

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Validação da predição de um modelo para indução da aterosclerose e comprometimento hepato-renal em ratas Wistar

LUCAS PIRES GUARNIER

**Dourados - MS
2020**

LUCAS PIRES GUARNIER

Validação da predição de um modelo para indução da aterosclerose e comprometimento hepato-renal em ratas Wistar

Área do CNPq: Farmacologia Cardiorenal (2.10.04.00-5)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior

Dourados - MS
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

G916v Guarnier, Lucas Pires

Validação da predição de um modelo para indução da aterosclerose e comprometimento hepato-renal em ratas Wistar [recurso eletrônico] / Lucas Pires Guarnier. -- 2019.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Arquimedes Gasparotto Junior.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2020.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Aterogênese. 2. Dislipidemia. 3. Esteatose Hepática. 4. Ensaio pré-clínico. 5. DCV. I. Gasparotto Junior, Arquimedes. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



UFGD

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR LUCAS PIRES GUARNIER, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA".

Ao décimo oitavo dia do mês de fevereiro do ano de 2020, às 08 horas, em sessão pública, realizou-se, no(a) Auditório da Faculdade de Ciências da Saúde – FCS, Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD II, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "Validação da predição de um modelo para indução da aterosclerose e comprometimento hepato-renal em ratos Wistar fêmeas." apresentada pelo(a) mestrando(a) **LUCAS PIRES GUARNIER**, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos(as) professores(as) Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior (Presidente/orientador(a)), Dr.^a Kely de Picoli Souza/UFGD (membro titular), Dr.^a Francislaine Aparecida dos Reis Lívero/UNIPAR (membro titular). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer ao(à) candidato(a) e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após o(a) candidato(a) ter apresentado a sua Dissertação, no tempo previsto de 20 até 30 minutos, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do(a) candidato(a), no tempo previsto de até 240 minutos. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido o(a) candidato(a) considerado(a) Aprovado, fazendo *jus* ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 18 de fevereiro de 2020.

Dr. Arquimedes Gasparotto Junior _____

Dr.^a Kely de Picoli Souza _____

Dr.^a Francislaine Aparecida dos Reis Lívero _____

ATA HOMOLOGADA EM: ___/___/___, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram para sua realização, a meus pais, meu irmão, e meus avós, que Deus os tenha.

AGRADECIMENTOS

No caminho rumo ao sucesso, aquele que caminha sozinho, nunca chega ao seu destino. No decorrer da minha caminhada, anjos, soldados, pessoas estiveram ao meu lado, me incentivando, me dando forças, sempre me apoiando rumo a minha vitória.

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por sempre iluminar o meu caminho, pelas portas e janelas que foram abertas durante toda a minha caminhada, não só acadêmica, mas por toda a minha vida.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para que eu chegasse aonde cheguei, que sempre estiveram do meu lado, não só neste momento, mas por toda minha vida, sempre me fornecendo compreensão e apoio em todos os momentos da minha vida. E o mais importante, agradeço por todo o tempo e confiança em mim depositados.

Agradeço a minha mãe, por todo o apoio, pelo conforto, pelo colo nas horas mais difíceis, por ser aquela a responsável pelo meu caráter, pela minha educação, pelo meu sucesso e por cada vitória que já obtive. Por saber sempre a hora certa de me ligar, por perceber meu desânimo simplesmente pelo tom da minha voz, por ser o meu maior porto seguro.

A meu pai, que sempre acreditou em mim, e me ensinou a ser um ser humano íntegro, honesto, humilde e esforçado, me ensinou a correr atrás dos meus sonhos e nunca desistir, a olhar sempre para frente sempre sendo meu exemplo de vida. O homem que eu me tornei é graças a ele, que sempre foi e sempre vai ser meu maior exemplo de vida, meu maior exemplo de homem, de ser humano.

Agradeço a meu irmão, pelo apoio constante, pela parceria e por sempre acreditar no caminho que escolhi. Pelas vezes que intercedeu em minha defesa,

por ser na maioria das vezes um amigo, que eu nunca achei que fosse ter. Meu maior incentivador, e como eu sempre digo, meu maior presente de Deus.

Agradeço a minha noiva Aniely Oliveira, pela paciência, pela compreensão, por estar comigo durante todo o processo, sempre me apoiando, me incentivando, sendo meu maior apoio nas horas mais difíceis, e por compartilhar dos melhores momentos, dor piores também. Ela que em todos os momentos, mesmo longe, sempre foi meu maior conforto, minha fonte de alegria, meu pedaço do futuro. Tudo que fazemos é por um futuro incerto, tudo o que fazemos é por um futuro que queremos, não pelo futuro que realmente vai ser... Essa mulher sempre foi um pedaço do meu futuro certo, por isso, obrigado por simplesmente estar aqui.

Aos amigos que o laboratório me deu, Paulo, Bethânia, Aline, Maysa, Fran, Gustavo e Cleide, foram essenciais nestes últimos dois anos, foram meus parceiros em todos os momentos, mas principalmente nos momentos mais difíceis, nossos laços foram forjados no ódio e na cerveja. Agradeço por toda paciência do mundo no desenvolver dos experimentos, nas diureses, no preparo da ração, nos tratamentos, e principalmente na minha falta de organização. Agradeço por toda parceria, por cada momento que passamos juntos. Sem vocês, com certeza esses últimos dois anos não teriam valido a pena.

Agradeço a toda equipe do LeFAC, mestrandos, doutorandos e alunos de iniciação científica. Vocês com certeza foram essenciais para a realização não só desse trabalho, mas pela convivência harmônica. Agradeço principalmente ao Rhanany, que muitas vezes foi um apoio muito importante, e me ajudou muito não só na parte intelectual e prática, mas sempre me deu conselhos, e foi como um tutor, principalmente nos passos iniciais.

Agradeço imensamente ao meu orientador, que mesmo me conhecendo pouco, colocou fé em mim, e me deu essa oportunidade de ouro, de estagiar e ingressar no mestrado no Laboratório de Eletrofisiologia e Farmacologia

Cardiovascular, foram dois anos de muito aprendizado e muito amadurecimento, que me proporcionaram além de conhecimento, a capacidade de lidar com as mais diversas situações, contribuindo muito para minha formação não só profissional, mas como ser humano.

Aos meus amigos da graduação, Amanda, Caio, Bianca, Dandrea e Alex, por todo o apoio, por todos os conselhos e por toda a parceria ao longo desses últimos 6 anos... Sempre me falaram que as amizades que fazemos na faculdade são diferentes, tendem a ser mais sólidas e verdadeiras, e vocês são a principal prova disso, que nossa amizade vá ainda mais além.

Ao meu quase irmão Otavio, cuja amizade já vem desde a graduação, dividiu esses últimos dois anos comigo, obrigado pela presença, pelos conselhos, e principalmente pelos momentos de descontração. Quero levar sua amizade pra vida toda. E claro, agradeço você também por ter colocado o Zorro na minha vida. Esse serzinho que foi simplesmente essencial para que eu encarasse esses dois anos de mestrado, ele que com tão pouco tempo de convívio, me cativou e me confortou de um tanto que eu não sei como descrever. Agradeço então esse pedacinho de gente, por todo amor que me deu, por cada mordida e principalmente por cada lambida.

Agradeço aos membros da banca presente na defesa, por terem aceito o convite, e contribuírem de certa forma para minha formação e meu crescimento. A professora Kely de Picoli, que foi essencial para minhas escolhas acadêmicas, uma das se não a melhor professora que tive durante a graduação, fez e ainda faz parte da minha formação tanto profissional como pessoal. A professora Francislaine que tem sido uma mãe científica, uma amiga e meu maior exemplo de profissional e pessoa. Ao professor Marcio, pelas aulas durante a pós, pelas correções na qualificação e pelo exemplo de profissional. A Cleide, por todo conhecimento que passou para mim ao longo desses dois anos e meio, pelo apoio e pelas conversas.

Um agradecimento em especial ao meu avô que se foi recentemente. Vô o senhor foi um exemplo de paciência e força, agradeço por esses últimos dez anos de companhia, de luta e principalmente de amor.

Agraço a Universidade Federal da Grande Dourados por me abrigar pelos últimos seis anos (graduação e pós-graduação), e também aos órgãos de fomento (Fundect, CNPq e Capes) por todo financiamento que me permitiram realizar minha pesquisa e me manter até o fim desses ciclos.

Enfim agradeço de toda forma a todos aqueles que de certa forma contribuíram para que eu chegasse onde cheguei, para que eu obtivesse minhas vitórias e minhas conquistas, aos meus demais familiares e amigos.

EPÍGRAFE

“Transmita o que aprendeu. Força, mestria. Mas fraqueza, insensatez, fracasso também. Sim, fracasso acima de tudo. O maior professor, o fracasso é. Luke, nós somos o que eles crescem além. Esse é o verdadeiro fardo de todos os mestres.”

