipoproteínas de baixa densidade)
Ldlr-/-	Low density lipoprotein receptor (Receptor de lipídeos de baixa densidade)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
PPARs	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SCV	Sistema cardiovascular
SOD	<i>Superoxide dismutase</i>
TNF	<i>Tumor necrosis fator</i>
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1	Introdução e justificativa.....	12
1.1	Objetivo geral	12
1.2	Objetivos específicos	13
1.3	Hipótese.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Dislipidemias.....	14
2.2	Hipertrofia ventricular esquerda (HVE)	17
2.3	Camundongos Ldlr-/-.....	18
2.4	Relação entre hormônios andrógenos e doenças arterial coronariana (DAC)	19
2.5	Alterações testiculares associadas a dietas hiperlipídicas	20
2.6	Estresse oxidativo	21
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
3	CAPÍTULO 1 (ARTIGO 1).....	29
4	CAPÍTULO 2 (ARTIGO 2).....	46
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A dislipidemia é uma complexa desordem no metabolismo dos lipídeos e pode estar associada com fatores genéticos e alimentares, sendo classificada genotípica ou fenotipicamente. Elas podem aumentar processos inflamatórios cardiovasculares, gerar estresse oxidativo e disfunção endotelial e, consequentemente, hipertensão arterial, que estão intimamente ligados ao maior risco de hipertrofia cardíaca. A hipertensão arterial juntamente com a hipertrofia ventricular cardíaca aumenta o risco de morte nos pacientes, que são consideradas como a principal causa de morte no mundo.

No sexo masculino, a influência dos níveis de testosterona no metabolismo dos lipídeos e o risco de doenças cardíacas são complexos e não estão completamente estabelecidos. Há controvérsias quanto aos níveis séricos da testosterona com a dislipidemia, estresse oxidativo e alterações na secreção da testosterona com o desenvolvimento das doenças cardiovasculares. Há poucas evidências de que a testosterona endógena é um fator de risco negativo, visto que o papel da testosterona e terapia de reposição na saúde cardíaca masculina é controversa.

A obesidade associada a distúrbios, na regulação dos lipídeos, pode interferir na reprodução de homens influenciando na produção de testosterona e, também, pode reduzir a qualidade dos espermatozoides, por meio de alterações moleculares nas células e da estrutura física, tanto em humanos como em outros animais, levando a distúrbios de fertilidade.

Esta pesquisa justifica-se para esclarecer e associar a via metabólica da dislipidemia com distúrbios morfofuncionais testiculares e também avaliar se a reposição do hormônio testosterona tem efeito na proteção cardiovascular. Assim, objetivou-se verificar o efeito da dislipidemia genética e alimentar nas alterações morfofuncionais testiculares e se estas alterações estão associadas às doenças cardiovasculares desenvolvidas por dietas hiperlipídicas em camundongos geneticamente modificados, ausente do receptor do LDL (Ldlr^{-/-}) e em camundongos selvagens (*wild type*).

1.1 Objetivo geral

Verificar o efeito da dislipidemia genética e alimentar nas alterações morfofuncionais testiculares e sua associação com doenças cardiovasculares desenvolvidas por dietas hiperlipídicas em camundongos geneticamente modificados, ausente do receptor do LDL (Ldlr^{-/-}), e em camundongos selvagens (*wild type*). Além disso, procurou-se avaliar a ação do

uso da testosterona exógena na proteção do sistema cardiovascular de camundongos Ldlr-/- alimentados ou não com dieta hiperlipídica.

1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar como a deleção do gene do receptor de lipoproteínas de baixa densidade (Ldlr-/-) pode afetar a reprodução masculina;
- b) Avaliar o espermograma e determinar a concentração de testosterona nos mecanismos envolvidos na infertilidade masculina;
- c) Quantificar os níveis séricos dos camundongos Ldlr-/-.
- d) Determinar as alterações cardiovasculares presentes nos camundongos Ldlr-/-.

1.3 Hipótese

A testosterona exógena tem efeito protetor no sistema cardiovascular do homem e favorece a fatores morfofuncionais nos testículos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Dislipidemias

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo e a maioria é causada por fatores tradicionais de risco, sendo um deles a hiperlipidemia (LEE et al., 2004). As dislipidemias são fatores relevantes de riscos para doenças cardiovasculares e as intervenções apropriadas podem ter impacto no tratamento clínico (KINGSBURY e BONDY, 2003).

Segundo Garcia (2008), há uma relação direta entre dietas hiperlipídicas e danos cardiovasculares. No miocárdio de animais experimentais, submetidos a padrão dietético gorduroso como potencializador da HVE (hipertrofia ventricular esquerda), o aumento na concentração de lipídeos plasmáticos favorece o dismorfismo do tecido muscular cardíaco. As características e hábitos alimentares das populações mantêm-se como argumentos das diferenças observadas nos fatores de risco de doenças cardiovasculares (MARTINS e SILVA, 2007).

A dislipidemia é marcada por agrupamentos anormais de lipídeos ou lipoproteínas no sangue, determinada por fatores genéticos e do meio ambiente (FRANCA E ALVES, 2006). A regulação do metabolismo lipídico por drogas ou dietas naturais é importante para a redução dos risco de doenças cardiovasculares (SCHAEFER, 2002).

Os lipídeos ou gorduras se estabelecem como um grupo composto de conformação relacionada, indireta ou diretamente, com ácidos graxos. Eles possuem a característica de ser relativamente insolúveis em água e solúveis em solventes apolares. Por serem parcialmente insolúveis no meio líquido, os lipídeos são transpostos dentro do corpo sob a forma de partículas nomeadas de lipoproteínas (SANTOS, 2009). Para o mesmo autor, o endotélio compartilha do processo de aterogênese, tendo como um dos fatores de risco direto a hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia.

Atualmente, doenças cardiovasculares se mostram como uns desafios para a medicina, vastamente debatidas na área da saúde, principalmente, sendo responsáveis pelos altos índices de óbitos e internações, elas comprometem a qualidade de vida na população (CHRISTMANN, 2011). Dentre as moléstias pertencentes ao grupo das doenças cardiovasculares, a aterosclerose é a principal causa de mortalidade em países desenvolvidos e de grande importância nos países em vias de desenvolvimento e nos menos desenvolvidos (GOTTLIEB et al., 2005).

Esta doença também é a representante do maior indicador de morbidade, em todo o mundo, sendo a lesão aterosclerótica a anormalidade mais comumente localizada nas artérias (CORRÊA-CAMACHO et al., 2007).

Ao caracterizar a morfologia vascular, a camada íntima é constituída por uma camada única de células do endotélio, enquanto, na camada média, há a formação de células musculares lisas, conjunto de fibras colágenas e fibrilas. As arteríolas são sítios cruciais de resistência à função bombeadora do coração, controlando o fluxo de sangue para os vasos capilares. Os vasos são compostos pelas camadas média, íntima e adventícia elásticas, todas elas rodeadas por matriz extracelular (SAAD, 2004).

A pressão arterial é o resultado da relação do débito cardíaco e da resistência vascular. Mantendo-se as outras variáveis constantes, a pressão arterial altera de modo proporcional ao acréscimo de volume dentro dos vasos. Evidências indicam que o evento capital, para o início das lesões ateroscleróticas, é o acúmulo de lipoproteínas presentes no plasma na íntima arterial, que desencadeia reações celulares específicas, das quais a disfunção endotelial e a condição inflamatória são os componentes principais (LUZ e FAVARATO, 2003).

Em lesões excêntricas, o grau de obstrução pode ser dinâmico, porque a porção da placa menos afetada pelo processo aterosclerótico pode sofrer dilatação ou constrição, variando a luz efetiva do vaso. De qualquer modo, a restrição da reserva coronária é progressiva; inicialmente, a isquemia ocorre em situações de demanda intensa de gás oxigênio, depois em menores até haver comprometimento totalmente com a reserva coronária, quando a lesão atinge noventa por cento do diâmetro vaso (CAVALCANTE, 2009).

Neste sentido, a redução dos níveis plasmáticos de colesterol total da fração LDL, quer seja por meio de mudanças no estilo de vida ou pelo uso de fármacos, tem-se despontado como eficaz para a redução de episódios coronarianos, normalização da função endotelial, balanceamento e, até mesmo, regressão de lesões ateroscleróticas (ASSIS et al., 2013). Com relação à normalização do peso corporal, as alterações nos hábitos alimentares, a diminuição do consumo de ácidos graxos saturados e ácidos graxos trans, assim como o aumento na ingestão de monoinsaturados e poli-insaturados, estão presentes em diferentes estudos, avaliados como medidas importantes para amortizar a concentração no plasma de lipoproteínas aterogênicas (SANTOS e BORTOLOZO, 2009).

A alteração do estado lipídico, no sistema circulatório, pode ter, então, como consequência a insuficiência coronariana, o estado em que há o desbalanceamento entre a oferta e o consumo de oxigênio, para a conservação plena das necessidades fisiológicas, porque a lesão aterosclerótica com o acúmulo de colesterol e desenvolvimento de células

musculares lisas na túnica íntima, leva à inflamação e a uma placa fibrosa com uma projeção para dentro do lúmen, transformando a túnica média, levando a uma cadeia de complicações circulatórias decorrentes da resposta inflamatória desencadeada na parede do vaso (CORRÊA-CAMACHO et al., 2007; LUZ e FAVARATO, 2003).

A hiperlipidemia também está associada à hipovitaminose, o que pode causar vários distúrbios do metabolismo ósseo (PREMAOR; FURLANETTO, 2006). Verifica-se que já são usadas diferentes estratégias terapêuticas, para aumentar os níveis de HDL ou para melhorar a sua função em uma tentativa de controlar a hiperlipidemia e reduzir os riscos cardiovasculares (RAGBIR e FARMER, 2010)..

Terra (2013) concluiu, em seu trabalho, que grupos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram uma elevação significativa das concentrações plasmáticas de CT, LDL, VLDL e TG, ou seja, apresentaram hipercolesterolemia severa, associada ao baixo esforço físico.

Kraus et al, (2002) estudaram indivíduos sedentários, com sobrepeso ou obesos com moderada dislipidemia, em três grupos de exercício e um controle, os quais variaram em intensidade (40 a 80% VO₂ max – volume máximo de oxigênio absorvido) e/ou volume (19,2 a 32 km/semana). Os resultados demonstraram grande associação entre o volume do exercício físico e melhora no perfil lipoprotéico.

Camundongos selvagens (*wild type*) apresentam níveis elevados de HDL no plasma, quando comparados com os outros grupos. O HDL atua como um fator de proteção contra doenças cardiovasculares, promovendo o transporte reverso do colesterol LDL e exerce efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antitrombóticos (DUFFY; RADER; 2009).

As HDL plasmáticas possuem ações antiaterogênicas, incluindo potente atividade antioxidante e anti-inflamatória (BARTER et al., 2004). Estudos clínicos e epidemiológicos relacionaram a diminuição da concentração plasmática da HDL com o desenvolvimento de doença arterial coronariana (DAC) (YOUNG et al., 2004).

A disfunção das células endoteliais está intimamente ligada à redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e é um fenômeno precoce na patogênese da aterosclerose (MAXWELL, 2002). Estudo de MA et al, (2012) mostraram que a hiperlipidemia, hiperglicemia e a inflamação são induzidas com uma dieta rica em gordura em longo prazo.

2.2 Hipertrofia ventricular esquerda (HVE)

A hipertrofia ventricular esquerda é o complexo ajustamento cardíaco adaptativo do miocárdio à sobrecarga hemodinâmica crônica (FRIMM, 1998). Este complexo representa uma resposta adaptativa do coração à hipertensão arterial, um dos mais importantes fatores de riscos independentes de doença cardiovascular e o mais comum em complicações cardiovasculares, como o desenvolvimento de insuficiência cardíaca sistólica e diastólica, sendo a hipertrofia concêntrica o padrão geométrico mais associado à progressão para insuficiência cardíaca (MATOS-SOUZA et al., 2008; NEVES e OIGMAN, 2000).

A hipertensão, fundamentalmente a hipertrofia cardíaca, procede do aumento das dimensões (hipertrofia) dos cardiomiócitos - decorrentes de aumento quantitativo das proteínas estruturais e contráteis - e do aumento do conteúdo de fibroblastos e elementos intersticiais. As hipertrofias, de maneira simplificada, provêm da sobrecarga de pressão e/ou volume. O miocárdio interpreta essas sobrecargas de modo diferenciado assim, o resultado final, nessas circunstâncias, é bastante diferente tanto em modificações na arquitetura ventricular quanto nas variações bioquímicas produzidas nos componentes (MILL e VASSALLO, 2001).

A isquemia surge, então, pela redução da reserva coronária, em decorrência de disfunção do endotélio e, também, pelo próprio afinamento das arteríolas causado pela fibrose que se aloja ao seu redor. Aliás, a retificação e o estiramento dos vasos que se destinam às porções subendocárdicas enfraquece a capacidade vasodilatadora, tornando-os inadequados para provimento de fluxo para a massa acrescida, ao lado da dislipidemia, do tabagismo e do diabetes mellito, constitui-se um dos mais importantes fatores de risco controláveis ou removíveis para doença arterial coronária (FEITOSA et al., 2002). Além de alterações anatômicas, alterações no comportamento funcional coronariano contribuem para a diminuição da reserva coronariana em indivíduos hipertensos (GOWDAK et al., 2005).

A hipertrofia ventricular esquerda (HVE) constitui um indicador muito importante de doenças cardiovasculares com risco de mortalidade. De acordo com Kannel (1983), indivíduos que apresentam HVE, diagnosticada por alterações eletrocardiográficas, apresentaram seis vezes mais risco de morte, quando comparado com a população em geral.

Fatores como processo inflamatório (KAI et al., 2005), disfunção endotelial (AUBIN et al., 2006) e stress oxidativo (LANG et al., 2000) no sistema cardiovascular são condições que promovem a hipertrofia cardíaca. Todavia vários estudos têm demonstrado uma redução da morbimortalidade por doenças cardiovasculares, interrupção, egressão e prevenção da

doença aterosclerótica e da HVE por meio de drogas redutoras do colesterol plasmático (GARCIA et al., 2008; BUCHWALD et al., 1990).

A HVE constitui um conjunto de alterações estruturais causadas pelo aumento das dimensões dos cardiomiócitos, proliferação do tecido conjuntivo intersticial e falta de oxigenação na circulação coronária (WOLLERT; DREXLER, 2002). Para Kastelein et al. (2008), as estatinas, inibidoras da hidroximetilglutaril-coenzima-A redutase (HMG-CoA redutase), são o grupo de fármacos mais potentes e eficazes para reduzir o colesterol total (CT) e o LDL.

Para Chrysseis (2000), substâncias que combinam antioxidante e atividades hipocolesterolêmicas devem ser eficazes na prevenção da formação e progressão da aterosclerose.

2.3 Camundongos Ldlr-/-

A engenharia genética desenvolveu camundongos considerados como modelos, para estudos em hipercolesterolemia experimental. A partir da década de 1990, os modelos mais utilizados são de camundongos knockout para os receptores da Ldlr-/- e o gene da Apoe -/- (KIM e YOUNG, 1998; BRESLOW, 1993). Estes modelos de aterosclerose são úteis para investigar as influências ambientais e genéticas sobre formação e composição da lesão e diferem de maneiras importantes, em relação às diferenças nas lipoproteínas plasmáticas (GETZ e REARDON, 2016).

Segundo Fernandes et al, (2012) e Napoli et al, (2004), os modelos de camundongos acabam sendo utilizados em estudos envolvendo a gênese da aterosclerose e da dislipidemia e não raramente protocolos de treinamento físico têm feito parte desses estudos.

Para se originar o camundongo com deficiência para o gene que expressa o receptor de LDL (Ldlr-/-), houve a deleção do gene que expressa este receptor (Ldlr-/-). Esse animal possui aumento significativo nos níveis sanguíneos das lipoproteínas aterogênica LDL e lipoproteína de densidade intermediária (IDL), apresentando um quadro de hipercolesterolemia moderada semelhante àquele descrito em humanos, (ISHIBASHI et al., 1994). Esse modelo animal tem sido extensivamente utilizado, na investigação de mecanismos envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose, como também em ensaios medicamentosos (LUSIS, 2004).

Mutações no gene receptor, em humanos, da LDL causam hipercolesterolemia familiar, quem na sua forma homozigota, é caracterizada por uma dramática elevação nos

níveis de colesterol total e de sua fração LDL (600-800 mg/dL), ocasionando aterosclerose severa e prematura (MARKS et al., 2003).

2.4 Relação entre hormônios andrógenos e doenças arterial coronariana (DAC)

Baixos níveis de testosterona têm sido associados a desfechos que reduzem a sobrevivência em homens e têm sido associados com a obesidade, fatores de risco cardiovascular, síndrome metabólica, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, entre outros resultados que podem aumentar o risco de morte prematura (ARAUJO, 2011). De acordo com relatos científicos, a deficiência androgênica pode contribuir para o surgimento de alterações no perfil glicídico e lipídico (GUAY, 2009).

Os níveis séricos de testosterona apresentam declínio gradual em homens com idade, com estudos longitudinais que mostram declínios entre 0,4 e 2,6% ao ano (FELDMAN et al., 2002).

As diferenças sexuais, quanto ao risco de doenças arterial coronariana, são geralmente atribuídas a efeitos protetores dos estrógenos e/ou pró-aterogênicos dos andrógenos (GREEN e BAIN, 1993; SULLIVAN et al., 2009).

Os homens são duas vezes mais propensos a morrer de doença arterial coronariana que as mulheres, provavelmente, porque eles não têm a proteção conferida pelos hormônios estrogênicos endógenos ou exógenos (NATHAN e CHAUDHURI, 1997), de outro lado, elevados níveis de hormônios andrógenos em homens são prejudiciais ao seu sistema cardiovascular (SULLIVAN et al., 2009).

A indução de deficiência androgênica em homens jovens está associada com uma diminuição das taxas de oxidação de lipídeos e um aumento da massa total de gordura (MAURAS et al., 1998).

A relação com a doença coronária aterosclerótica e hipertrofia ventricular esquerda (HVE) foi demonstrada em diferentes estudos (KANDEL et al., 1983 e GARCIA et al., 2008) no qual a dislipidemia está associada com o aumento de radicais livres em modelos humanos e animais (DAVI et al., 1997). Por outro lado, a redução da morbimortalidade por doenças cardiovasculares, a interrupção, a regressão e a prevenção da doença aterosclerótica e da HVE por drogas redutoras do colesterol plasmático, também, tem sido referida por inúmeros (GARCIA et al., 2008; BUCHWALD et al., 1990; ORNISH et al., 1990; BROWN et al., 1990).

No entanto, há modelos experimentais em que a dieta hiperlipídica aumenta a severidade da aterosclerose (ADAMS et al., 1995 e FISCHER et al., 1985), em outros modelos, é a deficiência de testosterona que prejudica o metabolismo lipídico e aumenta a aterosclerose (XU et al., 2002; NATHAN et al., 2001).

2.5 Alterações testiculares associadas a dietas hiperlipídicas

O estado nutricional afeta a função reprodutora de mamíferos (WADE et al., 1996). Estudos clínicos relatam que tanto indivíduos adultos obesos como os com baixo peso corpóreo apresentam perturbações na função reprodutora, o mesmo tendo sido verificado em roedores (SEKINE TAKASHIBA et al., 2011).

Yang et al, (2005) induziram obesidade em ratos por dieta hipercalórica, durante seis semanas e avaliaram o desenvolvimento testicular nestes animais. Além das taxas de testosterona e estradiol estarem significativamente menores, a morfologia testicular apresentou alterações, visto que os túbulos seminíferos não se encontravam bem desenvolvidos e suas camadas celulares organizadas de forma esparsas e atípicas.

Dados indicam que a ação principal da testosterona é reprimir a expressão gênica (SADATE-NGATCHOU et al., 2004). Dentro do testículo, as três principais células que interrompem a espermatogênese são as células somáticas, o Leydig e Células de Sertoli e as próprias células germinativas. Em modelos animais de exposição, cada um desses tipos de células pode ser seletivamente tratado por tóxicos específicos, resultando em apoptose de células germinativas e falha na espermatogênese (BOEKELHEIDE, 2005).

Considerando que a população de células de Sertoli é estável, ao longo dos estágios do ciclo, elas têm sido utilizadas numericamente como ponto de referência, para a quantificação e correção de contagens de células germinativas, propiciando a base para estudos de alterações no processo espermatogênico (CLERMONT et al., 1988).

Os lipídeos presentes nas dietas afetam o padrão de organização da membrana plasmática nos diferentes tecidos, nos testículos, altera a disponibilidade de receptores de gonadotrofinas, que são hormônios proteicos, como o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH), comprometendo, assim, a produção de testosterona pelas células de Leydig (intersticiais) e a espermatogênese pelas células dos túbulos seminíferos, respectivamente (SEBOKOVA et al., 1988).

Sugere-se, em descobertas experimentais, a possibilidade de que AGPI (Ácido graxo poli-insaturado) pode diferencialmente, afetar as respostas celulares pelas alterações na fluidez da membrana e na característica dos receptores (WATHES et al., 2007).

2.6 Estresse oxidativo

O oxigênio, no seu estado molecular (O_2), é essencial para muitos processos metabólicos vitais (AHMAD, 1995). A fórmula molecular do O_2 admite reações de oxidação e redução, possibilitando, assim, a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS) (BARBOSA et al., 2010).

As espécies reativas de oxigênio são contribuintes importantes para a regulação da função do esperma em sentido positivo e negativo. Embora seja evidente que alguns fatores ambientais (por exemplo, radiação eletromagnética de radiofrequência, altas concentrações de ácidos graxos insaturados, aldeídos eletrofílicos ou produtos químicos de ciclo redox) ou de estilo de vida podem ignorar a biologia normal e induzir diretamente patologias espermáticas mediadas pelo estresse oxidativo (AITKEN et al., 2004).

A redução tetravalente do oxigênio, catalisada pela enzima citocromo-oxidase, ao final da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, gera moléculas de água. No entanto a redução monovalente, em consequência de processos metabólicos celulares normais, gera as ROS (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2005). As ROS incluem um grande número de moléculas quimicamente reativas, oriundas do oxigênio, dentre elas, o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^\cdot$) (RILEY E BEHRMAN, 1991). Em concentrações fisiológicas, as ROS têm funções biológicas, porém, quando presentes em quantidades excessivas, podem induzir o estresse oxidativo (SHARMA e AGARWAL, 1996). Este tipo de estresse se caracteriza pelo desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, alterando assim a homeostase redox e induzindo a oxidação de lipídeos, proteínas e DNA (BARBOSA et al., 2010).

A resposta oxidativa depende da intensidade do estímulo, resultando em adaptação ou lesão celular. No mecanismo de adaptação, as células, para tolerar o estresse oxidativo, sintetizam moléculas que farão a defesa antioxidante até o restabelecimento do equilíbrio. A lesão ocorre como resultado da alteração transitória ou permanente da homeostase celular após estímulos, químicos ou fisiológicos (DROGE, 2002).

O estresse oxidativo desempenha papéis críticos na patogênese de várias doenças (BROWNLEE, 2001). Na condição diabética, o estresse oxidativo prejudica absorção de glicose no músculo e diminui a secreção de insulina das células β pancreáticas (EVANS et al., 2005). Aumento do estresse oxidativo também está subjacente à fisiopatologia da hipertensão e à aterosclerose (OHARA et al., 1994) afetando diretamente as células da parede vascular.

O estresse oxidativo está intimamente ligado a outros componentes do processo degenerativo, como a disfunção mitocondrial, a excitotoxicidade, a toxicidade e a inflamação (JENNER, 2003).

As evidências sugerem que o estresse oxidante altera muitas funções do endotélio, incluindo a modulação do tônus vasomotor. Inativação de óxido nítrico (NO) por superóxido e outras ROS parece ocorrer em condições como hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes e tabagismo. A perda de NO associados a esses fatores de risco tradicionais podem, em parte, explicar por que eles predis põem a aterosclerose (CAI, 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, Michael R.; WILLIAMS, J. Koudy; KAPLAN, Jay R. Effects of androgens on coronary artery atherosclerosis and atherosclerosis-related impairment of vascular responsiveness. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Winston-Salem, NC, v. 15, n. 5, p. 562-570, may 1995.
- AHMAD, Sami. **Oxidative stress and antioxidant defenses in biology**. New York: Chapman & Hall, 1995. p. 238.
- AITKEN, R. John; BAKER, Mark A.; O'BRYAN, Moira. Andrology lab corner: shedding light on chemiluminescence: the application of chemiluminescence in diagnostic andrology. **Journal of andrology**, Callaghan, New South Wales, Australia, v. 25, n. 4, p. 455-465, july/aug. 2004.
- ARAÚJO, Andre B. et al. Endogenous testosterone and mortality in men: a systematic review and meta-analysis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Massachusetts, v. 96, n. 10, p. 3007-3019, oct. 2011.
- ASSIS, P. V. D. et al. Expression of FAS ligand in the ipsilateral and contralateral testicles of rats subjected to the torsion of the unilateral testicular cord. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 28, n. 7, jul. 2013.
- AUBIN, M. C. et al. Role of probucol on endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries associated with left ventricular hypertrophy. **J Cardiovasc Pharmacol**, Montreal, Quebec, Canada, v.47, n.5, p. 702-710, may 2006.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, jan. 2010.
- BARTER, Philip J. et al. Antiinflammatory properties of HDL. **Circulation research**, v. 95, n. 8, p. 764-772, oct. 2004.
- BOEKELHEIDE, K. Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis. **JNCI Monographs**, Providence, v. 2005, n. 34, p. 6-8, mar. 2005.
- BRESLOW, J. L., Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, NY, v. 90, n. 18, p. 8314-8318, sept. 1993.
- BROWN, G. et al. Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid lowering therapy in men high levels of apolipoprotein. **N Engl J Med.**, Seattle, v. 323, n. 19, p. 1290-1298, nov. 1990.
- BUCHWALD, H. et al. Effects of partial ileal bypass surgery on mortality and morbidity from coronary heart disease in patients with hypercholesterolemia. Report of the Program of the Surgical Control of Hyperlipidemias. **N Engl J Med.**, Chicago, v. 323, n. 14, p. 946-955, oct.1990.