(MESTRE YODA)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismos imunológicos de formação das placas de ateroma	21
Figura 2 – Modelos mais utilizados de aterosclerose envolvendo camundongos geneticamente modificados	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANG	Angiotensina
ANGII	Angiotensina II
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ApoE	Apolipoproteína E
ApoE ^{-/-}	Apolipoproteína E <i>knockout</i>
AT ₁ R	Receptores AT ₁
AVE	Acidente Vascular Encefálico
Cas9	Caspase 9
CAT	Catalase
CETP	Proteína colesterol-éster transferase
CML	Célula muscular lisa
DC	Dieta de cafeteria
DCR	Doença crônica renal
DCVs	Doenças cardiovasculares
DH	Doenças hipertensivas
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DN	Dieta normal
DS	Dahl sal-sensível
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EHNA	Esteatohepatite não alcoólica
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FTA	Fetuína-A
GM	Geneticamente modificado
GM-CSF	Fator de estimulação de colônia de macrófagos-granulócito
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
HA	Hipertensão arterial
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HRV	Hipertensão renovascular

IAM	Infarto agudo do miocárdio
I-CAM 1	Moléculas de adesão intracelular 1
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 <i>beta</i>
IL-6	Interleucina 6
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LDLR	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
LDLR ^{-/-}	Receptor de lipoproteína de baixa densidade <i>knockout</i>
LPL	Lipoproteína lipase
M-CSF	Fator de estimulação de colônia de macrófagos
NO	Oxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Proteína C-reativa
SOD	Superóxido dismutase
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TG	Triglicerídeo
TNF- α	Fator de necrose <i>alfa</i>
V-CAM 1	Moléculas de adesão vascular 1
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

Validação da predição de um modelo para indução da aterosclerose e comprometimento hepato-renal em ratos Wistar fêmeas

RESUMO

As abordagens terapêuticas para o tratamento da aterosclerose mudaram radicalmente nas últimas décadas. Parte desse avanço é inegavelmente decorrente de pesquisas biomédicas básicas que proporcionaram uma melhor compreensão e identificação de novos alvos terapêuticos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo para induzir aterogênese e insuficiência hepato-renal em ratas Wistar. Os seguintes grupos receberam os respectivos tratamentos por 60 dias: animais controle, ratas não ovariectomizadas que receberam dieta aterogênica (NEAD), ratas ovariectomizadas que receberam dieta aterogênica (NOAD), ratas não-ovariectomizadas que receberam dieta aterogênica e N ω -Nitro-L-arginina metil éster hidrócloro via oral (L-NAME; LEAD) e ratas ovariectomizadas que receberam dieta aterogênica e L-NAME pela via oral (LOAD). A dieta aterogênica foi composta de 64,4% de dieta basal, 0,5% colesterol, 0,1% de colato de sódio, 5% sacarose, 5% de banha de porco, 5% de gordura vegetal hidrogenada e 20% de gema de ovo liofilizada. Os animais dos grupos NEAD, NOAD, LEAD e LOAD também receberam metimazol (2mg/Kg) diariamente e colecalciferol (700.000 U/Kg) a cada dois dias. Parâmetros urinários, bioquímicos, hemodinâmicos e eletrocardiográficos foram avaliados. Amostras do fígado, coração, rim e artérias foram coletadas para investigar o estado redox e realizar análises histopatológicas. Todos os grupos desenvolveram dislipidemia e esteatose hepática. Somente o grupo NEAD desenvolveu lesões arteriais compatíveis com estrias gordurosas. A função renal foi significativamente comprometida nos grupos LEAD e NOAD. Estes resultados indicam uma alternativa viável para induzir aterogênese e comprometimento hepato-renal em ratas fêmeas.

Palavras-chave: Aterogênese. Dislipidemia. Esteatose hepática. Ensaio pré-clínico, DCV.

Development of a Predictive Model to Induce Atherogenesis and Hepato-Renal Impairment in Female Rats

ABSTRACT

Therapeutic approaches for the treatment of dyslipidemia and atherosclerosis have radically changed in recent decades. Part of this advance undeniably stems from basic biomedical research that has provided a better understanding and identification of new therapeutic targets. The aim of this work was to develop a model to induce atherogenesis and hepato-renal impairment in female Wistar rats. The following groups received the respective treatments for 60 days: control animals, non-ovariectomized rats that received an atherogenic diet (NEAD), ovariectomized rats that received an atherogenic diet (NOAD), non-ovariectomized rats that received an atherogenic diet and oral N ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME; LEAD), and ovariectomized rats that received an atherogenic diet and oral L-NAME (LOAD). The atherogenic diet was composed of 64.4% standard diet, 0.5% cholesterol, 0.1% sodium cholate, 5% sucrose, 5% lard, 5% hydrogenated fat, and 20% egg powder. Animals in the NEAD, NOAD, LEAD, and LOAD groups also received methimazole (2mg/Kg) daily and cholecalciferol (700.000 U/Kg) each two days, divided in four injection intraperitoneal route. Urinary, biochemical, hemodynamic, and electrocardiographic parameters and renal function were assessed. Samples of the liver, heart, kidney, and arteries were collected to investigate redox status and perform histopathological analyses. All of the groups developed dyslipidemia and hepatic steatosis. Only the NEAD group developed arterial lesions that were compatible with fatty streaks. Renal function was significantly impaired in the LEAD and NOAD groups. These results indicate a viable alternative to induce atherogenesis and hepato-renal impairment in female rats.

Keywords: Atherosclerosis. Dyslipidemia. Hepatic steatosis. Kidney failure.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Doenças cardiovasculares	19
2.2 Aterosclerose	19
2.2.1 Fatores de risco	22
2.2.1.1 Estresse oxidativo	23
2.2.1.2 Dislipidemia	24
2.2.1.3 Hipertensão arterial	25
2.3 Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)	26
2.4 Aterosclerose e danos renais	28
2.5 Modelos experimentais	29
2.5.1 Modelos para indução de aterogênese	30
2.5.1.1 Modelos animais não-genéticos	32
2.5.1.2 Modelos animais com modificações genéticas	33
2.5.2 Modelos fêmeas	38
3 OBJETIVOS	40
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
5 APÊNDICE	50
5.1 Artigo: Development of a Predictive Model to Induce Atherogenesis and Hepato-Renal Impairment in Female Rats	50
6 CONCLUSÕES	70
7 ANEXO	71
7.1 Aprovação do Comitê de Ética do Uso de Animais em pesquisa (CEUA ou CEP)	71

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, as doenças cardiovasculares possuem uma prevalência global de aproximadamente 30%. São as principais causas de mortes no mundo, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2017). Grande parte dessas doenças, além de serem influenciadas por fatores genéticos, são diretamente catalisadas por fatores ambientais, como hábitos alimentares e comportamentais incluindo tabagismo, alcoolismo e sedentarismo. De fato, os fatores supracitados são a principal causa de quadros patológicos como a hipertensão arterial sistêmica (HAS) e a dislipidemia, que se não tratados adequadamente podem desencadear quadros mais graves como a aterosclerose (AMBROSE; BARUA, 2004; KANNEL, 1996).

A aterosclerose é uma condição multifatorial, caracterizada pelo depósito de gordura na camada íntima de artérias de médio e grande calibre. Geralmente, está associada com um quadro de inflamação crônica formado devido a pequenas lesões no endotélio arterial (LI et al., 2014; PETERS et al., 2012). O principal fator desencadeante dessa condição é a dislipidemia, sendo a molécula chave dessa doença as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (ADAM et al., 2008). O depósito dessas moléculas na camada íntima dos vasos seguido de sua oxidação (LDL_{ox}), desencadeia um processo inflamatório local (HU et al., 2016b). Moléculas de adesão incluindo a molécula de adesão intracelular (I-CAM 1) e a molécula de adesão vascular (V-CAM 1) começam a serem expressas no endotélio dos vasos, geralmente por ação de interleucinas (IL-1 e IL-6), permitindo dessa forma a migração de monócitos para o sítio da lesão (GISTERÅ; HANSSON, 2017).

Uma vez na região infiltrada os macrófagos fagocitam as LDL_{ox}, formando as células espumosas que se depositam no local. Paralelamente a formação das células espumosas ocorre a migração de células musculares lisas, que sofrem divisão celular irregular mediadas pelo processo inflamatório. Nos quadros mais avançados da doença o núcleo da placa é constituído de uma matriz necrótica, composta por restos celulares (decorrentes da apoptose das células espumosas) e cristais de colesterol (GISTERÅ; HANSSON, 2017; NAGHAVI et al., 2003). Nesses casos, a chance de ocorrer ruptura da placa e exposição de material trombogênico na corrente sanguínea é alta, o que pode consequentemente ocasionar a formação de trombos em

artérias encefálicas ou coronárias, levando a quadros como a acidente vascular encefálico (AVE) ou o infarto agudo do miocárdio (IAM), respectivamente (KUBO et al., 2007).

Além dos quadros vasculares, a dislipidemia também é um importante fator desencadeante de outras condições patológicas, como o diabetes mellitus, a obesidade e quadros de esteatose hepática e alterações da função renal. A esteatose hepática é a forma primária da doença hepática gordurosa não alcoólica, e pode levar a quadros mais sérios em longo prazo, incluindo a cirrose hepática (BROWNING; HORTON, 2014; FARRELL; LARTER, 2006). A formação de placas de ateroscлерóticas podem ocorrer em qualquer veia ou artéria, dentre eles a artéria renal, levando a uma redução de perfusão sanguínea nessa região, uma das consequências mais graves é o quadro de insuficiência renal crônica (LUCZAK et al., 2015).

Diversas manobras terapêuticas têm sido estudadas e desenvolvidas nos últimos anos com a finalidade de contornar tais condições. Para que isso ocorra, é de extrema importância que se entenda a patofisiologia da doença e como ela vai se comportar diante de novos tratamentos (LEONG; NG; JAARIN, 2015). Prévio ao teste em humanos, faz-se necessário a adoção de modelos animais de forma a testar a eficácia de novos tratamentos. No entanto, uma das barreiras encontradas na utilização dos modelos experimentais é a reprodução exata da condição humana nos modelos animais utilizados. De fato, alguns modelos são eficazes e de fácil reprodução, outros são mais complexos e de difícil reprodutibilidade (KAPOURCHALI et al., 2014).

Grande parte dos modelos animais para a indução e estudo da aterosclerose utilizam, além de uma dieta rica em colesterol, a manipulação genética, afetando diretamente as vias de transporte e metabolização do colesterol (XIANGDONG et al., 2011). As espécies mais utilizadas para a indução da aterogênese variam desde lagomorfos (coelhos) até pequenos roedores (ratos, hamsters e camundongos). No entanto, a utilização de roedores é menor, se comparado com os lagomorfos, dado ao metabolismo acelerado do animal e a capacidade de reverter condições patogênicas de forma rápida, principalmente associadas ao sistema cardiovascular (GETZ; REARDON, 2012; KAPOURCHALI et al., 2014). Nestes a maioria são modelos murinos genéticos.