CAI, Hua; HARRISON, David G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation research**, Dallas, v. 87, n. 10, p. 840-844, nov. 2000.

CAVALCANTE, Patrícia Freire et al. **A importância dos fatores de risco na obstrução das artérias coronárias utilizando técnicas de mineração de dados**. Goiás: Universidade Católica de Goiás, 2009.

CHRISTMANN, Morgana; COSTA, Cássia Cinara da; MOUSSALLE, Luciane Dalcanale. Avaliação da qualidade de vida de pacientes cardiopatas internados em um hospital público. **Rev AMRIGS**, Porto Alegre, v. 55, n. 3, p. 239-243, jan. 2011.

CHRYSELIS, M.C. Hypcholesterolemic and hypolipidemic activities of some novel morphine derivatives with antioxidant activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Greece, v. 43, n. 4, p.609–612, feb. 2000.

CLERMONT, Y.; MORGENTALER, H. Quantitative study of spermatogenesis in the hypophysectomized rat. **Endocrinology**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 369-382, sept. 1955.

CORRÊA-CAMACHO, Camila R.; DIAS-MELICIO, Luciane A.; SOARES, A. M. V. C. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. **Arq Ciênc Saúde**, Botucatu, SP, v. 14, n. 1, p. 41-48, jan. 2007.

DAVI, G. et al. In vivo formation of 8-epi-prostaglandin F₂ is increased in hypercholesterolemia. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, Italy, v. 17, n. 11, p. 3230–3235, oct. 1997.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, Germany, v. 82, n. 1, p. 47-95, jan. 2002.

DUFFY, Danielle; RADER, Daniel J. Update on strategies to increase HDL quantity and function. **Nature Reviews Cardiology**, Philadelphia, PA, USA, v. 6, n. 7, p. 455-463, jun. 2009.

EVANS, Joseph L.; MADDUX, Betty A.; GOLDFINE, Ira D. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. **Antioxidants & redox signaling**, San Francisco, CA, v. 7, n. 7-8, p. 1040-1052, jul. 2005.

FEITOSA, G. S. et al. Alterações cardiovasculares da hipertensão arterial: hipertrofia ventricular esquerda, doença arterial coronária e insuficiência cardíaca. **Rev. Bras. Hipertens.**, Salvador, BA, v. 9, n. 3, p. 280-287, set. 2002.

FELDMAN, Henry A. et al. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Massachusetts, v. 87, n. 2, p. 589-598, feb. 2002.

FERNANDES, S. A. T. et al. Ácido linoleico conjugado e exercício físico: efeitos na aterosclerose de camundongos apoe (-/-). **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde**, Juiz de Fora, Minas Gerais, v. 16, n. 3, p. 217-222, abr. 2012.

FISCHER, G. M. et al. A possible mechanism in arterial wall for mediation of sex difference in atherosclerosis. **Experimental and molecular pathology**, Pennsylvania, USA, v. 43, n. 3, p. 288-296, mar. 1985.

FRANCA, E.; ALVES, G.B. Dislipidemia entre crianças e adolescentes de Pernambuco. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Porto Alegre, RS, v. 87, n. 6, p. 722- 727, dez. 2006.

FRIMM, C. C. Disfunção sistólica e diastólica na hipertensão arterial sistêmica com hipertrofia ventricular esquerda. **Rev. Bras. Hipertens**, São Paulo, SP, v. 5, n. 3, p. 189-194, jul-set. 1998.

GARCIA, J. A. D. et al. S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) prevents myocardial alterations in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice by antiinflammatory action. **Journal of cardiovascular pharmacology**, Campinas, SP, v. 51, n. 1, p. 78-85, jan. 2008.

GETZ, Godfrey S.; REARDON, Catherine A. Do the Apoe^{-/-} and Ldlr^{-/-} Mice Yield the Same Insight on Atherogenesis? Highlights. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Chicago, IL, v. 36, n. 9, p. 1734-1741, jul. 2016.

GOTTLIEB, Maria G. V.; BONARDI, Gislaine; MORIGUCHI, EMÍLO H. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. **Scientia Medica**, Porto Alegre, RS, v. 15, n. 3, p. 203-207, jul./set. 2005.

GOWDAK, Luís Henrique W. et al. Cell therapy plus transmyocardial laser revascularization for refractory angina. **The Annals of thoracic surgery**, São Paulo, SP, v. 80, n. 2, p. 712-714, jul. 2005.

GREEN; BAIN C. Epidemiological overview of oestrogen replacement and cardiovascular disease. **Baillieres Clin Endocrinol Metab**. Herston, Austrália, v.7, n.1, p. 95-112, jan. 1993

GUAY, André T. The emerging link between hypogonadism and metabolic syndrome. **Journal of andrology**, Peabody, MA, v. 30, n. 4, p. 370-376, july/aug. 2009.

ISHIBASHI, S. et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **Journal of Clinical Investigation**, Dallas, Texas, v. 92, n. 2, p. 883-893, aug. 1993.

JENNER, Peter. Oxidative stress in parkinson's disease. **Annals of neurology**, London, United Kingdom, v. 53, n. S3, p. S26-S38, mar. 2003.

KAI, Hisashi et al. Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis. **Hypertension research**, Kurume, Japan, v. 28, n. 6, p. 483-490, jun. 2005.

KANNEL, William B. Prevalence and natural history of electrocardiographic left ventricular hypertrophy. **The American journal of medicine**, Boston, Massachusetts, USA, v. 75, n. 3, p. 4-11, sept. 1983.

KASTELEIN, John J. P. et al. Simvastatin with or without ezetimibe in familial hypercholesterolemia. **New England Journal of Medicine**, Amsterdam, v. 358, n. 14, p. 1431-1443, apr. 2008.

KIM, E.; YOUNG, S. G. Genetically modified mice for the study of apolipoprotein B. **Journal of Lipid Research**, San Francisco, CA, v.39, n.4, p.703-723, apr. 1998.

KINGSBURY, Kori J.; BONDY, Greg. Understanding the essentials of blood lipid metabolism. **Progress in cardiovascular nursing**, Canada, v. 18, n. 1, p. 13-18, jan. 2003.

KRAUS, W.E. et al. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. **1N Engl J Med.**, Canada, v. 347, n. 19, p. 1483-1492. nov. 2002.

KRIEGER, M. H. et al. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. **Nitric oxide**, Campinas, SP, v. 14, n. 1, p. 12-20, feb. 2006.

LANG, D. et al. Coronary microvascular endothelial cell redox state in left ventricular hypertrophy: the role of angiotensin II. **Circ Res.**, Dallas, TX, v. 86, n. 4, p. 463-469, apr. 2000.

LEE, Tsung-Ming et al. Effect of pravastatin on left ventricular mass by activation of myocardial K ATP channels in hypercholesterolemic rabbits. **Atherosclerosis**, Taipei, Taiwan, v. 176, n. 2, p. 273-278, jul. 2004.

LUZ, P. L; FAVARATO, D. Hipertensão e aterosclerose, aspectos fisiopatológicos. **Revista Brasileira de Hipertensão**, São Paulo, SP, v. 6, n. 4, p. 131-134, mar. 2003.

LUSIS AJ, MAR R, PAJUKANTA P. Genetics of atherosclerosis. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Los Angeles, California, v. 5, n. 189-218, sept. 2004.

MA, Yanling et al. Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in Ldlr-deficient mice on a long-term high-fat diet. **PloS one**, Shanghai, China, v. 7, n. 4, p. e35835, apr. 2012.

MARKS, D. et al. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. **Atherosclerosis**, London, UK, v. 168, n. 1, p. 1-14, jan. 2003.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, Granada, Spain, v. 15, n. 1-2, p. 75-88, feb. 2005.

MATOS-SOUZA, J. R. et al. Hipertrofia ventricular esquerda: o caminho para a insuficiência cardíaca. **Revista Brasileira de Hipertensão**, Campinas, SP, v. 15, n. 2, p. 71-74, mar. 2008.

MAURAS N. et al. Testosterone deficiency in young men: marked alterations in whole body protein kinetics, strength, and adiposity. **J Clin Endocrinol Metab.**, Charlottesville, Virginia, v. 83, n.6, p.1886-1892, jun. 1998.

MAXWELL, Andrew J. Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases. **Nitric oxide**, Philadelphia, Pennsylvania, v. 6, n. 2, p. 101-124, may 2002.

MILL, J. G.; VASSALLO, D. V. Hipertrofia cardíaca. **Revista Brasileira de Hipertensão**, Vitória - ES, v. 8, n. 1, p. 18-29, fev. 2001.

NAPOLI, C. et al. Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 23, p. 8797-8802, may 2004.

NATHAN, Lauren; CHAUDHURI, Gautam. Estrogens and atherosclerosis. **Annual review of pharmacology and toxicology**, Los Angeles, California, v. 37, n. 1, p. 477-515, apr. 1997.

NATHAN, Lauren et al. Testosterone inhibits early atherogenesis by conversion to estradiol: critical role of aromatase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Los Angeles, CA, v. 98, n. 6, p. 3589-3593, jan. 2001.

NEVES, M. F. T.; OIGMAN, W. Sistema renina-angiotensina e hipertrofia ventricular esquerda. **Revista Brasileira de Hipertensão**, Rio de Janeiro, RJ, v. 7, n. 3, p. 261-267, jul./set. 2000.

OHARA, Yuichi et al. Lysophosphatidylcholine increases vascular superoxide anion production via protein kinase C activation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, TX, v. 14, n. 6, p. 1007-1013, jun. 1994.

ORNISH et al. Can lifestyle changes reverse coronary heart disease? **The lifestyle heart Trial**, Lancet, v. 336, n. 8708, p. 129-133, jul. 1990.

PREMAOR, Melissa Orlandin; FURLANETTO, Tania Weber. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 25-37, fev. 2006.

RAGBIR, Shawn; FARMER, John A. Dysfunctional high-density lipoprotein and atherosclerosis. **Current atherosclerosis reports**, Houston, USA, v. 12, n. 5, p. 343-348, may 2010.

RILEY, J. C. M.; BEHRMAN, H.R. Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New Haven, CT, v. 198, n. 3, p. 781-791, dec. 1991.

SAAD, E. A. Prevenção primária e secundária da aterosclerose: perspectivas atuais e futuras. **Rev SOCERJ**, Rio de Janeiro, RJ, v. 17, n. 2, p. 112-132, abr./jun. 2004.

SADATE-NGATCHOU, Patricia I.; POUCHNIK, Derek J.; GRISWOLD, Michael D. Identification of testosterone-regulated genes in testes of hypogonadal mice using oligonucleotide microarray. **Molecular Endocrinology**, Pullman, Washington, v. 18, n. 2, p. 422-433, feb. 2004.

SANTOS, L. E. S.; BORTOLOZO, E. A. F. Q. Ingestão de ômega 3: considerações sobre potenciais benefícios no metabolismo lipídico. **Publicatio UEPG-Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa, PR, v. 14, n. 02, p. 161-170, ago. 2009.

SCHAEFER, Ernst J. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. **The American journal of clinical nutrition**, Boston, MA, v. 75, n. 2, p. 191-212, feb. 2002.

SEBOKOVA, E.; GARG, M. L.; CLANDININ, M. T. Modulation of receptor-mediated gonadotropin action in rat testes by dietary fat. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, Rockville, MD, v. 254, n. 6, p. E708-E712, jun. 1988.

SEKINE TAKASHIBA, Ken et al. Morfologia testicular de ratos Wistar obesos sedentários e submetidos a treinamento físico. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, Maringá, PR, v. 33, n. 1, may 2011.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, Ohio, USA, v. 48, n. 6, p. 835-850, dec. 1996.

SILVA, João Martins e; SALDANHA, Carlota. Dieta, aterosclerose e complicações aterotrombóticas. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, Lisboa, PO, v. 26, n. 3, p. 277-294, mar. 2007.

SULLIVAN, M. L. et al. The cardiac toxicity of anabolic steroids. **Prog Cardiovasc Dis.**, New York, USA, v.41, n.1, p. 1-15, jul./ago. 1998.

TERRA, G. D. S. V. et al. Efeito do treinamento aquático no perfil lipídico e na hipertrofia ventricular esquerda de camundongos hiperlipidêmicos. **Rev Bras Ativ Fis e Saúde**, Pelotas,RS, v. 18, n.4, p. 453-454, jul. 2013.

WADE, GEORGE N.; SCHNEIDER, J. E.; LI, H. Y. Control of fertility by metabolic cues. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, Amherst, USA, v. 270, n. 1, p. E1-E19, jan.1996.

WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D. R.; AITKEN, R. J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of reproduction**, United Kingdom, v. 77, n. 2, p. 190-201, aug. 2007.

WOLLERT, Kai C.; DREXLER, Helmut. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis. **Heart failure reviews**, Hannover, Germany, v. 7, n. 4, p. 317-325, oct. 2002.

XU, Tao et al. Effect of surgical castration on risk factors for arteriosclerosis of patients with prostate cancer. **Chinese medical journal**, China, v. 115, n. 9, p. 1336-1340, sept. 2002.

YANG, A. J. et al. Effects on development of the testicle in diet induced obesity rats. **Wei Sheng Yan Jiu**, China, v. 34, n. 4, p. 477-479, jul. 2005.