Os modelos genéticos mais utilizados são de camundongos (*Mus musculus*) *knockout* para o gene que expressa a Apolipoproteína E (apoE^{-/-}) ou animais *knockout* para o receptor de LDL (LDLR^{-/-}). No entanto, apesar da velocidade e acurácia com que esses modelos desenvolvem a doença, eles não apresentam especificidade quanto ao desenvolvimento da enfermidade da forma como ocorreria em humanos, sendo esta uma importante justificativa

para o desenvolvimento e utilização de modelos não genéticos de roedores para o estudo da doença (EMINI VESELI et al., 2017; XIANGDONG et al., 2011).

Outro ponto a ser levado em consideração é o gênero de cada espécie, onde a maior parte dos estudos biomédicos adotam animais machos em decorrência de uma série de fatores, sendo o principal o fator hormonal (CLAYTON, 2018; ZUCKER; BEERY, 2010). Principalmente quando o alvo de estudo são as doenças cardiovasculares, já é bem difundido o conhecimento de que o estrogênio, principal hormônio sexual feminino, possui atividade cardioprotetora. De fato, estudos mostram que o estrogênio é capaz de reverter ou prevenir a evolução de várias doenças cardiovasculares, principalmente devido à alta capacidade antioxidante dessa molécula (MANSON et al., 2002). No entanto, as mulheres após o climatério se tornam o principal grupo de risco para essas doenças. Apesar disso, 70% dos estudos envolvendo essas patologias adotam machos como modelos animais, o que se torna algo preocupante, pois existem vários estudos que mostram importantes diferenças farmacocinéticas e farmacodinâmicas entre organismos femininos e masculinos (BEERY; ZUCKER, 2011; CLAYTON, 2018; ZUCKER; BEERY, 2010).

Assim, a associação entre os múltiplos fatores de risco envolvidos (dieta, sexo, fatores ambientais, manipulação farmacológica e condições patofisiológicas associadas) no desenvolvimento e evolução da doença, e a escassez de modelos experimentais utilizando fêmeas, permite conjecturarmos a proposta de uma alternativa plausível para mimetizar as condições observadas em humanos. Dessa forma, o principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo preditivo de aterogênese e comprometimento hepato-renal em ratos Wistar fêmeas, no qual também foi avaliado o impacto do estradiol e do óxido nítrico (NO) no desenvolvimento destas condições.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças cardiovasculares (DCVs)

As DCVs são um conjunto de condições patogênicas que afetam o coração e o sistema vascular, dentre elas a doença coronariana, cerebrovascular, arterial periférica, cardíaca reumática, trombose venosa e embolia pulmonar (OMS, 2017). Tais enfermidades podem ser ocasionadas por fatores ambientais como o tabagismo, alcoolismo, sedentarismo e hábitos alimentares inadequados, e os fatores genéticos, que vão influenciar diretamente o surgimento de catalisadores das doenças, tais como a hipertensão arterial sistêmica (HAS), as dislipidemias, a obesidade e o diabetes mellitus (AMBROSE; BARUA, 2004; KANNEL, 1996). As DCVs, dentre as enfermidades crônicas não transmissíveis, são a principal causa de mortalidade e morbidade, com prevalência estimada em 30% a nível mundial (PETERS et al., 2012; OMS, 2017). Segundo a OMS, é estimado que somente em 2015, 17,7 milhões de pessoas tenham morrido vítimas dessas comorbidades (OMS, 2017).

O impacto econômico da cardiomiopatia isquêmica, como forma mais prevalente das doenças cardiovasculares, é superior a 100 bilhões de dólares anualmente. Além disso, quase 1/3 das mortes são prematuras, sendo as vítimas com idade inferior a 75 anos de idade. Assim, essas enfermidades também possuem importantes consequências econômicas adicionais pelos anos de produtividade perdidos (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013)

2.2 Aterosclerose

Dentre as condições que levam ou agravam as DCVs destaca-se a aterosclerose. A doença é considerada uma condição multifatorial que atinge artérias de grande e médio calibre, podendo levar a casos graves de IAM e AVE (LIBBY, 2006; PETERS et al., 2012; STÖGER et al., 2012). É definida como multifatorial devido a um conjunto de fatores atuando simultaneamente, sendo um dos principais desencadeante a dislipidemia. No entanto, outros fatores como o estresse oxidativo e o processo inflamatório crônico atuam de forma substancial na formação das placas de ateroma (LI et al., 2014; PETERS et al., 2012).

O quadro de aterosclerose é desencadeado quando ocorre um desajuste entre as lipoproteínas presentes na corrente sanguínea. Neste caso o risco se dá no momento em que há níveis maiores de LDL - popularmente conhecida como 'colesterol ruim' - e uma baixa nos

níveis séricos de lipoproteínas de alta densidade (HDL), da mesma forma conhecido como ‘colesterol bom’ (ADAM et al., 2008; HU et al., 2016b). Essa condição associada a um quadro de HAS, por exemplo, ocasiona pequenas lesões no endotélio dos vasos, permitindo que as LDL sejam depositadas na camada íntima dos vasos. Uma vez presente nessa região, tais macromoléculas passam por um processo de oxidação, sendo convertidas em LDLox que vão desencadear um processo inflamatório local (GISTERÅ; HANSSON, 2017; HU et al., 2016b). A retenção dessas macromoléculas no subendotélio, incita a expressão de moléculas de adesão como a VCAM-1 no endotélio, permitindo que monócitos migrem para a área, e permeiem até alcançar as moléculas oxidadas. A partir daí, os macrófagos recém diferenciados induzidos pelos fatores de estimulação de colônias de macrófagos e macrófago-granulócito (M-CSF e GM-CSF), iniciam o processo de fagocitose dessas moléculas, através da expressão de receptores *Scavenger* que se ligam às LDLox e as fagocitam. Assim, os macrófagos são convertidos em células espumosas que começam a se acumular na camada íntima dos vasos, dando início a formação das placas aterogênicas (**Figura 1**) (GISTERÅ; HANSSON, 2017). Além disso, tais células começam a expressar IL-1 β , que além de induzir a proliferação de células musculares lisas (CML), fazem com que estas expressem IL-6 na corrente sanguínea, que ao atingir o fígado, elevam a expressão de proteína C-reativa (PCR) (DUEWELL et al., 2010; LOPPNOW; LIBBY, 1990; MAIER et al., 2005).

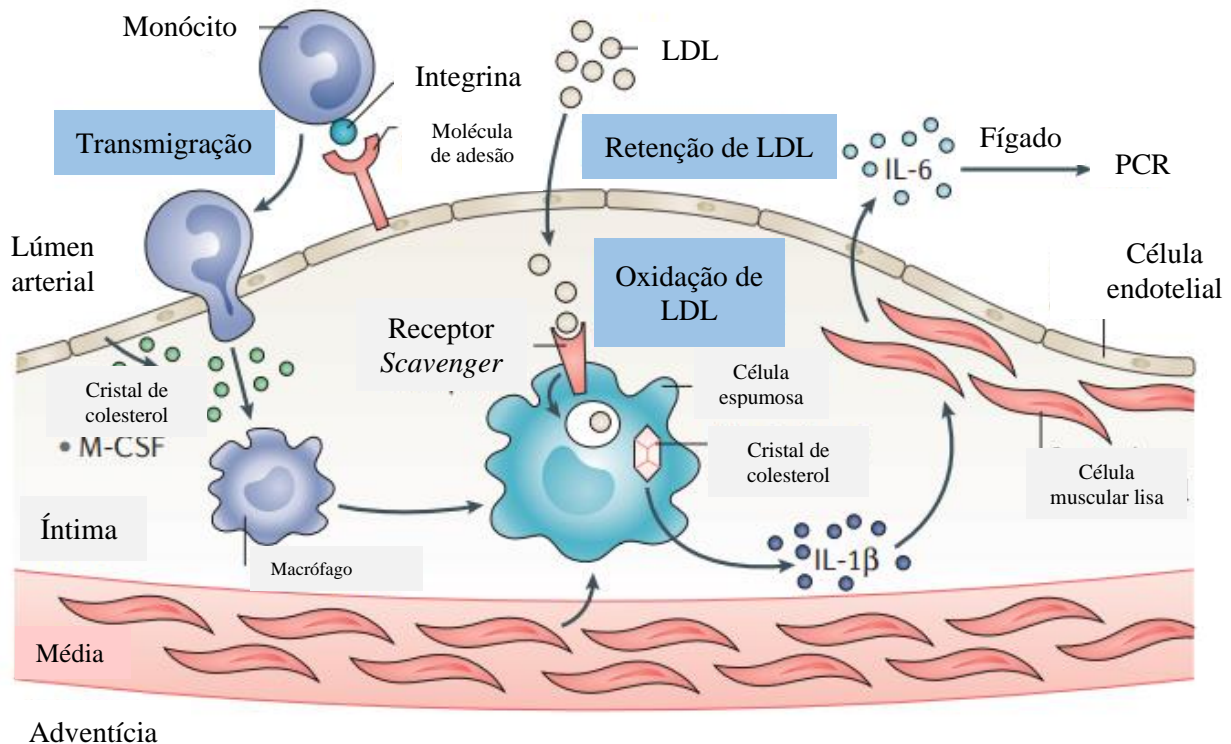


Figura 1. Mecanismos imunológicos de formação das placas de ateroma. A retenção de LDL na camada íntima inicia o desenvolvimento da aterosclerose. O acúmulo subendotelial de lipoproteínas leva a regulação positiva de moléculas de adesão na superfície endotelial e ao recrutamento de monócitos à lesão em formação. Monócitos transmigram para o espaço subendotelial e diferenciam-se em macrófagos em resposta ao fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) produzido pelas células endoteliais. As células do músculo liso também podem transdiferenciar-se em células do tipo macrófago. A captação de lipoproteínas mediada por receptor de sequestrador por macrófagos leva à formação de células espumosas. Os cristais de colesterol se formam nessas células e ativam o inflamassoma da proteína 3 contendo os domínios NACHT, LRR e PYD, resultando na liberação de IL-1 β , que estimula as células musculares lisas a produzir IL-6. Tanto a IL-1 β quanto a IL-6 exercem efeitos pró-inflamatórios. Além disso, a IL-6 circulante pode sinalizar para o fígado para produzir proteína C reativa (PCR). Os níveis desse biomarcador são aumentados em pacientes com doença cardiovascular aterosclerótica. (Fonte: Adaptado de [Gisterå; Hansson, 2017](#))

As células espumosas, tal qual as CML possuem a capacidade de produção de proteinases degradadoras de matrizes, que vão aumentar as chances de ruptura da placa

aterosclerótica (LIBBY; DICARLI; WEISSLEDER, 2010). As placas em estado mais avançado de formação possuem um núcleo necrótico rico em ésteres, cristais de colesterol monohidratado e detritos celulares provenientes de oncoses ou apoptoses dos macrófagos convertidos. Além disso, a apoptose das células do músculo liso interrompem os processos de reparo de danos celulares, aumentando as chances de evolução das placas e possível ruptura (GISTERÅ; HANSSON, 2017; NAGHAVI et al., 2003). Além disso, a morte dessas células, tal qual das células endoteliais, aumentam a produção e liberação de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido, que possuem papel importante nos mecanismos de danos celulares, podendo levar a outros quadros patológicos (LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2014).

Clinicamente, a formação das placas ateroscleróticas se estabelece em diferentes estágios. Nos mais simples, onde não ocorre a ruptura da placa aterosclerótica, pode ocasionar apenas a diminuição do raio do vaso, iniciando um possível quadro de estenose que pode gerar problemas de perfusão local e *angina pectoris* (DAI et al., 2007; LIBBY; DICARLI; WEISSLEDER, 2010).

Nos casos mais graves, onde há presença de tecido fibroso e ruptura da placa, pode ocorrer quadros de trombose que conduzem ao AVE ou ao IAM. É estimado que 70% dos casos de tromboses coronarianas sejam causados pela ruptura das placas ateroscleróticas (KUBO et al., 2009). Além disso, o acúmulo de placas ateroscleróticas nas artérias renais obstrui parcial ou totalmente a irrigação de sangue arterial para os rins, levando a redução da função renal ou a um quadro de insuficiência renal crônica (LUCZAK et al., 2015).

2.2.1 Fatores de risco

Há vários fatores de risco que vão atuar de forma sinérgica para o surgimento e estabelecimento da aterosclerose. O endotélio vascular é de suma importância para seu funcionamento. É nele que estão localizados os receptores que modulam a contração ou dilatação do vaso. Um endotélio normal funciona de modo inibitório, ou seja, inibindo a contração, a divisão celular de CMLs, a agregação plaquetária, a trombose e a adesão de monócitos. De fato, todos esses processos são fatores desencadeantes para a formação de placas ateroscleróticas. Assim, a disfunção endotelial entra como um importante fator de risco para o desenvolvimento do quadro de aterosclerose (GLASSER; SELWYN; GANZ, 1996).

Além de fatores primários como a obesidade e o diabetes mellitus, dois outros fatores se destacam quanto ao seu papel fundamental no estabelecimento da aterosclerose, a dislipidemia e a HAS. Apesar da HAS ser considerada uma doença *per se*, também é um dos principais fatores de risco para o estabelecimento da aterosclerose, dado ao estresse de

cisalhamento no vasos, resultando em lesões onde as LDL alcançam a camada íntima iniciando um processo de inflamação crônica (HURTUBISE et al., 2016).

Embora esses fatores sejam considerados independentes para o estabelecimento da doença, há evidências que indicam que a presença de um desses pode levar ao início ou desenvolvimento de outro, sendo a HAS e a dislipidemia exemplos comuns dessa interação (AGBOR-ETANG; SETARO, 2015). Estudos apontam pelo menos um achado anormal de lipídeos em pacientes recém diagnosticados com HAS, indicando uma possível ação sinérgica desses fatores no desenvolvimento da aterosclerose (HURTUBISE et al., 2016; SILVA; CARDOSO; FERREIRA, 2015).

2.2.1.1 Estresse oxidativo

Além da disfunção endotelial, é possível descrever o importante papel do estresse oxidativo na formação das placas ateroscleróticas, sobretudo na oxidação das moléculas de LDL. De fato, vários fatores de risco desencadeiam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que no quadro de aterosclerose, podem ser produzidas não apenas pelas células endoteliais, mas também pelas células vasculares de músculo liso. Além disso, fatores como a HAS, o diabetes mellitus, a hipercolesterolemia e o envelhecimento contribuem diretamente para a produção dessas EROs (HARRISON et al., 2003; LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2014).

A dislipidemia aumenta significativamente a produção de EROs, que além de oxidar as moléculas de LDL, causam danos severos ao endotélio vascular, o que é fator chave para desencadear um processo inflamatório e permitir que as LDL migrem para a camada íntima dos vasos (HUANG et al., 2013).

Os radicais livres, principalmente as EROs e as espécies reativas de nitrogênio (ERN), são importantes mediadores de lesões teciduais, apoptose e senescência. Eles são gerados de forma endógena, por exposição a diversos fatores ambientais, produtos de metabolismo e respiração, e até como consequência de dietas desbalanceadas (PEIRE; PUIG-PARELLADA, 1998). Dentre os vários tipos de EROs, destaca-se o íon superóxido e o peroxinitrato como radicais livres, e o não-radical peróxido de hidrogênio. Os radicais livres tendem a possuir menor estabilidade e tempo de meia vida que os não-radicais. O excesso de radicais livres vai resultar em proliferação descontrolada de células, apoptose, aumento da permeabilidade celular e morte, além de ser um importante coadjuvante na gênese de disfunção endotelial, inflamação e remodelamento vascular (DRÖGE, 2002; HURTUBISE et al., 2016; PEIRE; PUIG-PARELLADA, 1998).

Células fagocitárias, como neutrófilos, monócitos e macrófagos, contém um ligante de membrana, uma multicomponente oxidase, que usa derivados de NADPH para reduzir o oxigênio molecular. As NADPH oxidases, tem sido observadas como importantes fontes de ERO nas células vasculares, desempenhando um sistema enzimático regulado por fatores fisiopatológicos cruciais para a formação da aterosclerose (HARRISON et al., 2003). Como meio de remediar tal situação adversa, o organismo apresenta a capacidade de expressar enzimas antioxidantes, tal qual utilizar substâncias exógenas como meios de captar os radicais livres responsáveis pelo desenvolvimento da aterosclerose. No que diz respeito a todas doenças, os antioxidantes precisam atuar protegendo os meio intra e extra celular (BONOMINI et al., 2008).

As enzimas antioxidantes são proteínas associadas a células, cuja principal função é impedir ou retardar processos de oxidação, mantendo o tônus dentro da célula; podem também ser associadas a manutenção de antioxidantes exógenos. Dentre os principais antioxidantes endógenos ou enzimáticos, destacam-se a superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase, transferase, oxidoreductase de tiol-dissulfeto e peroxirredoxinas. Estando presentes a maioria delas em células endoteliais nos vasos sanguíneos, pois o líquido extracelular é na maioria das vezes desprovido dessas enzimas (HAMILTON et al., 2004). A glutathione é o maior componente antioxidante encontrado nas células endoteliais, e sua forma reduzida (GSH) é responsável por proteger as células de danos oxidativos, já que esta possui a capacidade de inibir a ação dos peróxidos lipídicos, (ROSENBLAT; COLEMAN; AVIRAM, 2002; SIES, 1999).

A SOD compõe o maior sistema antioxidante contra o anión superóxido nas células vasculares. Possui um metal redox em seu núcleo catalítico, que dismuta o anión superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio. De forma complementar a CAT irá atuar de forma a decompor o H_2O_2 em água e moléculas de oxigênio. A GSH é um importante indicativo do estado antioxidante do organismo, esta não age de forma isolada, sua quantificação na verdade é um indicativo indireto da presença da GPx, já que esta enzima converte o anion hidroxila em água, ao utilizar a GSH em sua forma completa. Desta forma as duas enzimas antioxidantes e o GSH, tornam-se o principal sistema de defesa contra os radicais livres associados a aterosclerose (ROSENBLAT; COLEMAN; AVIRAM, 2002; WASSMANN; WASSMANN; NICKENIG, 2004)

2.2.2.1 Dislipidemia

A aterosclerose vem sendo documentada em modelos experimentais desde 1908, onde Ignatowski (1908) observou a formação de estrias lipídicas em coelhos tratados com dieta hipercalórica. Desde então a doença vem sido comumente associada às dislipidemias, como a hipercolesterolemia e a hipertrigliceridemia (MOGHADASIAN; FROHLICH; MCMANUS, 2001).

A dislipidemia é caracterizada como uma condição que está diretamente relacionada com o aumento de colesterol e triglicérides (TG) na corrente sanguínea, especificamente, o aumento de LDL e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e a diminuição do HDL; sendo fator desencadeante em quadros de obesidade e aterosclerose. Dentre os tipos de dislipidemias envolvidas no estabelecimento das placas ateroscleróticas merecem destaque a hipertrigliceridemia e a hipercolesterolemia. A hipertrigliceridemia é caracterizada pelo aumento de VLDL e quilomícrons no plasma. Grundy e colaboradores (2014) evidenciaram um importante papel das VLDL no desenvolvimento das placas aterogênicas. Este papel é decorrente da diminuição da hidrólise dessas lipoproteínas pelas lipases, ou ainda, devido ao aumento de sua síntese, com conseqüente acúmulo de LDL no plasma (FALUDI et al., 2017; GRUNDY et al., 2014).

A dislipidemia é uma alteração chave para o surgimento de diversas doenças cardio e cerebrovasculares, sendo um fator limitante para a formação da aterosclerose (GRUNDY, 1998). As dislipidemias podem ser classificadas como hipercolesterolemia isolada, hipertrigliceridemia isolada, hiperlipidemia mista ou HDL baixo, isso de acordo com o tipo de alteração lipídica no soro, segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (GARCIA; CALDEIRA, 2011).