YOUNG, Christine E.; KARAS, Richard H.; KUVIN, Jeffrey T. High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease. **Cardiology in review**, Boston, Massachusetts, v. 12, n. 2, p. 107-119, mar. 2004.

3 CAPÍTULO 1 (ARTIGO 1)

LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR KNOCKOUT AFFECTS THE FERTILITY OF MALE MICE

Submit Journal of Endocrinology- Qualis B1

Ariane Borges Figueiredo^{1,2}, Paulo Antonio Barcellos Cordeiro¹, Amarildo Marciano Rosa¹, Evelise Aline Soares³, Geraldo J M Fernandes³, Erika K. Incerpi Garcia³, Leandro dos Santos⁴, Miller Pereira Palhão⁵, José Antonio Dias Garcia^{2,5}, Marilu Martins Gios⁶.

¹ Academics of the PhD and Master's Degree in Reproduction, Health and Animal Welfare, University of José Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas - MG, Brazil.

² Federal Institute of South Minas Gerais (IFSULDEMINAS), Machado - MG, Brazil.

³ Federal University of Alfenas, Alfenas, MG, Brazil.

⁴ Academic Unit of Serra Talhada, Federal Rural University of Pernambuco, Serra Talhada, PE, Brazil

⁵ Professors of the Doctoral and Master's Degree in Reproduction, Health and Animal Welfare, University of José Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas - MG, Brazil.

⁶ Professor

*Corresponding author: José Antônio Dias Garcia - Rua Antônio Esteves, 850, Jd. Aeroporto, Alfenas, MG, Brazil – CEP: 37130-000 - telephone/fax: +55 35 3292-6470 - cell phone: +55 35 99116-3491 - e-mail: jadiasgarcia@gmail.com

Running Title: LDLR-/- mice have testicular dysfunction.

Total de palavras: 2935

Abstract

Studies of our research group showed that low-density lipoprotein receptor gene Knockout mice developed spontaneous and moderate dyslipidemia. However, when fed fat diet, showed severe dyslipidemia induces alterations in the structure and mechanical properties of the femur, atherosclerosis and left ventricular hypertrophy. In the present study, we investigated whether low-density lipoprotein receptor gene knockout could harm male reproduction and explored the mechanisms involved. It was observed that the dyslipidemia generated by the LDL receptor deficiency has a positive relation with an increase in the production of vascular superoxide anions, an increase in the expression of CD40 and FasL in the testis. Gene deletion of the LDL receptor in mice associated with a hyperlipidic diet increased systemic and testicular damage. In conclusion, metabolic disturbances of the lipids generated by the deletion of the low-density lipoprotein receptor gene induced testicular dysfunction by mechanisms involving oxidative stress, inflammation and apoptosis, impairing spermatogenesis and testicular steroidogenesis.

Keywords: FasL; CD40L, testis

Introduction

Spermatogenesis is fundamental to male fertility and involves a highly intricate process of cellular proliferation, differentiation and apoptosis (Kanippayoor et al., 2013). A dynamic balance between cell proliferation and apoptotic cell death determines the number of testis cells (Russell et al., 2002). Fas receptor and Fas ligand are expressed in the testis (Guazzone et al., 2009). Fas ligand (FasL) is a type II membrane protein belonging to the tumor necrosis factor (TNF) family that induces apoptosis in target cells bearing the receptor Fas (Nagata & Golstein, 1995) and the Fas/FasL system play an important role during the induction of germ

cell apoptosis by a number of testicular stresses and disorders (Koji & Hishikawa, 2003; Boekelheide, 2005).

Oxidative stress is a major factor in the male infertility etiology. The increase in oxidative stress is brought about by increased synthesis of reactive oxygen species (ROS) and/or a failure in the defenses against the ROS. ROS are small, oxygen-based molecules that are highly reactive because of unpaired electrons (Papa & Skulachev, 1997). The most prominent ROS are the superoxide anion, hydrogen peroxide (H_2O_2), and the hydroxyl ion. Superoxide anions (O_2^-) are enzymatically converted to hydrogen peroxide by a superoxide dismutase (SOD). Hydrogen peroxide is then, disposed of the enzyme glutathione peroxidase (GSH-Px). Catalase, on the other hand, is the major hydrogen peroxide detoxifying enzyme found exclusively in peroxisomes (Fridlyand & Philipson, 2006).

Dyslipidemia has been associated with oxidative stress. Hypercholesterolemia induces oxidative stress by causing a reduction in the enzymatic antioxidant defense potential of tissues and the generation of oxygen free radicals such as superoxide anions (Libby, 2000; Gokkusu & Mostafazadeh, 2003; Lusis et al., 2004). In addition, others studies have suggested an association between levels of different markers of systemic oxidative stress and the accumulation of fat (Olusi, 2002; Keaney et al., 2003). Next animal model, Krieger et al. (2006) demonstrated increased ROS generation superoxide anions in aorta. Excessive vascular reactive oxygen species (ROS) generation could mediate cellular damage, necrosis and apoptosis via DNA, protein and lipid oxidation (Elahi et al. 2009). Mitochondria generates ROS and damages cytoplasmic organelles and initiates an intrinsic apoptotic cascade that results in loss of sperm motility, DNA integrity and sperm vitality (Aitken et al., 2012).

Vascular inflammation plays a crucial role in the atherosclerosis pathogenesis and mediate several stages of atherosclerotic plaque development, from the lipid stria formation to

destabilization and plaque rupture that precedes clinical syndromes of cardiovascular disease (Madamanchi et al., 2005). The inflammatory biomarkers are a valuable tool to follow the evolution of this process, allowing measuring the effect of the various therapeutic attitudes implemented. In this context, C-reactive protein is the most extensively studied biomarker. Data on the association between C-reactive protein and cardiovascular risk are broadly consistent (Silva & Lacerda, 2012). A series of studies show the CD40 role, another important signaling molecule of the inflammatory processes involved in atherosclerosis in different stages, comprising phases of: onset, evolution and acute complications after plaque rupture. (Henn et al., 1998; Santos, 2005).

The present study was designed to verify whether deletion of the low-density lipoprotein (LDL) receptor gene may affect male reproduction and explored the mechanisms involved.

Material and methods

Animals

The experiments were performed on *wild type* (WT) mice and Knockout mice for the LDL receptor (*Ldlr*^{-/-}) generated in background C57BL6, males at three months of age, weighing 22 ± 2 g. The animals were purchased at the Jackson Laboratory - United States of America - and were reared at the José do Rosário Vellano University (UNIFENAS, Alfenas, MG, Brazil), with temperature control (22 ± 2) and light / dark cycle (12 h). The mice were divided into three experimental groups: WT Group (n = 20), wild mice, which received regular chow (Nuvital®); Group S (n = 20), *Ldlr*^{-/-} mice that received regular chow (Nuvital®); Group HL (n = 20), *Ldlr*^{-/-} mice receiving hyperlipid ration with 20% total fat, 1.25% cholesterol and 0.5% cholic acid. All animals received water ad libitum and their diets for 15 days.

After 15 days of experiment, the mice remained fasted for 12 hours and then anesthetized (xylazine / ketamine, 6/40 mg / kg, respectively; Bayer AS / Parke-Davis). Blood was collected by retro-orbital venous plexus puncture. Part of the blood was collected in

eppendorf with the heparin anticoagulant (Marca®) to obtain blood plasma and biochemical analysis of lipids. The other part was used to collect blood serum for serum concentrations analysis of C-reactive protein and testosterone.

The testicles were removed surgically. Ten testis of each group were fixed in Bouin and after 24 hours stored in alcohol 70% for histological procedures (pre-results not shown). The epididymides of these testicles were dissected and placed on a Petri dish previously placed on heating plate with temperature at 36°C. With the use of anatomical tweezers, the epididymides were pressed and the semen collected. The other ten testis by group were decapsulated, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C for immunoblot assay.

Blood analysis

Plasma was obtained by centrifugation of the blood (3000 rpm / 10 minutes) with heparin. Enzymatic trials were used for measuring TG, TC and HDL, as described by Hedrick et al. 2001. LDL was determined by Friedewald et al. (1972).

Serum was obtained by blood samples centrifugation (3,000 rpm for 10 minutes). The quantitative determination of the PCR serum concentration was by means of turbidimetry and photometry (Humastar 300® apparatus) expressing the results in mg / dL (Lima et al., 2000). The microparticle immunoenzymatic assay technique (Abbott AxSYM® system) was used for testosterone dosing. The sensitivity of the testosterone method was 1.95 to 11.38 mg / mL.

Superoxide anion measurement in aorta

Superoxide anion levels were assessed on thoracic aortic homogenates (10 aortas) by using lucigenin (5 µmol/L) chemiluminescence, as described by Oliveira et al. (2005). Results were expressed in cpm/10⁶ mg protein, quantified by Bradford method.

After collection, the semen was diluted with 500 µL saline solution. From this dilution, 10 µL were collected and transferred to lamina under coveralls preheated at 36°C for instant spermatozoa motility and vigor analysis. Both quantitative spermatozoa motility (percentage

of motile spermatozoa) and vigor spermatozoa motility (motility grade; from 0 to 4; Sofikitis et al., 2008) were assessed. For the evaluation of sperm concentration (EC), the contents of the Petri dish (500 microlitres of saline plus semen) were collected and transferred to eppendorff with 10% formalin saline. For the spermatozoa concentration analysis, the Neubauer chamber was used, the sperm suspension being diluted in saline formol (1:200). One microliter of this solution was placed in Neubauer's chamber. The Neubauer chamber was observed under an optical microscope in an increase of 50 and 200 times. For the cell count, all cells found in the visual field were considered. Being the number of cells found, multiplied by a hundred six (number of cells $\times 10^6$).

Immunoblot assay in Testis

CD40 and Fas-L expression was measured in whole lysates of homogenated tissue. Briefly, the frozen testis were homogenized with a homogenizer in ice-cold lysis buffer (40 mM Tris, 120 mM NaCl, 0.1% NP40, 100 μ M PMSF, 5 μ g/mL leupeptin, 5 μ g/mL aprotinin) and were incubated on ice for 30 min and centrifuged at $15,000 \times g$ for 20 min at 4°C and the supernatant collected. Protein concentration was determined by the Bradford method using a kit from Bio-Rad (USA) with bovine serum albumin as a standard. Total lysate was separated on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and then transferred to PVDF-plus membranes (Osmonic, USA) or polyvinylidene difluoride membranes. Nonspecific binding was blocked with 5% non-fat milk in TTBS (20 mM Tris, 0.5 M NaCl, 0.2% Tween 20, pH 7.4) for 1.5 h at room temperature. The membranes were incubated at 4°C, overnight with mice monoclonal antibody against CD40 (Santa Cruz, USA) and FasL (BD Biosciences, USA), followed by HRP-conjugated secondary antibody for 1 h. After each incubation, blots were washed with TBS containing 0.2% Tween 20. Immunoreactive bands were visualized by an ECL detection system (Amersham, USA).

Statistical Analysis

The results were expressed as mean $\pm$ SEM and were compared by Analysis of Variance (ANOVA) followed by the Tukey test, with $P < 0.05$ indicating a statistically significant difference.

Results

Table 1 shows lipid profile, CRP and production of superoxide anions in the aorta. In the lipid profile analysis, plasma levels of total cholesterol were increased in the S group in relation to the WT group, and this increase was more pronounced in the HL group. There was also an increase in HDL, LDL and TG levels in the S group compared to the WT group, and the HL mice showed a decrease in plasma levels of HDL and an increase in LDL and TG levels in relation to the mice groups S and WT. A direct relationship was observed between serum C-reactive protein levels and superoxide production in the aorta with plasma levels of total cholesterol and triglycerides. This increase was more exacerbated in the HL group.

Table 1 - Plasma lipids, serum C-reactive protein (CRP) and superoxide anion concentration in the aorta mice. WT: wild-type mice that receive regular chow; S: Ldlr^{-/-} mice that receive regular chow; HL: Ldlr^{-/-} mice that received hyperlipid chow.

	WT (n=10)	S (n=10)	HL (n=10)
TG (mg/dL)	88 $\pm$ 5,7 ^a	123 $\pm$ 4,9 ^b	158 $\pm$ 6,3 ^c
TC (mg/dL)	129 $\pm$ 8,2 ^a	226 $\pm$ 10,0 ^b	630 $\pm$ 32,0 ^c
LDL (mg/dL)	64 $\pm$ 2,0 ^a	142 $\pm$ 8,6 ^b	537 $\pm$ 31,9 ^c
HDL (mg/dL)	47 $\pm$ 1,7 ^b	59 $\pm$ 2,2 ^c	25 $\pm$ 1,9 ^a
PCR (mg/dL)	1,8 $\pm$ 0,2 ^a	5 $\pm$ 0,9 ^b	13,7 $\pm$ 2 ^c
Superoxide anion (cpm x 10 ⁶ /mg protein)	1,2 $\pm$ 0,02 ^a	6,7 $\pm$ 1,3 ^b	14,1 $\pm$ 1,4 ^c

Values were expressed as mean $\pm$ EPM. Different letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$). TG: triglycerides. TC: total cholesterol; LDL: low-density lipoprotein; HDL: High density lipoprotein; PCR: polymerase chain reaction.

The *Ldlr*^{-/-} mice presented significant differences in the sperm parameters when compared to the WT with a decrease in all parameters, except for the vigor of the S group (Table 2). The percentage of motility, sperm vigor and sperm concentration were lower in the HL group than in the S group (Table 2). Regarding the testosterone serum concentration, there were significant differences in the three groups studied, with a decrease in the S group compared to the WT group and a severe decrease in the HL group (Table 2).

Table 2 – Analysis of the epidemium content.

	WT (n=10)	S (n=10)	HL (n=10)
Sperm concentration($\times 10^6$)	152 $\pm$ 11 ^c	74 $\pm$ 2 ^b	12 $\pm$ 4 ^a
Motility (%)	73 $\pm$ 6 ^c	53 $\pm$ 3 ^b	30 $\pm$ 5 ^a
Vigor (0 – 4)	4,0 $\pm$ 0,3 ^c	3,7 $\pm$ 0,3 ^b	2,6 $\pm$ 0,3 ^a
Testosterone (ng/mL)	4,23 $\pm$ 0,12 ^c	2,99 $\pm$ 0,21 ^b	1,97 $\pm$ 0,28 ^a

Values were expressed as mean $\pm$ EPM. Different letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$).

In the analysis of CD40 and FasL expression in the testis, the expression of these proteins increased in a direct proportion with hypercholesterolemia, serum CRP levels and superoxide anion production in the aorta (Table 1 and figure 1).

Discussion

In the present study, it was observed that dyslipidemia generated by LDL receptor deficiency (group S) has a relationship with increased vascular oxidative stress, inflammation, apoptosis

and impairment of the endocrine and exocrine functions of the testis. The dyslipidemia generated by the association between the hyperlipid diet and the deletion of the LDL receptor gene (HL group) exacerbated the systemic and testicular damages.

The results were similar to those ones of the present study (Santos et al., 2011; Soares et al., 2012) LDLr^{-/-} mice fed with a standard diet showed moderate spontaneous dyslipidemia when compared to WT mice, but with an increase in serum HDL levels. This dyslipidemia was accompanied by a moderate increase in oxidative stress and cardiovascular inflammation.

Hypercholesterolemia induces oxidative stress by causing a reduction in the enzymatic antioxidant defense potential of tissues and the generation of oxygen free radicals such as superoxide anions (Libby, 2000; Gokkusu & Mostafazadeh, 2003; Lusis et al., 2004).

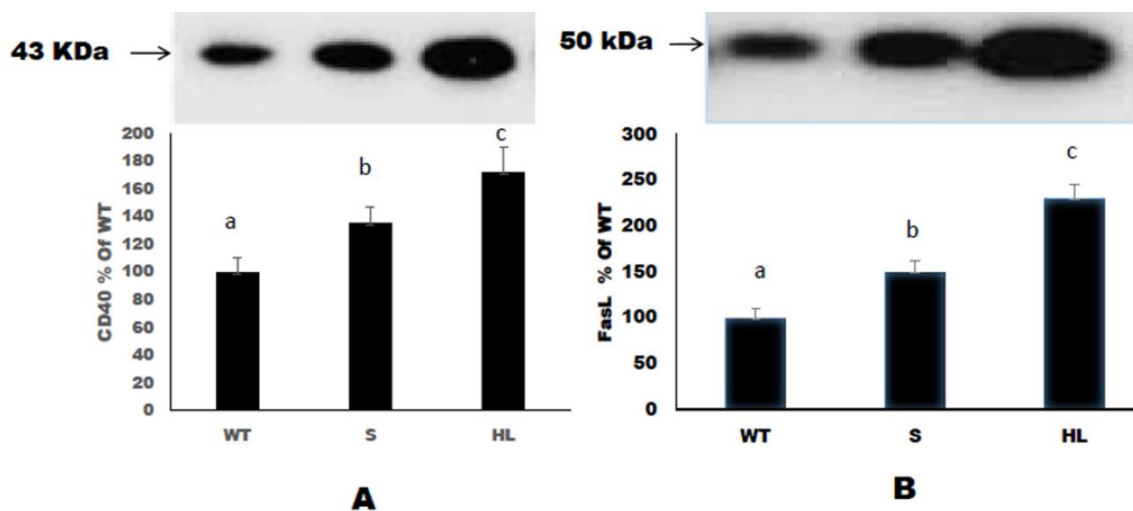


Figure 1- Western blot analysis of CD40 (A) expression and FasL protein expression in the testis (B). Values were expressed as mean $\pm$ SEM. n = 10 / group. Different letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$).

Oliveira et al. (2005) showed that Ldlr^{-/-} mice showed a significantly increased total lipid, cholesterol and triglyceride synthesis, necessarily consuming more hepatic NADPH in relation to wild mice. The decrease of mitochondrial NADPH in these animals promoted an oxidative stress condition due to a reduction of the mitochondrial enzymatic antioxidant

system. This study also showed that the mitochondria of these animals produce more reactive species of oxygen and higher oxidized state of mitochondrial NADP. As a result of these metabolic events, peroxidation reactions are accelerated, leading to cellular injury (Lusis et al., 2004; Shah, 2008).

Ishibashi et al. (1993) demonstrated that *Ldlr*^{-/-} mice are fertile; however, Guo et al. (2015) showed that these mice females have their fertility affected. In the present study, oxidative stress characterized by increased production of superoxide anion in the aorta, associated with dyslipidemia generated by the deletion of the LDL receptor gene, induced systemic and testicular inflammation characterized by the increase of serum CRP in the protein expression of CD40 in the testis. Previous studies have shown that oxidative stress is implicated in up-regulation of CD40L (Schönbeck et al., 2002; Li et al., 2003; Garcia & Incerpi, 2008). CD40 engagement by CD40L leads to protein expression involved in inflammation, including substances secretion related to signaling, like cytokines and ROS (Schoenbeck & Libby, 2001). Activation of CD40 is associated with a broad range of biological effects depending on the cell type and nature of the stimulus (Van Kooten & Banchereau, 1997). For example, CD40 on antigen-presenting cells provides a vital signal for T cell activation and proliferation, whereas activation of CD40 on endothelium results in a proinflammatory signal that leads to chemokine secretion and increased adhesion molecule expression (Henn et al., 1998).

Increased testicular apoptosis in the S group in this study was characterized by increased protein expression of FasL. Studies have shown that increased oxidative stress induces FasL expression in the mice testicles (Assis et al., 2013) suggesting that oxidative stress is involved in the FasL mediated apoptotic mechanism of Fas-bearing target cells. Afford et al. (2001) suggests that the mechanism can be more complex, involving cooperation between Fas and another member of the TNF receptor superfamily, CD40. Therefore, we believe that the

testicular apoptosis observed in the S group mice was caused by vascular oxidative stress and inflammation, leading to testicular changes.

In this study, exocrine and endocrine changes in the S group mice in contrast to the WT mice, due to the oxidative stress generated by genetic dyslipidemia, were characterized by the lower concentration and motility of spermatozoa, in addition to the lower serum level of testosterone. Since both spermatogenesis (Peltola et al., 1994) and Leydig cell steroidogenesis (Quinn & Payne 1984; Chen et al., 2005) are vulnerable to oxidative stress, the low oxygen tension that characterizes this tissue may be an important component of the mechanisms by which the testis protects itself from free radical mediated damage. Increased oxidative stress in the S group mice induced testicular apoptosis via Fas / fasL.

In the testicle, the Fas/FasL system is an important system in the germ cell apoptosis induction by a number of testicular stresses and disorders, including ischemia-reperfusion (Assis et al., 2013). Injection of testosterone undecanoate (Zhou et al., 2001), elevated testicular temperature, orchitis (Theas et al., 2006), androgen deprivation (Sofikitis et al., 2008), exposed to high levels of bisphenyl, all of which can disrupt steroidogenesis and spermatogenesis.

Our results showed that Ldlr^{-/-} mice fed with a hyperlipid diet (HL group) developed a significant increase in oxidative stress caused by severe dyslipidemia, which has a marked decline in plasma levels of HDLc when compared to animals in the S group. HDLc plays an important role as a protective molecule against inflammation and oxidative stress (Barter et al., 2004; Garcia et al., 2011). With the plasma decrease of the HDLc molecule and consequently its protective role, the testicular damage caused by oxidative stress and inflammation were exacerbated, as verified by parameters related to the endocrine and exocrine functioning of the testis. The role of the HDLc molecule as a testicular protector against damage is widely accepted in the literature and its positive correlation with sperm

density and viability is well documented (Padron et al., 1989). This would explain why the testicular damage in the S group animals in our study was much lower than in the HL group.

In conclusion, metabolic disturbances of the lipids generated by the deletion of the low-density lipoprotein receptor gene induced testicular dysfunction by mechanisms involving oxidative stress, inflammation and apoptosis, impairing spermatogenesis and testicular steroidogenesis. In addition, the hyperlipid diet intensified the changes seen in the animal with deletion of the LDL receptor.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest

Acknowledgments

Federal Institute of the South of Minas Gerais - Campus Machado. Machado, MG. University José do Rosário Vellano (UNIFENAS) - Alfenas, MG.

FAPEMIG and CNPq for financial support.

The authors are very grateful to Paulo Cesar Garcia Naves for their excellent technical assistance.

References

Afford SC, Ahmed-choudhury J, Randhawa S, Russell C, Youster J, Crosby HA, Eliopoulos A, Hubscher SG, Young LS & Adams DH 2001 CD40 activation-induced, Fas-dependent apoptosis and NF- κ B/AP-1 signaling in human intrahepatic biliary epithelial cells. *The FASEB Journal* **15** 2345-2354.

Aitken RJ, Jones KT & Robertson SA 2012 Reactive oxygen species and sperm function—in sickness and in health. *Journal of Andrology* **33** 1096-1106.

Assis PVD, Aydos RD, Silva IS, Marks G, Takita LC, Gonçalves MA & Ramalho RT 2013 Expression of FAS ligand in the ipsilateral and contralateral testicles of rats subjected to the torsion of the unilateral testicular cord. *Acta Cirurgica Brasileira* **28** 518-522.

Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M & Fogelman AM 2004 Antiinflammatory properties of HDL. *Circulation Research*, **95** 764-772.

Boekelheide K 2005 Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis. *JNCI Monographs* **2005** 6-8.

Chen H, Liu J, Luo L, Baig MU, Kim JM & Zirkin BR 2005 Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. *Experimental Gerontology* **40** 728-736.

Elahi MM, Kong YX & Matata BM 2009 Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2** 259-269.

Fridlyand LE & Philipson LH 2006 Oxidative reactive species in cell injury: mechanisms in diabetes mellitus and therapeutic approaches. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1066** 136-151.

Friedewald WT, Levy RI & Fredrickson DS 1972 Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* **18** 499-502.

Garcia JAD & Incerpi EK 2008 Fatores e mecanismos envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda e o papel anti-hipertrófico do óxido nítrico. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **90** 443-450.

Garcia JAD, Lima CC, Messori LB, Cruz AF, Marques AP, Simão TP, Soares EA, Resck MCC, Incerp EK, Oliveira N de M, et al. 2011 Efeito anti-inflamatório da lipoproteína de alta densidade no sistema cardiovascular de camundongos hiperlipidêmicos. *Revista Portuguesa de Cardiologia* **30** 763-769.

Gökkuşu C & Mostafazadeh T 2003 Changes of oxidative stress in various tissues by long-term administration of vitamin E in hypercholesterolemic rats. *Clinica Chimica Acta* **328** 155-161.

Guazzone VA, Jacobo P, Theas MS & Lustig L 2009 Cytokines and chemokines in testicular inflammation: a brief review. *Microscopy Research and Technique* **72** 620-628.

Guo T, Zhang L, Cheng D, Liu T, An L, Li WP & Zhang C 2015 Low-density lipoprotein receptor affects the fertility of female mice. *Reproduction, Fertility and Development* **27** 1222-1232.

Hedrick CC, Castellani LW, Wong H & Lusis AJ 2001 In vivo interactions of apoA-II, apoA-I, and hepatic lipase contributing to HDL structure and antiatherogenic functions. *Journal of Lipid Research* **42** 563-570.

Henn V, Slupsky JR, Grafe M & Anagnostopoulos I 1998 CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* **391** 591-594.

Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard R., Hammer RE & Herz J 1993 Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *Journal of Clinical Investigation* **92** 883-893.

Kanippayoor RL, Alpern JH & Moehring AJ 2013 Protamines and spermatogenesis in *Drosophila* and *Homo sapiens*: a comparative analysis. *Spermatogenesis* **3** e24376.

Keaney JF, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ, et al. 2003. Obesity and systemic oxidative stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **23** 434-439.

Koji T & Hishikawa Y 2003 Germ cell apoptosis and its molecular trigger in mouse testes. *Archives of Histology and Cytology* **66** 1-16.

Krieger MH, Santos KFR, Shishido SM, Wanschel ACBA, Estrela HFG, Santos L, Oliveira MG de, Franchini KG, Sparari-Bratifisch RC & Laurindo FRM 2006 Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide* **14** 12-20.

Li D, Liu L, Chen H, Sawamura T & Mehta JL 2003 LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **23** 816-821.

Libby P 2000 Changing concepts of atherogenesis. *Journal of Internal Medicine* **247** 349-358.

Lima JCC, Correia LCL, Silva AM & Lima DL. Usando proteína C reativa de alta sensibilidade (PCR-AS) como preditor de doença cardiovascular. *NewsLab* 2000 **41** 164-166.