2.2.2.2 Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

A HAS ou pressão sanguínea alta é uma condição médica e o principal fator de risco para o desenvolvimento de diversas DCVs, incluindo a doença cardíaca isquêmica, doença arterial periférica, acidente vascular encefálico, insuficiência cardíaca e a insuficiência renal (DUBEY et al., 2017; SULTANA; ASIF, 2017). Apesar de poder ser considerada um fator de risco, a doença apresenta características e conseqüências próprias. Geralmente assintomática, a HAS afeta de 20 a 40% da população adulta nas américas, atingindo cerca de 250 milhões de pessoas só nesse continente. Segundo a OMS (2016) a HAS pode ser definida como pressão arterial sistólica maior ou igual a 140 mm Hg, e/ou pressão arterial diastólica igual ou maior a 90 mm Hg.

A HAS é associada a distúrbios metabólicos, alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo, sendo frequentemente agravada por outros fatores de risco, incluindo a dislipidemia, a obesidade e o diabetes. No Brasil, a doença atinge uma média de 32,5% (aproximadamente 36 milhões) de indivíduos adultos, sendo mais de 60% correspondente a pacientes idosos, sendo responsável direta ou indiretamente por 50% das mortes por DCVs. Só em 2013, das 1.138.670 mortes, cerca de 29,8% foram atribuídas a DCVs, sendo a principal causa de mortes no país. No entanto, ao longo dos anos, esses números tem diminuído, com exceção das doenças hipertensivas (DH), como hipertensão neonatal, pulmonar e portal, por exemplo, que aumentaram entre os anos de 2002 e 2009, mesmo assim, apresentando redução significativa desde 2010 (MALACHIAS et al., 2016).

A HAS é um importante fator de risco para a formação de placas ateroscleróticas, dado ao estresse de cisalhamento que o quadro acarreta sob o endotélio vascular. As lesões formadas servem de acesso para as LDL à camada íntima das artérias, além de ser um quadro indutor da produção de EROs (AMBALE VENKATESH et al., 2014; HUANG et al., 2013; HURTUBISE et al., 2016). É de grande importância acrescentar que embora a HAS seja um fator de risco para a formação de aterosclerose, a mesma pode surgir em decorrência do quadro aterogênico, não havendo uma ordem para que isso ocorra, onde, ao mesmo tempo que são incidentes interligados, são independentes entre si (PAN et al., 1997).

2.3 Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) pode ser definida como um conjunto de condições que afetam o fígado sem histórico de consumo de álcool. É caracterizada desde o acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos (esteatose hepática), até quadros inflamatórios graves, levando a fibrose e a cirrose hepática (BROWNING; HORTON, 2014). A DHGNA é considerada o quadro mais comum dentre as doenças crônicas que atingem o fígado, com prevalência de aproximadamente 30% em pacientes adultos nos países desenvolvidos, o que leva o aumento dessa prevalência é decorrente do alto consumo de alimentos industrializados e gordurosos. Comumente a DHGNA está associada a quadros de obesidade, resistência à insulina e hiperlipidemia, sendo considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica (MARCHESINI et al., 2003; NEUSCHWANDER-TETRI, 2005, 2007).

Há três estágio possíveis para essa condição: a esteatose simples, que consiste na esteatose hepatocelular, ou seja, o acúmulo lipídico nos hepatócitos, e a esteatohepatite não alcoólica (EHNA), que além de esteatose nos hepatócitos, pode apresentar quadros de

inflamação e necrose no tecido hepático. Embora a esteatose simples seja considerada o curso inicial natural da DHGNA, a EHNA é observada em 1/3 dos casos, sendo um quadro progressivo que pode levar a condições mais sérias como a cirrose e o carcinoma hepatocelular, que é considerado o terceiro estágio (FARRELL; LARTER, 2006; TAKAHASHI; FUKUSATO, 2014).

A esteatose hepática, ou esteatose simples, é a manifestação mais comum e menos agressiva da DHGNA, e é um termo genérico para se referir ao acúmulo de lipídeos no tecido hepático (hepatócitos). A esteatose ocorre quando há uma desregulagem nas vias metabólicas de lipídeos, podendo contribuir para o surgimento de quadros mais sérios como a inflamação hepática crônica, resistência à insulina e danos no tecido hepático (BROWNING; HORTON, 2014; PURUSHOTHAM et al., 2009).

A capacidade do fígado de regular o metabolismo é comandada por uma dinâmica rede regulatória transcricional (CHAWLA et al., 2001). Estudos indicam que a presença do quadro de esteatose hepática possui um papel importante no desenvolvimentos de doenças cardiovasculares, tais como a aterosclerose. Além disso, comorbidades como o diabetes mellitus pode catalisar tanto a DHGNA quanto o processo aterosclerótico. De fato, Targher e colaboradores (2006) e McKimmie e colaboradores (2008) mostraram que pacientes com associação dessas duas condições apresentaram um rápido e significativo espessamento da camada média-íntima das artérias carótidas (MCKIMMIE et al., 2008; TARGHER et al., 2006).

O acúmulo de lipídeos no fígado, além de induzir a produção de EROs, são responsáveis por aumentar a expressão de IL-6, fator de necrose tumoral *alfa* (TNF- α), PCR, fibrinogênio e fetuina-A (FTA), que são moléculas pró-inflamatórias que estão diretamente associadas com a formação da doença aterosclerótica (AUBERGER et al., 1989). A FTA é uma proteína secretada pelo fígado, sendo um inibidor natural para receptores de insulina tirosina quinase e um ligante endógeno de receptores *toll* 4 (TLR4), por onde através do acúmulo lipídico leva a resistência à insulina. Esta proteína pode levar a um quadro de inflamação, que está associado com o surgimento de condições como disfunção endotelial, aterosclerose na carótida e aumento de chances de IAM, AVE e diabetes tipo 2 (DOGRU et al., 2013; PAL et al., 2012; RITTIG et al., 2009; STEFAN et al., 2008). O aumento de PCR promove aumento nos quadros de inflamação e acelera o desenvolvimento da aterosclerose aumentando a expressão de inibidores de ativadores de plasminogênio 1 (IAP1) e moléculas de adesão nas células endoteliais, inibindo a formação de óxido nítrico, e aumentando a captação de LDLox pelos macrófagos (CHAPMAN et al., 2011; GAGGINI et al., 2013).

2.4 Aterosclerose e danos renais

A aterosclerose, dado a generalização de sua patofisiologia, comumente aparece associada com várias outras enfermidades. Um dos quadros a que geralmente está associada são as doenças renais, principalmente a doença renal crônica (DRC), onde esta está presente em 30% dos casos (CHADE; LERMAN; LERMAN, 2005). De fato, a doença aterosclerótica renal está comumente associada a mais de 1/3 dos casos de doenças renais terminais. A aterosclerose na artéria renal é evidente em 50% dos indivíduos que apresentam a doença, e podem causar estenose significativa da artéria renal em 6,8 % dos adultos abaixo dos 65 anos (CHADE; LERMAN; LERMAN, 2005; HANSEN et al., 2002; UZU et al., 2002).

A estenose da artéria renal, pode ocasionar o acionamento do sistema renina-angiotensina-aldosterona, que leva de forma sistêmica ao um quadro de hipertensão renovascular (HRV). O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), é um sistema complexo de rotas enzimáticas e componentes bioativos que exercem diversas funções (ABADIR; WALSTON; CAREY, 2012). É definido pela atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), que irá converter o peptídeo angiotensina (ANG) em angiotensina II (ANGII) e consequente ativação dos seus receptores (AT_{1R}), que irá mediar tanto os mecanismos periféricos quanto os mecanismos centrais na regulação da pressão sanguínea. A ação dessa via, está diretamente relacionada a diversas respostas patológicas como inflamação, fibrose, desregulação metabólica e disfunção endotelial, parâmetros que, junto com a hipertensão são intricadamente atrelados ao desenvolvimento da aterosclerose (CAREY, 2012; CHAPPELL, 2016).

O surgimento da DCR está diretamente associado a diferentes fatores de risco, como a dislipidemia severa, inflamação e principalmente o estresse oxidativo, que em associação também são fatores desencadeadores de aterosclerose. Esses fatores além de levar a oxidação do LDL e a lesões endoteliais, também conduzem a um comprometimento da maturação das moléculas de HDL. Essa anormalidade pode ser um fator crucial e conectivo entre as DCVs e as doenças renais (NAGHAVI et al., 2003; NAVAB et al., 2006).

A aterosclerose é resultado de uma série de respostas celulares e moleculares a condições adversas endógenas e exógenas, e os eventos celulares envolvidos no início da aterogênese se assemelham aos desencadeados em outras formas de DCR. De fato, as células glomerulares apresentam algumas características fisiológicas semelhantes às células endoteliais vasculares (KAMANNA; ROH; KIRSCHENBAUM, 1998). Dessa forma, a aterosclerose pode sobrepor lesões renais pré-existentes ou simultaneamente agravar a progressão da DCR,

compartilhando mecanismos fisiopatológicos semelhantes (CHADE; LERMAN; LERMAN, 2005).

2.5 Modelos experimentais

A utilização de modelos experimentais com animais é de suma importância para se estudar e entender o funcionamento e a patofisiologia de várias enfermidades, tal qual testar importantes candidatos a novos tratamentos. Muitos animais apresentam semelhanças anatômicas e fisiológicas, tal qual genes homólogos, aos humanos, permitindo que doenças e condições possam ser mimetizadas de forma a simular como estas se comportariam diante de possíveis tratamentos como fármacos e vacinas (KAPOURCHALI et al., 2014). A ideia de se utilizar animais como modelos experimentais teve início em 1865 quando Claude Bernard lançou a obra “Introdução ao Estudo da Medicina Experimental”, onde propôs o uso de animais como modelos de experimentação para simular condições fisiológicas semelhantes ao que ocorre nos humanos (BERNARD; UNIVERSITY COLLEGE, 1865).