Lusis AJ, Ma R & Pajukanta P 2004 Genetics of atherosclerosis. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **5** 189-218.

Madamanchi NR, Vendrov A & Runge MS 2005 Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **25** 29-38.

Nagata S & Golstein P 1995 The Fas death receptor. *Science* **267** 1449-1456.

Oliveira HC, Cosso RG, Alberici LC, Maciel EN, Salerno AG, Dorigheo GG, Velho JA, Faria EC de & Vercesi AE 2005 Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. *The FASEB Journal* **19** 278-280.

Olusi SO 2002 Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *International Journal of Obesity* **26**(9), 1159-1164.

Padron RS, Mas J, Zamora R, Riverol F, Licea M, Mallea L & Rodriguez J 1989. Lipids and testicular function. *International Urology and Nephrology* **21** 515-519.

Papa S & Skulachev VP 1997 Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. In *Detection of Mitochondrial Diseases*, pp. 305-319. Eds FN Gellerich & S Zierz. Amsterdam: Springer US

Peltola V, Mäntylä E, Huhtaniemi I & Ahotupa M 1994 Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the rat testis after cigarette smoke inhalation or administration of polychlorinated biphenyls or polychlorinated naphthalenes. *Journal of Andrology* **15** 353-361.

Quinn PG & Payne AH 1984 Oxygen-mediated damage of microsomal cytochrome P-450 enzymes in cultured leydig cells. Role in steroidogenic desensitization. *Journal of Biological Chemistry* **259** 4130-4135.

Russell LD, Chiarini-Garcia H, Korsmeyer SJ & Knudson CM 2002 Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biology of Reproduction* **66** 950-958.

Santos EDS, Breyner AJ, Messoria LB, Santos LD, Soares EA, Loyola YCDS, Pereira JEG, Incerpi EK & Garcia JAD 2011 Influência dos níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade na contagem de leucócitos e plaquetas em camundongos dislipidêmicos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, **32** 233-237.

Santos LD 2005 Efeito antiinflamatório da S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) na aterogênese em camundongos [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas

Schönbeck U & Libby P 2001 CD40 signaling and plaque instability. *Circulation Research* **89** 1092-1103.

Schönbeck U, Gerdes N, Varo N, Reynolds RS, Horton DB, Bavendiek U, Robbie L, Ganz P, Kilay S & Libby P. 2002 Oxidized low-density lipoprotein augments and 3-hydroxy-3-

methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors limit CD40 and CD40L expression in human vascular cells. *Circulation* **106** 2888-2893.

Shaha C 2008 Germ cell apoptosis: relevance to infertility and contraception. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry* **8** 66-78.

Silva D & Lacerda AP de 2012 Proteína C reativa de alta sensibilidade como biomarcador de risco na doença coronária. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, **31** 733-745.

Soares EA, Nakagaki WR, Garcia JAD & Camilli JA 2012 Effect of hyperlipidemia on femoral biomechanics and morphology in low-density lipoprotein receptor gene knockout mice. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* **30** 419-425.

Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D & Pardalidis N 2008 Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **109** 323-330.

Theas MS, Rival C, Dietrich SJ, Guazzone VA & Lustig L 2006 Death receptor and mitochondrial pathways are involved in germ cell apoptosis in an experimental model of autoimmune orchitis. *Human Reproduction* **21** 1734-1742.

Van Kooten, C & Banchereau J. 1997 Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Current Opinion in Immunology* **9** 330-337.

Zhou XC, Wei P, Hu ZY, Gao F, Zhou RJ & Liu YX 2001 Role of Fas/FasL genes in azoospermia or oligozoospermia induced by testosterone undecanoate in rhesus monkey. *Acta Pharmacologica Sinica* **22** 1028-1033.

4 CAPÍTULO 2 (ARTIGO 2)

Influência da testosterona exógena na sobre o perfil lipídico, estado oxidativo e morfologia cardíacas em camundongos Ldlr-/-

Influence of exogenous testosterone on the lipid profile, oxidative status and cardiac morphology in mice Ldlr - / -

Testosterona e HVE de camundongos dislipidêmicos

Ariane Borges Figueiredo^{1,2}, José Antônio Dias Garcia^{2,3}

¹ Academics of the PhD and Master's Degree in Reproduction, Health and Animal Welfare, University of José Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas - MG, Brazil.

² Professors of the Federal Institute of South Minas Gerais (IFSULDEMINAS), Machado - MG, Brazil.

³ Professors of the Doctoral and Master's Degree in Reproduction, Health and Animal Welfare, University of José Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas - MG, Brazil.

Palavras-chave: Dislipidemia. Coração. Resistência insulínica. Estresse oxidativo.

Keywords: Lipid profile. Heart. Insulin resistance. Oxidative stress

Enviado para a revista Sociedade Brasileira de Cardiologia – B2

Resumo

Fundamento: Estudos relacionam a diminuição da testosterona plasmática de HDL à síndrome metabólica, diabetes e hipertrofia cardíaca. Além disso, a testosterona endógena reduzida aumenta os fatores de riscos cardiovasculares. Objetivos: Avaliar a influência da testosterona exógena na dislipidemia e na HVE de camundongos Ldlr^{-/-}. Métodos: Os animais foram divididos em quatro grupos (n=10): S - alimentados com dieta padrão (Nuvital®) para roedores; ST - alimentados com dieta padrão para roedores e receberam testosterona (Durasteston® 10mg/kg / semana, via IM); HL - alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico) e HLT - alimentados com dieta hiperlipídica e receberam testosterona (Durasteston® 10mg/kg / semana, via IM). Resultados: Na análise do perfil lipídico, os camundongos HL e HLT apresentaram dislipidemia mista severa quando comparados com os camundongos S e ST. Contudo, os camundongos HLT apresentaram aumento nos níveis séricos de HDL quando comparados com os HL. Os camundongos ST e HLT também apresentaram HVE, caracterizada pelo aumento do diâmetro dos cardiomiócitos, contudo, não apresentaram aumento no depósito de colágeno quando comparados com os camundongos HL. A testosterona preveniu parcialmente o aumento da área imunorreativa para o CD40L (HLT vs HL). A testosterona no grupo HLT preveniu o aumento dos ânions superóxidos na aorta e do índice de Homa (Homair), quando comparados aos camundongos do grupo HL, com redução dos níveis plasmáticos de insulina, sem alterar a glicemia. Em conclusão, a testosterona tem um efeito metabólico e cardíaco benéfico em indivíduos dislipidêmicos e uma atenção quanto aos seus níveis é necessária em pacientes cardiopatas e com diabetes mellitus tipo 2.

Palavras-chave: Perfil lipídico, coração, resistência insulínica e estresse oxidativo.

Introdução

A dislipidemia é um distúrbio nas concentrações do colesterol total, das suas frações e dos triglicérides, assim como reduções nos níveis de colesterol HDL.^{1,2} A dislipidemia está associada à trilogia composta por processo inflamatório, disfunção do endotélio³ e estresse oxidativo⁴. Os indivíduos com dislipidemia têm um risco aumentado de desenvolver diabetes mellitus tipo 2.² A resistência à insulina tem sido associada a níveis baixos de HDL e hipertrigliceridemia, de modo que esses dois marcadores lipídicos plasmáticos relacionados são características da síndrome metabólica, diabetes⁵ e hipertrofia cardíaca.^{6,7}

Estudos mostraram que camundongos dislipidêmicos (Ldlr/-), alimentados com dieta hiperlipídica por 15 dias, apresentaram aterosclerose, aumento de 4,7 e 1,2 vezes nas concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicérides, respectivamente, e aumento do estresse oxidativo na aorta, hipertrofia ventricular esquerda com aumento de 30% no diâmetro dos cardiomiócitos e 35,5% do aumento do colágeno intersticial e perivascular em relação aos camundongos Ldlr/- alimentados com dieta padrão.⁸⁻¹⁰ Além disso, apresentaram redução severa do HDLc e aumento do processo inflamatório cardíaco marcado pelo aumento na área imunorreativa para CD40L.¹⁰

Um estudo mostrou a associação entre níveis baixos de testosterona em homens, obesidade, síndrome metabólica¹¹ e diabetes mellitus tipo 2.^{12,13} A testosterona endógena reduzida correlaciona negativamente com os níveis de colesterol total e LDL colesterol¹⁴ o que aumenta os fatores de riscos cardiovasculares.¹⁵ Além disso, homens com hipogonadismo aumentam a chance de ter hipercolesterolemia¹⁶. Alguns autores¹⁷ sugeriram que a testosterona diminui os níveis de HDL por intensificar o transporte reverso do colesterol, permitindo assim que o HDL remova o excesso de colesterol da parede arterial facilitando o transporte para o fígado para eliminação, o que leva a um aumento do catabolismo. Contudo,

o estudo de Saad¹⁸ demonstrou correlação positiva entre os níveis de testosterona e de HDL colesterol em estudos transversais de homens saudáveis e aqueles com diabetes mellitus tipo 2. O presente estudo foi designado para avaliar a influência da testosterona exógena na dislipidemia e na hipertrofia ventricular esquerda de camundongos dislipidêmicos.

Material e Métodos

Foram utilizados camundongos homozigotos para a ausência (knockout) do gene receptor de LDL (Ldlr^{-/-}), gerado a partir do background C57BL6, machos com 3 meses de idade e peso de 21 ± 3 gramas. Os camundongos foram provenientes do biotério da Universidade José do Rosário Vellano (Alfenas, MG, Brasil) Todos os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12 horas) e foram submetidos ao protocolo experimental por 60 dias. O uso de animais e o protocolo experimental foram encaminhados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) IFSULDEMINAS - Parecer N°: 05A/ 2014.

Os camundongos Ldlr^{-/-} foram divididos em quatro grupos (n=10):

- S: animais alimentados com dieta padrão (Nuvital®) para roedores e sem aplicação de testosterona.
- ST: animais alimentados com dieta padrão (Nuvital®) para roedores e com aplicação de testosterona.
- HL: animais alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cálcico) e sem aplicação de testosterona.
- HLT: animais alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cálcico) e com aplicação de testosterona.

O grupo de camundongos tratados com testosterona, receberam Durasteston® 10mg/kg/semana, via intramuscular (princípio ativo: propionato de testosterona 30mg;

fempropionato de testosterona 60mg; isocaproato de testosterona 60 mg; decanoato de testosterona 100mg).

Após 60 dias de experimento, todos os camundongos permaneceram por jejum de 8 horas, foram pesados e, em seguida, anestesiados por via intraperitoneal (IP) utilizando-se Xilazina / Ketamina (Bayer AS® e Parke-Davis®) nas doses de 9 e 90 mg/Kg, respectivamente. Após o experimento, o sangue foi coletado por punção do plexo venoso retro-orbital para as determinações séricas de glicose, insulina, triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL.

Após a toracotomia, a aorta torácica e o coração foram removidos. Os níveis de ânion superóxido foram avaliados em homogenados de aorta torácica utilizando-se quimioluminescência de lucigenina (5 mmol / L), conforme descrito por Laurindo et al.¹⁹. Os resultados são relatados como contagens por minuto (cpm) / mg de proteína, quantificadas pelo método de Bradford. Os átrios e a parede do ventrículo direito foram descartados e o ventrículo esquerdo pesado para calcular a razão peso ventricular (mg)/peso do camundongo (g), para determinar a hipertrofia ventricular. Após a pesagem os ventrículos esquerdos foram para a análise histológica.

A determinação da concentração de glicose circulante foi realizada pelo método enzimático colorimétrico, utilizando o kit glicose PAP Liquiform da Labtest Diagnóstica^{20,21}. O nível plasmático da insulina foi mensurado com o kit comercial ELISA específico (DAKO Ltd, High Wycombe, Bucks, UK). O índice de Homa (Homair) foi calculado pela fórmula: {Homair = insulinemia de jejum [mU/L] × glicemia em jejum [mmol/L]/22,5}, para determinar a resistência à insulina.

A triglicerolemia foi determinada pelo método enzimático colorimétrico que utiliza quatro enzimas, conforme o kit triacilgliceróis GPO-ANA da Labtest.

A colesterolemia foi determinada pelo método enzimático, conforme kit colesterol Liquiform da Labtest, utilizando-se associação da reação de oxidação catalisada pela colesterol oxidase,

após hidrólise dos ésteres de colesterol, com leitura de absorvância em 500 nm²⁰. As amostras foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante do kit, e após a leitura da absorvância em 500 nm, foi calculada a concentração de colesterol em mg/dL.

Foi utilizado o sistema enzimático do kit colesterol HDL da Labtest para precipitação das lipoproteínas de baixa e de alta densidade (LDL e VLDL) e determinação do colesterol HDL no sobrenadante após centrifugação.^{21,22}

Os valores das concentrações do colesterol VLDL foram obtidos pela divisão dos valores de triglicérides por 5 e os valores do colesterol LDL pela subtração de colesterol HDL e VLDL do colesterol total.²³

Os ventrículos esquerdos destinados para a análise histológica foram fixados por 24 horas em formalina a 10%. Em seguida, foram incluídos em parafina para cortes histológicos de quatro micrômetros de espessura.²⁴

Cortes histológicos foram corados com *picrossírius red* e com hematoxilina/ eosina para análise quantitativa do colágeno, análise morfométrica dos cardiomiócitos e área da placa de ateroma. Foram obtidas quatro fotomicrografias (200x), a partir de um mesmo ponto pré-fixado dos cortes transversais do ventrículo de cada camundongo, utilizando-se a câmera digital acoplada ao programa Leica IM50 (versão 1.20). Foram medidos os diâmetros de 8 a 12 cardiomiócitos de cada corte histológicos, totalizando 8 cortes histológicos em cada animal.