Atualmente, a pesquisa com animais se apresenta como uma ferramenta importante para entender a patofisiologia de uma doença e a maneira de intervenção terapêutica mais adequada a ser aplicada. Esses animais são usados nas mais diversas áreas das pesquisas biomédicas, e tem sido utilizado não só para o estudo das doenças em humanos, mas também em outros animais. Animais usados como modelos experimentais incluem os roedores (como os camundongos, ratos e cobaias), lagomorfos como os coelhos, e outros animais como cães, gatos, porcos, primatas, pássaros, peixes e sapos (LEONG; NG; JAARIN, 2015).

Muitas considerações devem ser levadas em conta na hora de escolher o modelo animal mais apropriado para responder os questionamentos que o estudo apresenta. A espécie e o número de animais sempre devem ser avaliados primeiramente, de forma a respeitar o princípio dos 3Rs que vem dos termo em inglês para redução, substituição e refinamento (*reduction, replacement e refinement*) introduzidos por Russel e Burch (1959) e estabelecidos de forma tornar a utilização de animais em pesquisa mais ética e mais humanizada (RUSSELL; BURCH, 1959). Dessa forma, até mesmo antes de optar pelo uso de animais, é ideal que o pesquisador pesquise possíveis alternativas, como ensaios *in vitro*, que talvez possam ser tão eficientes quanto o uso dos animais, aplicando dessa forma o princípio de *replacement*. Caso o uso de animais prossiga, é de extrema importância a aplicação dos outros dois princípios, a *reduction* de forma a utilizar o menor número amostral de animais possível, e o *refinement*, que vem com a premissa de otimizar os protocolos experimentais de forma a diminuir a dor e o sofrimento do animal ao máximo possível (EMERSON, 2010).

O uso de animais, principalmente os ratos (*Rattus norvegicus*), tem sido documentado nas mais diversas áreas biomédicas. Esses animais tem sido empregados para o estudo das mais diversas doenças, como as doenças inflamatórias, autoimunes, cardiovasculares, gastrointestinais e carcinomas (JACOB, 2010). Os modelos utilizados para as doenças cardiovasculares vem sendo aperfeiçoados ao longo do tempo, e embora com o apogeu das técnicas de DNA recombinante e o surgimento de linhagens geneticamente modificadas, tem se buscado alternativas de modelos que desenvolvam determinadas doenças de forma a simular como elas realmente ocorrem de forma natural, que seja, de fácil reprodutibilidade e mais acessível em termos de custos, dado que as linhagens geneticamente modificadas tendem a ser de alto custo e de difícil reprodução em biotérios (EMINI VESELI et al., 2017; KAPOURCHALI et al., 2014)

2.5.1 Modelos animais para o estudo da doença aterosclerótica

A aterosclerose por ser uma doença de cunho multifatorial é de difícil reprodutibilidade em modelos animais, dado que uma série de fatores devem ser levados em conta no momento em que é decidido induzir o quadro patológico. De fato, o desenvolvimento da doença deve ocorrer de forma o mais semelhante possível ao que ocorre em pacientes humanos, desde o perfil lipídico sérico, até quadros específicos como a inflamação crônica, a disfunção endotelial e o estresse oxidativo (KAPOURCHALI et al., 2014). Dessa forma, modelos adequados que possam elucidar as etapas envolvidas na patogênese da aterosclerose apresentam um papel importante para o desenvolvimento de possíveis tratamentos (XIANGDONG et al., 2011).

Dentre os modelos experimentais utilizados em pesquisas biomédicas os camundongos são de longe os mais utilizados, dado a fácil reprodução, manuseio e manutenção. No entanto, quando o foco é a aterosclerose, ou enfermidades atreladas ao metabolismo lipídico, os camundongos são de longe os menos eficientes, principalmente como modelos de aterosclerose. Estes animais apresentam uma certa resistência a dieta hipercolesterolêmica usualmente utilizada como indutora da doença, sendo que aproximadamente 70% do colesterol plasmático dos camundongos é composto por HDL, sendo que nos humanos este perfil é o oposto, sendo o LDL a molécula mais abundante no soro (FERNANDEZ et al., 1999; XIANGDONG et al., 2011). Uma das possíveis causas para essa diferença entre os perfis lipídicos de camundongos e humanos é a ausência da enzima proteína colesterol-éster transferase (CETP) nos camundongos, sendo este um fator limitante para a utilização desses animais como modelos da doença (OLIVEIRA HELENA C.F. et al., 1997).

No entanto, como forma de compensar essas limitações, os camundongos possuem um padrão genético bem conhecido, sendo o segundo mamífero a ter seu genoma completamente sequenciado, permitindo que através de técnicas de engenharia genética os genes possam ser silenciados, deletados ou passados por processo de knock-out/*in*. Dessa forma, os camundongos passam a ser os modelos genéticos comuns para os estudos das mais diversas enfermidades, principalmente a aterosclerose, elucidando fatores tanto genéticos como não genéticos envolvidos na fisiopatologia da doença (KAPOURCHALI et al., 2014; LIVERO; GASPAROTTO JUNIOR, 2019).

Semelhante aos camundongos, os ratos não possuem a CETP no plasma, o que dificulta a absorção do colesterol, da mesma forma, a maior parte do colesterol circulante é composto por HDL, sendo então modelos pouco adotados para a indução da aterosclerose (FERNANDEZ et al., 1999). No entanto, a utilização de ratos para pesquisas biomédicas tem sido mais e mais adotada, dado a facilidade com que protocolos podem ser realizados nesses animais, pois seu tamanho permite fácil manuseio e manutenção do animal, sem contar sua semelhança anatômica e fisiológica com humanos (LEONG; NG; JAARIN, 2015). Dessa forma, modelos de aterosclerose induzidos em ratos tem sido desenvolvidos e padronizados com mais frequência (XIANGDONG et al., 2011). Notavelmente, linhagens isogênicas como os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tem demonstrado uma maior susceptibilidade para desenvolver a doença, principalmente quando induzida por dieta rica em colesterol (OKAMOTO et al., 1964). Modelos em ratos de linhagem heterogênicas como Wistar e Sprague-Dawley tem sido descrito atualmente. Nesse caso a dieta hiperlipídica é associada com a manipulação farmacológica, incluindo a administração de vitamina D, ácido cólico e propiltiouracil (JIANG et al., 2017a; JORIS et al., 1983; LI; CHEN; SHEN, 2011; XIANGDONG et al., 2011).

Embora os ratos tenham sido a terceira espécie a ser sequenciada, não tiveram a mesma exploração na engenharia genética como os camundongos. Assim, é incomum encontrar linhagens transgênicas ou com qualquer tipo de modificação genética. Um dos poucos exemplos é uma linhagem transgênica que super expressa a CETP humana utilizando como base uma linhagem de ratos Dahl sal-sensível (DS) (HERRERA et al., 1999).

Além dos roedores supracitados, outro modelo mais utilizado, aliás, o mais utilizado para estudos de aterosclerose são os lagomorfos, principalmente os coelhos da linhagem Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*). Estes foram adotados como modelo padrão ouro para o estudo de aterosclerose (IGNATOWSKI, 1908). No entanto, seu uso vem diminuindo desde os

anos 2000, provavelmente em decorrência do desenvolvimento dos camundongos geneticamente modificados (EMINI VESELI et al., 2017; FAN et al., 2015).

Os coelhos possuem o metabolismo de lipoproteínas semelhantes aos humanos, e bem diferente dos camundongos, ou seja, as lipoproteínas predominantes são as ricas em ApoB (LDL e VLDL) (FAN; WATANABE, 2000). No entanto, algumas desvantagens podem surgir com esse modelo. Esses animais apresentam um quadro de inflamação massiva durante o processo de formação da doença, podendo levar o animal a uma morte precoce e alterando radicalmente os parâmetros bioquímicos. Além disso, quando alimentados com dieta hipercolesterolêmica por um período muito longo, pode surgir um importante quadro de toxicidade hepática (EMINI VESELI et al., 2017; FUSTER et al., 2012).

Mesmo com o aumento da utilização de modelos genéticos de camundongos, recentemente, modelos geneticamente modificados (GM), tem sido explorado em coelhos. Como exemplo, destaca-se o Apolipoproteína E *knockout* (ApoE \neg), modelo desenvolvido através da técnica de edição genica (CRISPR-cas9) em 2016 por Niimi e colaboradores (NIIMI et al., 2016). E por fim, há também uma linhagem de coelhos obtidos por cruzamento entre gerações na mesma família, onde devido a uma mutação não há expressão de receptores de LDL. São os coelhos da linhagem Watanabe Heritable Hyperlipidaemic (WHH) (WATANABE, 1980). Estes animais tem sido muito adotados por serem um modelo espontâneo de hipercolesterolemia e aterosclerose, porém ele ainda não é encontrado no Brasil e tem um alto custo.

2.5.1.1 Modelos animais não-genéticos

Os modelos chamados de não genéticos, ou convencionais, são aqueles cuja patologia é induzida por métodos naturais, sem qualquer tipo de modificação genética, o que se torna uma vantagem, pois este simula de forma mais real a formação e a evolução de determinada doença. De fato, esse vem a ser o principal objetivo de um modelo animal, ou seja, apresentar um desenvolvimento patológico o mais fiel possível ao que ocorre nos humanos, para que se possa estudar com eficácia a fisiopatologia da doença (LIVERO; GASPAROTTO JUNIOR, 2019). No entanto, quando falamos em aterosclerose a existência desses modelos tende a ser escassa, principalmente dentre os roedores, apesar de serem os modelos experimentais mais utilizados em pesquisas biomédicas. Uma das explicações é que os roedores apresentam baixa quantidade de LDL circulante no plasma e ausência de CETP, dois fatores cruciais para o desenvolvimento da doença (EMINI VESELI et al., 2017; GETZ; REARDON, 2012; MILLER, 1987).

O modelo animal mais utilizado hoje para pesquisas biomédicas é o camundongo. Essa espécie possui inúmeras vantagens sobre outros animais, como ciclo de vida curto, baixo custo de manutenção, rápido ciclo reprodutivo e fácil manuseio. No entanto, é o animal que apresenta mais dificuldade de desenvolver doenças relacionadas ao metabolismo lipídico. Assim, na utilização desses animais como modelos para o estudo da doença aterosclerótica a manipulação genética é necessária, de forma a tornar o perfil lipídico o mais compatível com a formação da doença (EMINI VESELI et al., 2017; GETZ; REARDON, 2012).