Os cortes corados com *picrossírius red* foram analisados com luz polarizada. Cada fotomicrografia foi analisada pelo *software* LGMC-image versão 1.0, por meio do qual serão adquiridas as porcentagens fracionais de colágeno referentes às áreas marcadas em vermelho pelo *picrossírius red*.⁹

Os cortes histológicos para imunoistoquímica dos ventrículos foram tratados com peróxido de hidrogênio a 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 anticorpo policlonal produzido em coelho anti-CD40L (Santa Cruz® 1:50) em câmara úmida. Após a incubação com o anticorpo primário, foi feita a incubação com anticorpo secundário biotilado (kit Dako® LSAB+), durante uma hora a 37 °C. Para evidenciar as áreas imunorreativas, os cortes foram incubados com o complexo conjugado com peroxidase (Dako® LSAB+), durante 45 minutos a 37 °C e colocados em solução de cromógeno (50 mg de DAB em 50 ml de PBS com 3 ml de água oxigenada 10%) por três minutos. Após contracoloração com hematoxilina de Harris (Sigma®) por 25 segundos, as lâminas foram montadas e analisadas em microscópio óptico. As fotomicrografias foram analisadas pelo software LGMC-image versão 1.0 e as porcentagens fracionais da área imunorreativa para o CD40L do miocárdio foram adquiridas.²⁵ Todas as análises histológicas deste estudo foram executadas por um único examinador, utilizando o método duplo cego.

As determinações séricas foram expressas como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey, foi utilizada para comparar as médias entre diferentes grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$.

Resultados

Durante o experimento, observou-se que todos os camundongos ganharam peso e consumiram alimentos sólidos (ingestão média de sólidos (g) dos grupos S, ST, HL e HLT, $5,8 \pm 0,40$; $6,2 \pm 0,30$; $6,0 \pm 0,30$; $6,2 \pm 0,20$, respectivamente) e água (ingestão média de água mL dos grupos S, ST, HL e HLT, $6,1 \pm 0,08$; $6,2 \pm 0,10$; $6,2 \pm 0,10$; $6,3 \pm 0,12$, respectivamente) suficientes para fornecer a energia e a hidratação necessárias para a manutenção do metabolismo e suas atividades diárias, não apresentando diferenças quanto a ingestão de água

e ração (sólidos) entre os grupos estudados. Quanto ao peso dos animais (em gramas= g), os camundongos dos grupos que receberam administração de testosterona (ST e HLT) ganharam mais peso que os demais grupos $24,8 \pm 0,4$ e $27,1 \pm 0,4$, respectivamente. Contudo, os camundongos do grupo HL ganharam mais peso que os animais do grupo S $26,9 \pm 0,5$ e $22,5 \pm 0,4$ respectivamente.

Na análise do perfil lipídico, os camundongos que receberam dietas hiperlipídica (HL e HLT) apresentaram dislipidemia mista severa com aumento dos níveis séricos do colesterol total, LDL, VLDL e triglicérides quando comparados com os camundongos dos grupos S e ST. Contudo, os camundongos dos grupos HLT não apresentaram redução nos níveis séricos de HDLc quando comparados com os camundongos do grupo HL. Os camundongos do grupo S e ST não apresentaram redução dos níveis séricos de HDLc em relação aos demais grupos estudados (tabela 1).

Tabela 1 - Efeitos dos tratamentos com testosterona nos triglicerídeos séricos, frações de colesterol, glicose, insulina e Homa-ir em camundongos LDLr +/- alimentados com dieta padrão e hiperlipídica.

	S	ST	HL	HLT
TC (mg/dL)	260±11	244±7 ^{c,d}	884±24 ^{a,b}	830±17 ^{a,b}
LDLc (mg/dL)	171±10	159±6,4 ^{c,d}	813±24,9 ^{a,b}	746±1 ^{a,b}
VLDLc (mg/dL)	29±1,8	28±1,1 ^{c,d}	48±3,1 ^{a,b}	46±2,9 ^{a,b}
HDLc (mg/dL)	59±1,8	58±1,1 ^{c,d}	22±1,1 ^{a,b,d}	38±1,4 ^{a,b,c}
TG (mg/dL)	145±8,8	137±61 ^{c,d}	242±15,5 ^{a,b}	229±14,4 ^{a,b}
Glucose (mmol/L)	5,5±0,2	5,4±0,3 ^{c,d}	5,6±0,1	5,6±0,2
Insulin (mU/mL)	2,6±0,1	2,7±0,3 ^{c,d}	5,7±0,8 ^{a,b,d}	3,9±0,5 ^{a,b,c}
Homa-ir	0,7 ± 0,06	0,7 ± 0,05 ^{c,d}	1,4 ± 0,20 ^{a,b,d}	1,0 ± 0,02 ^{a,b,c}

Values are expressed as mean±SEM. S: control group; ST: standard diet-fed group treated with testosterone; HL: hyperlipidic diet-fed group; HLT: hyperlipidic diet-fed group treated with testosterone; TC: total cholesterol; TG: triacylglycerol. n=7 in each group. a P<0.05 vs S; b P<0.05 vs ST; c P<0.05 vs HL; d P<0.05 vs HLT.

Na avaliação dos parâmetros morfológicos e morfométricos do ventrículo esquerdo os camundongos do grupo HL apresentaram HVE com aumento em todos os parâmetros morfológicos e morfométricos estudados, assim como a expressão do CD40L, quando comparados aos camundongos do grupo S. Os camundongos que receberam testosterona (ST e HLT) também apresentaram hipertrofia ventricular esquerda (HVE), porém, esta foi caracterizada pelo aumento do diâmetro dos cardiomiócitos (Figura 1 e tabela 2), contudo, não apresentaram aumento no depósito de colágeno quando comparados com os camundongos do grupo HL (tabela 2). A testosterona preveniu o aumento da área imunorreativa para o CD40L no grupo HLT.

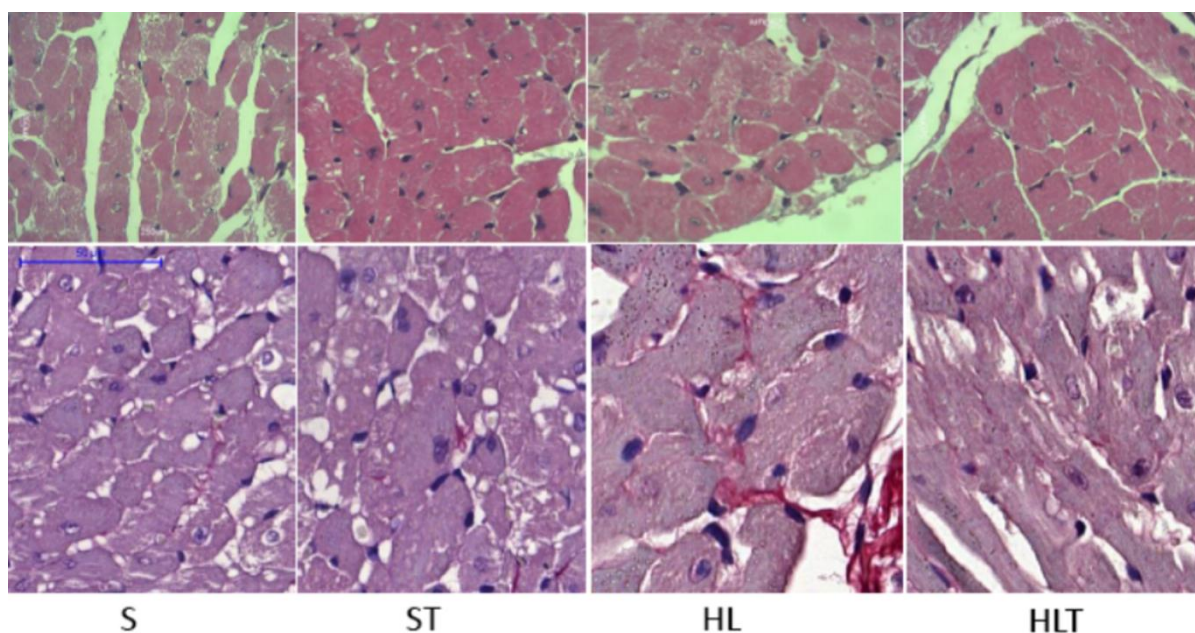


Figura 1 - Corte histológico do ventrículo esquerdo de camundongos: no painel superior (coloração HE), mostrando a diferença entre os diâmetros dos cardiomiócitos; no painel inferior (coloração picrosírius red, mostrando depósito de colágeno em vermelho no meio intersticial do tecido muscular cardíaco). **S:** animais alimentados com dieta padrão (Nuvital®) para roedores e sem aplicação de testosterona. **ST:** animais alimentados com dieta padrão (Nuvital®) para roedores e com aplicação de testosterona. **HL:** animais alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cílico) e sem aplicação de testosterona. **HLT:** animais alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cílico) e com aplicação de testosterona.

A dislipidemia severa observada nos camundongos HL gerou um maior estresse oxidativo (evidenciado pelo aumento dos ânions superóxidos na aorta) associado a resistência insulínica com aumento dos níveis de insulina e do HOMAir, quando comparados ao grupo S (tabela 2).

A administração de testosterona nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (grupo HLT) preveniu o aumento dos níveis plasmáticos de insulina e consequentemente do índice de Homa ($Homa_{ir}$), sem alterar, contudo, a glicemia (tabela 1) e redução da produção de ânions superóxidos (tabela 2). Os camundongos do grupo ST não apresentaram diferenças entre os níveis plasmáticos de glicose, insulina, $HOMA_{ir}$ (tabela 1) e ânions superóxidos quando comparados com os do grupo S (tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros da aorta e do ventrículo esquerdo (VE)

	S	ST	HL	HLT
<u>Aorta</u>				
Superoxide anion (cpm x 10^6 /mg protein)	6.7±1.3	6.1±1.1	14.1±1.4 ^{a,b,d}	6.9±1.5
<u>LV</u>				
Cardiomyocytes diameter (µm)	19±0.5	24±0.7 ^{a,d}	25±0.5 ^a	27±0.6 ^{a,b}
Collagen (%)	5.2±0.3	5.6±0.3 ^c	10.3±0.5 ^{a,b,d}	6.6±0.3 ^c
LV weight (mg)/body weight (g)	3.5±0.08	4.0±0.07 ^{a,c,d}	4.5±0.04 ^{a,b}	4.6±0.06 ^{a,b}
CD40L (%)	3.2 ± 0.3	3.1 ± 0.3 ^{c,d}	7.9 ± 0.3 ^{a,b,d}	5.1 ± 0.2 ^{a,b,c}

Values are expressed as mean±SEM. S: control group; ST: standard diet-fed group treated with testosterone; HL: hyperlipidic diet-fed group; HLT: hyperlipidic diet-fed group treated with testosterone. n=7 in each group. a P<0.05 vs S; b P<0.05 vs ST; c P<0.05 vs HL; d P<0.05 vs HLT.

Discussão

No presente estudo, observou-se que camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica (grupo HL) apresentaram uma dislipidemia mista severa com aumento do CT e TG e declínio acentuado nos níveis plasmáticos de HDL. Essa dislipidemia está associada a aumentos no estresse oxidativo da aorta e processo inflamatório cardíaco quando comparados com animais do grupo S. O HDL possui um importante papel como molécula protetora contra inflamação e estresse oxidativo.^{10,26} Acreditamos que a diminuição plasmática de HDL associada ao

estresse oxidativo (caracterizado pelo aumento do superóxido) e ao processo inflamatório (caracterizado pelo aumento na expressão de CD40L) leva a diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico, com consequente desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda nos camundongos HL. Além disso, a resistência insulínica, associada a hiperinsulinemia, decorrente dos distúrbios metabólicos dos lipídeos²⁷ colabora para a ativação de vias hipertróficas ventriculares, o que também pode explicar as alterações dos camundongos HL observadas neste estudo.

A administração de testosterona nos camundongos do grupo ST induziu a HVE representada por aumento de diâmetros de cardiomiócitos, com provável efeito deste hormônio em seus receptores específicos, sem interferir no depósito de colágeno, quando comparados com o grupo S. Esta hipertrofia de cardiomiócitos também foi observada em culturas de miócitos tratados com testosterona mediada por um receptor específico de andrógeno.²⁸ Estudo de Barquilha²⁹ também mostraram que a testosterona pode modificar a atividade (PPARs) receptor ativado por proliferador de peroxissoma, causando a hipertrofia de cardiomiócitos. Os camundongos HLT que tiveram a testosterona associada à dislipidemia, também apresentaram hipertrofia ventricular esquerda, porém, com menor depósito de colágeno e prevenção parcial na diminuição dos níveis de HDL, quando comparados com o grupo HL. Autores³⁰ demonstraram aumento dos níveis de HDL após injeções endovenosa de testosterona, e Nordoy³¹ mostrou que há uma associação positiva entre níveis de testosterona e HDL, como observado no presente estudo. O efeito anti-inflamatório e antioxidante do HDL nos camundongos HLT preveniu o processo inflamatório, o estresse oxidativo e melhorou a resistência insulínica, prevenindo parcialmente o aumento dos níveis séricos da insulina. A terapia de reposição de melhora o modelo homeostático de resistência à insulina e hemoglobina A1c em diabéticos.³² Acreditamos que a fibrose observada na hipertrofia no grupo HL tenha relação com a hiperinsulinemia e, portanto, tem características diferentes da

hipertrofia observada no grupo HLT que se apresenta com menor fibrose, porém, com uma tendência a um maior diâmetro de cardiomiócitos. Contudo, as vias desses diferentes tipos de hipertrofia necessitam ser investigadas.