Apesar dos camundongos possuírem uma série de representantes geneticamente modificados que podem ser adotados como modelos para o estudo da aterosclerose, esses não apresentam o desenvolvimento natural da doença. Dessa forma, os ratos apresentam vantagens sobre esses modelos. Apesar de apresentarem perfil lipídico semelhante, pesquisas indicam que a administração de dietas hipercolesterolêmicas associadas com outros fatores de risco (p.ex. HAS) e manipulação farmacológica podem representar alternativas viáveis aos modelos genéticos (LIVERO; GASPAROTTO JUNIOR, 2019).

Fu e colaboradores associando uma dieta hipercolesterolêmica (81,3% de ração comercial, 11% banha, 3% colesterol, 0,5% colato de sódio e 5% de açúcar), injeção intraperitoneal de vitamina D3 (600.000 IU/Kg) e 0,2% de propiltiouracil induziu placas ateroscleróticas em ratos normotensos. Nesse caso, os animais apresentaram importantes danos endoteliais vasculares, aumento nos níveis de colesterol total e LDL, e significativo espessamento da camada íntima dos vasos (FU et al., 2017; LIVERO; GASPAROTTO JUNIOR, 2019). No entanto, outros autores conseguiram efeitos semelhantes fazendo pequenas alterações na dieta, nas doses de vitamina D3 e na quantidade de propiltiouracil. Jiang e colaboradores conseguiram um feito semelhante em ratos machos da linhagem Sprague-Dawley em apenas 12 semanas. Com pequenas alterações na dieta (78,3% de dieta comercial, 10% de banha, 1% de colesterol, 5% de gema de ovo liofilizada, 0,5% de colato de sódio e 5% de sucrose), adição de propiltiouracil (0,2%) e administração de vitamina D3 (700.000 IU/Kg, i.p.) por 6 semanas os animais desenvolveram dislipidemia, esteatose hepática e placas ateroscleróticas contendo células espumosas, cristais de colesterol, e tecido necrótico calcificado (JIANG et al., 2017b).

O tempo de estabilização da doença em ratos, de acordo com os estudos já encontrados, variam de 10 a 17 semanas. De fato, a associação de dieta hiperlipídica, antagonistas de hormônios tireoidianos e vitamina D3 em altas dosagens podem induzir o desenvolvimento da aterosclerose em tempos menores, no entanto a doença se apresenta de forma mais sutil. Dessa forma, alguns autores optaram por envolver procedimentos cirúrgicos para a indução de outros

fatores de risco que possam ajudar na indução da aterosclerose. Como exemplo, Sasaki e colaboradores (1994) associaram uma dieta aterogênica (82,3% de dieta comercial, 10% de banha, 2% de colesterol, 0,5% de ácido cólico, 0,2% de 6-metil-tiouracil e 5% de sucrose) com hipertensão renovascular (dois rins, um clipe; 2K1C) em machos da linhagem Wistar (LIVERO; GASPAROTTO JUNIOR, 2019; SASAKI et al., 1994; UMAR et al., 2010). Esse procedimento induziu significativo espessamento da camada íntima dos vasos, com proliferação de CML e acentuada formação de placas ateroscleróticas (SASAKI et al., 1994).

Vale ressaltar que a maioria dos modelos não genéticos de aterosclerose em ratos foram desenvolvidos em animais machos, dado a interferência hormonal que as fêmeas apresentam, tornando-as um alvo menos explorado como modelo experimental, principalmente para doenças cardiovasculares. Os poucos modelos apresentados utilizando fêmeas foram realizados com animais ovariectomizados, que possibilitam mimetizar os efeitos cardioprotetores dos hormônios. Adam e colaboradores associaram uma dieta rica em lipídeos e ovariectomia para induzir aterosclerose em ratas. O modelo permitiu aumentar os níveis de lipídeos e a formação discreta de placas ateroscleróticas (ADAM et al., 2008).

Por fim, como já discutido acima, o modelo que por muito tempo tem sido utilizado como padrão ouro para estudos com aterosclerose são com os lagomorfos. Os coelhos, que apresentam níveis séricos de HDL e LDL semelhantes aos humanos, são um excelente modelo para indução de aterosclerose de forma natural, já que estes ao contrário dos camundongos e ratos, apresentam como lipoproteína predominante o VLDL e o LDL (EMINI VESELI et al., 2017; FAN; WATANABE, 2000). No entanto, apesar das vantagens em relação a outros modelos, os coelhos apresentam limitações que podem influenciar os estudos, sendo estes fatores ambientais, econômicos e fisiopatológicos, incluindo o custo de manutenção e a pouca tolerância hepática a dieta hiperlipídica (EMINI VESELI et al., 2017; FUSTER et al., 2012).

2.5.1.2 Modelos animais com modificações genéticas

Os roedores foram os primeiros mamíferos junto com os humanos a terem seu genoma completo sequenciado. Dado ao seu ciclo reprodutível curto e padrão genético, são os principais alvos de manipulação genética para obtenção de modelos experimentais. Os camundongos são a espécie em que concentra a maioria dos exemplares geneticamente modificados (transgênicos, *knockout* e *knockin*), no entanto, também é possível encontrar exemplares de ratos e coelhos GM para modelos de aterosclerose (EMINI VESELI et al., 2017; LIVERO; GASPAROTTO JUNIOR, 2019).

Dentre os tipos de camundongos GM, três se destacam e são utilizados com mais frequência, sendo: 1) knockout para Apolipoproteína E (ApoE^{-/-}); knockout para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}); 3) ambos os modelos associados (ApoE/LDLr^{-/-}), apresentando vantagens e desvantagens (**Figura 2**) (EMINI VESELI et al., 2017).

A ApoE é uma glicoproteína que está presente em todas as lipoproteínas com exceção da LDL. Ela atua como ligante para os receptores de lipoproteínas na superfície celular, que irá eliminar os quilomícrons e remanescentes de VLDL (CURTISS; BOISVERT, 2000). Atua também como um regulador da homeostase de colesterol, distribuição local de colesterol nos tecidos, imunoregulação, absorção dietética e excreção biliar de colesterol (SEHAYEK et al., 2000). O primeiro modelo de camundongo ApoE^{-/-} foi desenvolvido em 1992, quase que simultaneamente por dois laboratórios, utilizando técnicas de recombinação homologa em células tronco embrionárias (PIEDRAHITA et al., 1992; PLUMP et al., 1992). Embora esses animais GM apresentem características físicas semelhantes aos tipo selvagens, o perfil lipídico se diferencia de forma abrupta, onde nos animais knockout a habilidade da ApoE de “limpar” o colesterol é quase que completamente inibida, resultando em níveis de colesterol total de aproximadamente 400-600 mg/dl quando alimentados com dieta normal (DN), enquanto que os níveis normais de linhagens selvagens variam de 75 a 110 mg/dl (EMINI VESELI et al., 2017; PLUMP; BRESLOW, 1995). Em ensaios onde linhagens selvagens e ApoE^{-/-} foram alimentadas com dieta de cafeteria (DC) por 2 a 3 semanas, os níveis de colesterol total dobraram nos primeiros, enquanto que nos animais *knockout* essa quantidade quadruplicou (PLUMP et al., 1992).

Os receptores de LDL são responsáveis pela endocitose dessas moléculas, mantendo então os níveis adequados no plasma. Deficiência na expressão desses receptores, juntamente com mutações no gene que o codifica, são geralmente descritos em quadros de hipercolesterolemia familiar (DEFESCHE, 2004; EMINI VESELI et al., 2017). Os animais com modificação genética no gene que codifica esses receptores foram desenvolvidos em 1993 por Ishibashi e colaboradores. Os animais denominados como LDLr^{-/-} tiveram o gene silenciado para que pudesse parar de expressar os receptores de LDL (ISHIBASHI et al., 1993). Comparando com as linhagens selvagens, os LDLr^{-/-} não apresentam aumento significativo nos níveis plasmáticos de colesterol, e podem não desenvolver ou desenvolver apenas um suave quadro de aterosclerose quando alimentados com dieta normal. Além disso, possuem uma diferença peculiar em relação aos animais ApoE^{-/-}. Nos camundongos ApoE^{-/-} se acumulam as maiores partículas de lipoproteínas, como as remanescentes de quilomícrons, VLDL e IDL.

Por outro lado, nos animais LDLr^{-/-} as partículas que se acumulam primeiro são as de LDL (ISHIBASHI et al., 1994; PLUMP et al., 1992).

Embora o mecanismo indutor seja diferente para ambos os tipos de camundongos *knockout*, o tipo de placa formado é basicamente o mesmo. Ou seja, uma dieta de cafeteria associado a ambos os modelos resultaria em lesões maiores e mais avançadas, com núcleo necrótico, contendo restos celulares e cristais de colesterol, e capa fibrosa rica em colágeno (EMINI VESELI et al., 2017; HARTVIGSEN et al., 2007; KNOWLES; MAEDA, 2000). No entanto, os animais LDLr^{-/-} apresentam três vantagens cruciais em comparação com o modelo ApoE^{-/-}, sendo a primeira o colesterol plasmático, que por ser mais carregado de LDL se assemelha mais ao perfil lipídico humano. A segunda vantagem é o fato de que, como nesse modelo a ApoE está presente, não há interferência nos processos inflamatórios, que são de extrema importância no desenvolvimento das placas ateroscleróticas. A terceira e última vantagem é devido a semelhança fisiopatológica que esse modelo tem com pacientes humanos portadores de hipercolesterolemia familiar, caracterizado pela diminuição ou ausência de receptores de LDL (GETZ; REARDON, 2012; LEE et al., 2017).