Os camundongos S e ST não tiveram variação nos valores de insulina, comparados aos camundongos HL e HLT. A hiperinsulinemia observada nos camundongos HL foi associada a resistência insulínica desencadeada pela dislipidemia mista severa, contudo a testosterona nos camundongos do grupo HLT preveniu parcialmente a hiperinsulinemia. Esse resultado no nosso estudo corroboram com a metanálise de Ding¹³, que verificou que homens com maiores níveis de testosterona tinham um risco 42% menor de diabetes melito tipo 2 e prevenção parcial da hiperinsulinemia, do processo inflamatório cardíaco, da resistência insulínica, além de prevenção total do estresse oxidativo da aorta. Portanto, a obesidade está frequentemente associada à hiperlipidemia e diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), duas condições intimamente relacionadas a doenças cardiovasculares³³, merecem uma atenção quanto aos níveis de testosterona dos seus pacientes.

Níveis baixos de testosterona endógena biodisponível demonstraram estar associados a taxas mais elevadas de mortalidade, todas relacionadas a causas cardiovasculares.³⁴ Sá³⁵ demonstrou que a testosterona endógena exerce um efeito neutro e/ou benéfico no sistema cardiovascular (SCV) masculino. Já Whitsel³⁶, demonstrou que a administração de testosterona exógena (intramuscular) esteve relacionada à redução dos valores do HDL, o que contrapõe os achados no nosso estudo (grupo HLT). No estudo de Haring³⁷, as baixas concentrações totais de testosterona estão prospectivamente associadas a um perfil lipídico adverso e aumento do risco de dislipidemia incidente. Essas descobertas são particularmente interessantes e podem contribuir para explicar o maior risco de doença cardiovascular em homens com menores concentrações totais de testosterona.³⁸

Vários estudos demonstraram que a HVE aumenta o risco de doença cardíaca coronária (redução da reserva de fluxo coronário), insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral, isquemia cerebral transitória, mortalidade total e morte súbita.³⁹ A dieta hiperlipídica pode levar à obesidade, por sua vez está associada com o aumento da mortalidade cardiovascular. O perfil hemodinâmico do paciente hipertenso obeso é o de expansão de volume de sangue e aumento da pré-carga e da massa ventricular esquerda. O aspecto anômico predominante mais frequente, nessa situação, é o de hipertrofia ventricular do tipo excêntrico.⁴⁰

O CD40L é uma proteína transmembrana que exerce um efeito pró-oxidante e, no miocárdio dos camundongos dos grupos HL e HLT, foram encontrados níveis maiores que nos grupos S e ST. A sua interação com seu receptor CD40 inicia a resposta inflamatória, que induz a resistência insulínica, favorecendo a síndrome coronariana aguda⁴¹, a ativação da via NFkappa b7 e a fosforilação do (IKK) inibidor Kappa b quinase, ativando genes envolvidos na inflamação e na hipertrofia cardíaca.⁴²

O estudo de Christison⁴³ demonstrou que a hiperlipidemia grave pode ser considerada o fator metabólico indutor do maior estresse oxidativo hepático em ratos. No presente estudo, observou estresse oxidativo na aorta, no sistema cardiovascular, aumentando a peroxidação lipídica da molécula de HDL e, conseqüentemente, a sua remoção hepática, com diminuição dos níveis plasmáticos do HDL e da sua função cardiovascular protetora antioxidante e anti-inflamatória, favorecendo o processo inflamatório cardiovascular e a resistência insulínica nos camundongos do grupo HL, o que também pode ser confirmado neste estudo, no qual o índice de LDL do grupo HL foi maior, comparado ao grupo HLT. Todavia, os níveis de HDL são menores no grupo HL, comparados ao grupo HLT, sugerindo um efeito terapêutico benéfico da testosterona exógena, associada a uma dieta hiperlipídica.

Em conclusão, a testosterona exógena teve um efeito metabólico e cardíaco benéfico nos camundongos dislipidêmicos. Mais investigações nesse sentido, e também das vias pelas quais as alterações fenotípicas mediadas pela testosterona acontecem, necessitam serem implementadas.

Agradecimentos

A Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS) – Alfenas, MG.

Ao Instituto Federal do Sul de Minas Gerais – Campus Machado. Machado, MG.

Referências

1. Fagherazzi S, Dias R da L, Bortolon F. Impacto do exercício físico isolado e combinado com dieta sobre os níveis séricos de HDL, LDL, colesterol total e triglicerídeos. *Rev Bras Med Esporte*. 2008; 14(4): 381-6.
2. Li, H, Gan W, Lu L, Dong X, Han X, Hu C, et al. A genome-wide association study identifies GRK5 and RASGRP1 as type 2 diabetes loci in Chinese Hans. *Diabetes*. 2013; 62(1): 291-8.
3. Araújo AB, Dixon JM, Suarez EA, Murad MH, Guey LT, Witter GA. Endogenous testosterone and mortality in men: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96(10): 3007-19.
4. Haring R, Baumeister SE, Völzke H, Dörr M, Felix SB, Kroemer HK, et al. Prospective association of low total testosterone concentrations with an adverse lipid profile and increased incident dyslipidemia. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2011; 18(1): 86-96.
5. Dhindsa S, Prabhakar S, Sethi M, Bandyopadhyay A, Chaudhuri A, Dandona P. Frequent occurrence of hypogonadotropic hypogonadism in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(11): 5462-8.
6. Genda S, Miura T, Miki T, Ichikawa Y, Shimamoto K. K(ATP) channel opening is an endogenous mechanism of protection against the no-reflow phenomenon but its function is compromised by hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 40(7): 1339-46.
7. Lee, T.-M., Lin MS, Chou TF, Tsai CH, Chang NC. Effect of pravastatin on left ventricular mass by activation of myocardial K ATP channels in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*. 2004; 176(2): 273-78.
8. Krieger MH, Santos KF, Shishido SM, Wanschel AC, Estrela HF, Santos L, et al. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide*. 2006; 14(1): 12-20.
9. Garcia JAD, Incerpi EK. Fatores e mecanismos envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda e o papel anti-hipertrófico do óxido nítrico. *Arq Bras Cardiol*. 2008; 90(6): 443-50.

10. Garcia JAD, Lima CC, Messoria LB, Cruz AF, Marques AP, Simão TP, et al. Efeito anti-inflamatório da lipoproteína de alta densidade no sistema cardiovascular de camundongos hiperlipidêmicos. *Rev Port Cardiol*. 2011; 30(10): 763-9.
11. Wang C, Jackson G, Jones TH, Matsumoto AM, Nehra A, Perelman MA, et al. Low testosterone associated with obesity and the metabolic syndrome contributes to sexual dysfunction and cardiovascular disease risk in men with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2011; 34(7): 1669-75.
12. Kapoor D, Goodwin E, Channer KS, Jones TH. Testosterone replacement therapy improves insulin resistance, glycaemic control, visceral adiposity and hypercholesterolaemia in hypogonadal men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol*. 2006; 154(6): 899-906.
13. Ding EL, Song Y, Malik VS, Liu S. Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Jama*. 2006; 295(11): 1288-99.
14. Barud W, Palusinsk R, Beltowski J, Wójcicka G. Inverse relationship between total testosterone and anti-oxidized low density lipoprotein antibody levels in ageing males. *Atherosclerosis*. 2002; 164(2): 283-8.
15. Simon A, Chironi G, Levenson J. Performance of subclinical arterial disease detection as a screening test for coronary heart disease. *Hypertension*. 2006; 48(3): 392-6.
16. Isidori AM, Giannetta E, Greco EA, Gianfrilli D, Bonifacio V, Isidori A, et al. Effects of testosterone on body composition, bone metabolism and serum lipid profile in middle-aged men: a meta-analysis. *Clin Endocrinol*. 2005; 63(3): 280-93.
17. Langer C, Gansz B, Goepfert C, Engel T, Uehara Y, von Dehn G, et al. Testosterone up-regulates scavenger receptor BI and stimulates cholesterol efflux from macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 296(5): 1051-7.
18. Saad F. O papel da testosterona no diabetes melito tipo 2 e síndrome metabólica em homens. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009; 53(8): 901-7.
19. Laurindo FRM, Souza HP, Pedro MP, Janiszewski M. Redox aspects of vascular response to injury. *Methods Enzymol*. 2002; 352: 432–54.

20. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem.* 1969; 6(1): 24-7.
21. Sacks DA. On methods and materials. *Diabetes Care* 2002; 25(5): 939-40.
22. Warnick GR, Nauck M, Rifai N. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays. *Clin Chem.* 2001; 47(9): 1579-96.
23. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18(6): 499-502.
24. Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia básica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
25. Armstrong AT, Binkley PF, Baker PB, Myerowitz PD, Leier CV. Quantitative investigation of cardiomyocyte hypertrophy and myocardial fibrosis over 6 years after cardiac transplantation. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 32(3): 704-10.
26. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res.* 2004; 95(8): 764-72.
27. Okoshi K, Guimarães JFC, Di Muzio BP, Fernandes AAH, Okoshi MP. Diabetic cardiomyopathy. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007; 51(2): 160-7.
28. Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, et al. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res.* 2000; 86(2): e29-e35.
29. Barquilha G. Uma análise da incidência de efeitos colaterais em usuários de esteróides anabolizantes praticantes de musculação da cidade de Bauru. *RBPFX.* 2011; 3(14): 146-53.
30. Shapiro J, Christiana J, Frishman WH. Testosterone and other anabolic steroids as cardiovascular drugs. *Am J Ther.* 1999; 6(3): 167-74.
31. Nordoy A, Aakvaag A, Thelle D. Sex hormones and high density lipoproteins in healthy males. *Atherosclerosis.* 1979; 34(4): 431-6.

32. Corona G, Monami M, Rastrelli G, Aversa A, Sforza A, Lenzi A, et al. Type 2 diabetes mellitus and testosterone: a meta-analysis study. *Int J Androl*. 2011; 34(6): 528-40.
33. Stunkard AJ. Factores determinantes de la obesidad: opinión actual. In: Peña M, Bacallao J, editores. *La obesidad en la pobreza: un nuevo reto para la salud pública*. Washington: OPAS; 2000. p. 27-32.
34. Menke A, Guallar E, Rohrmann S, Nelson WG, Rifai N, Kanarek N, et al. Sex steroid hormone concentrations and risk of death in US men. *Am J Epidemiol*. 2010; 171(5): 583-92.
35. Sá EQC de, Sá FCF de, Guedes AD, Verreschi IT do N. Testosterona sérica e doença cardiovascular em homens. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009; 53(8): 915-22.
36. Whitsel EA, Boyko EJ, Matsumoto AM, Anawalt BD, Siscovick DS. Intramuscular testosterone esters and plasma lipids in hypogonadal men: a meta-analysis. *Am J Med*. 2001; 111(4): 261-9.
37. Haring R, Völzke H, Spielhagen C, Nauck M, Wallaschofski H. The role of sex hormone-binding globulin and testosterone in the risk of incident metabolic syndrome. *Eur J Prev Cardiol*. 2013; 20(6): 1061-8.
38. Malkin CJ, Pugh PJ, Morris PD, Asif S, Jones TH, Channer KS. Low serum testosterone and increased mortality in men with coronary heart disease. *Heart*. 2010; 96(22): 1821-5.
39. Liebson E. Anosognosia and mania associated with right thalamic haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000; 68(1): 107-8.
40. Samesina N, Amodeo C. Hipertrofia ventricular esquerda. *Rev Bras Hipert*. 2001; 8(2): 316-20.
41. Vishnevetsky D, Kiyanista VA, Gandhi PJ. CD40 ligand: a novel target in the fight against cardiovascular disease. *Ann Pharmacother*. 2004; 38(9): 1500-8.
42. Vellaichamy E, Sommana NK, Pandey KN. Reduced GMP signaling activates NF- κ B in hypertrophied hearts of mice lacking natriuretic peptide receptor-A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 327(1): 106-11.

43. Christison J, Karjalainen A, Brauman J, Bygrave F, Stocker R. Rapid reduction and removal of HDL-but not LDL-associated cholesteryl ester hydroperoxides by rat liver perfused in situ. *Biochem J.* 1996; 314(3): 739-42.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dieta hiperlipídica intensifica as disfunções morfofuncionais testiculares e cardíacas observadas nos animais com deleção do receptor de LDL e induz estresse oxidativo, inflamação e apoptose, prejudicando a espermatogênese e a esteroidogênese testicular. A testosterona teve efeito protetor cardíaco nesses animais dislipidêmicos.