O último dos três modelos geneticamente modificados mais utilizados, o camundongo duplo *knockout* ApoE/LDLr^{-/-}, surgiu após a ascensão dos outros dois modelos já descritos. De fato, esse modelo desenvolve uma hiperlipidemia e aterosclerose muito mais severa que os outros dois modelos isolados. É considerado um modelo espontâneo para o desenvolvimento de aterosclerose, onde apenas com alimentação normal os animais já demonstram capacidade de desenvolver a doença em níveis avançados (BONTHU et al., 1997; EMINI VESELI et al., 2017; JAWIENÍ; NASTALEK; KORBUT, 2004).

Os ratos, ao contrário dos camundongos, não apresentam muitos exemplares geneticamente modificados, isso porque a manipulação de células tronco embrionárias, onde se faz as modificações genéticas, não se mostrou tão simples quanto nos camundongos (RUSSELL, 2003). Dessa forma, poucos ratos *knockout* ou transgênicos tem se mostrado promissores para o estudo de doenças, principalmente a aterosclerose, onde há vários modelos em camundongos. No entanto eles não são inexistentes, e um exemplo deles, é um modelo utilizando ratos DS, onde foi adicionado um transgene humano hCETP que codifica a expressão da proteína CETP. Dessa forma o rato passa a expressar a CETP, que antes era ausente, facilitando então a absorção de colesterol e aumentando a quantidade de LDL circulante no plasma (HERRERA et al., 1999; XIANGDONG et al., 2011).

Por fim, embora os lagomorfos tenham sido utilizados e ainda são até hoje o padrão ouro para o desenvolvimento de aterosclerose em animais, é possível encontrar alguns modelos

que tiveram seu genoma alterado para facilitar a indução da doença. Niimi e colaboradores no ano de 2016 desenvolveram um modelo de coelho *knockout* para ApoE (ApoE^{-/-}), utilizando tecnologias recentes de edição genica, como o RNA guia CRISPR associado a proteína caspase 9 (Cas9) (NIIMI et al., 2016). Este modelo torna-se um excelente substituto ao camundongo ApoE, pois o coelho em si já possui o perfil lipídico semelhante ao humano. Além disso, com o gene ApoE não codificando, o modelo é capaz de desenvolver hiperlipidemia mesmo com dieta normal, chegando a níveis de colesterol plasmático por volta de 200 mg/dl. No entanto, quando alimentados com dieta hiperlipídica os níveis podem chegar a 1000 mg/dl ou mais, valor exorbitante quando comparado com linhagens selvagens de coelhos, onde os níveis de colesterol total no plasma não passam de 170 mg/dl. A formação das placas é bem mais agressiva, e ocorre de forma mais rápida que o convencional quando utilizada uma dieta hiperlipidêmica, fazendo desse modelo uma ótima alternativa para se estudar a fisiopatologia da doença e testar possíveis tratamentos (BROUSSEAU; HOEG, 1999; EMINI VESELI et al., 2017; NIIMI et al., 2016).







	Modelo	Perfil Lipídico	Distribuição de placa e características (20 semanas de DC)	Vantagens e limitações
ApoE ^{-/-}	Deleção do gene ApoE 	Colesterol plasmático: 400-600 mg/dl em DN >1000 mg/dl em DC Lipoproteínas: ↑↑ VLDL ↑ LDL ↓ HDL	 Placa fibrosa: Célula muscular lisa Matriz extracelular Células inflamatórias Núcleo necrótico	<ul style="list-style-type: none"> ➕ Desenvolvimento de aterosclerose em DN ➖ Perfil lipídico diferente de humano ➖ ApoE atua na inflamação – Influencia no desenvolvimento da placa ➖ Sem ruptura espontânea de placas, trombose ou complicações
LDLR ^{-/-}	Deleção do gene de receptor de LDL 	Colesterol plasmático: 200-300 mg/dl em DN >1000 mg/dl em DC Lipoproteínas: ↑ VLDL ↑↑ LDL = HDL	 Placa fibrosa: Célula muscular lisa Matriz extracelular Células inflamatórias Núcleo necrótico	<ul style="list-style-type: none"> ➕ Perfil lipídico semelhante de humano ➕ ApoE funcional – Sem impacto na inflamação ➖ Lesões complexas requerem DC ➖ Sem ruptura espontânea de placas, trombose ou complicações
ApoE ^{-/-} LDLR ^{-/-}	Deleção do gene ApoE e receptor de LDL 	Colesterol plasmático: 400-600 mg/dl em DN >1000 mg/dl em DC Lipoproteínas: ↑↑ VLDL ↑↑ LDL ↓ HDL	 Placa fibrosa: Célula muscular lisa Matriz extracelular Células inflamatórias Núcleo necrótico	<ul style="list-style-type: none"> ➕ Desenvolvimento de aterosclerose em DN ➖ Sem ruptura espontânea de placas, trombose ou complicações

Figura 2. Modelos de camundongos geneticamente modificados mais utilizados em pesquisa com aterosclerose. (Fonte: Adaptado de Emini Veseli et al., 2017)

2.5.2 Modelos animais utilizando fêmeas

Um estudo conduzido na década de 90 indicou uma discrepância significativa entre a utilização de machos e fêmeas para estudos na área biomédica, onde os primeiros são utilizados de forma desproporcional. Já é consolidado que a forma como as doenças se manifestam e a resposta aos tratamentos apresentam sensíveis diferenças entre machos e fêmeas (CLAYTON, 2018; ZUCKER; BEERY, 2010).

Um estudo conduzido por Berry e Zuker (2011) demonstrou que em 6 importantes campos da área biomédica (biologia, imunologia, neurociências, fisiologia, farmacologia e endocrinologia) os animais mais utilizados são machos, chegando a 80% do total (BEERY; ZUCKER, 2011). Um estudo realizado no ano de 2009 comparou a utilização de fêmeas como modelo experimental para doenças específicas, e a prevalência dessas doenças em mulheres do

mundo inteiro. Os resultados obtidos foram alarmantes, demonstrando que para doenças que são predominantes em mulheres, incluindo a ansiedade e depressão, menos de 45% dos estudos foram conduzidos com animais fêmeas. Em patologias como o AVE e alterações da função tireoidiana, que chega a ser até 7 vezes mais comuns em mulheres, a utilização de fêmeas foi de apenas 38%. Além disso, os dados mostraram que os machos são utilizados quase que exclusivamente para protocolos experimentais que envolvem comportamento (ZUCKER; BEERY, 2010).

A preferência por machos como modelo experimental pode ser atribuída a interferência hormonal que as fêmeas apresentam em seu ciclo reprodutivo. Assim, justifica-se que o efeito hormonal dificulta as avaliações, causando uma grande variabilidade nos dados (CLAYTON, 2018; ZUCKER; BEERY, 2010). A interferência hormonal é destacada quando se trata de DCVs, dado ao potencial efeito antioxidante/cardioprotetor do estradiol, presente em grande quantidade no período reprodutivo das mulheres (MANSON et al., 2002). Pelo fato dessas doenças atingirem com mais frequência mulheres no período da menopausa, quando associada a idade, ou mulheres ainda dentro do período reprodutivos que utilizam anticoncepcional, algumas alternativas têm sido utilizadas por pesquisadores para simular essa condição de baixa produção de estrogênio. Uma dessas alternativas é a ovariectomia, que tem sido adotada por vários pesquisadores para induzir DCVs, como a HAS e disfunção endotelial (SCHAEDLER et al., 2018; WANG et al., 2014).

Dentre as DCVs que acometem as mulheres, a aterosclerose é a condição clínica onde mais se utiliza machos como modelo experimental. De fato, os estudos utilizando fêmeas como modelo são escassos. Isso deve-se não apenas a uma interferência hormonal cardioprotetora por parte das fêmeas, mas também ao metabolismo acelerado dos roedores, o que dificulta a indução dessa doença (HU et al., 2016a; JIANG et al., 2017a; LI; CHEN; SHEN, 2011). Assim, o desenvolvimento de um modelo para o estudo da aterosclerose em ratas mostra-se de grande valia, pois um protocolo de baixo custo e sexo-direcionado permitirá entender a fisiopatologia da doença aterosclerótica em mulheres e desenvolver tratamentos específicos para essa população.

3 OBJETIVOS

GERAL

Desenvolver um modelo preditivo para a indução da aterosclerose e comprometimento hepato-renal em ratas Wistar.

ESPECÍFICOS

Padronizar a dieta aterogênica;

Induzir a hipertensão arterial sistêmica em ratas utilizando modelo de inibição de oxido nítrico (NO) sintase por L-NAME (inibidor não seletivo);

Acompanhar a evolução da doença aterosclerótica;

Avaliar o impacto dos fatores utilizados no desenvolvimento da doença;

Avaliar diferentes parâmetros bioquímicos presentes no modelo experimental em questão;

Avaliar diferentes parâmetros histológicos presentes no modelo experimental em questão;

Avaliar diferentes parâmetros moleculares presentes no modelo experimental em questão.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIR, P. M.; WALSTON, J. D.; CAREY, R. M. Subcellular characteristics of functional intracellular renin-angiotensin systems. **Peptides**, v. 38, n. 2, p. 437–445, dez. 2012.
- ADAM, S. K. et al. Consumption of Repeatedly Heated Soy Oil Increases the Serum Parameters Related to Atherosclerosis in Ovariectomized Rats. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 3, p. 219–226, 2008.
- AGBOR-ETANG, B. B.; SETARO, J. F. Management of Hypertension in Patients with Ischemic Heart Disease. **Current Cardiology Reports**, v. 17, n. 12, p. 119, 20 out. 2015.
- AMBALE VENKATESH, B. et al. Association of longitudinal changes in left ventricular structure and function with myocardial fibrosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis study. **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 64, n. 3, p. 508–515, set. 2014.
- AMBROSE, J. A.; BARUA, R. S. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 43, n. 10, p. 1731–1737, maio 2004.
- AUBERGER, P. et al. Characterization of a natural inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase: cDNA cloning, purification, and anti-mitogenic activity. **Cell**, v. 58, n. 4, p. 631–640, ago. 1989.
- BEERY, A. K.; ZUCKER, I. Sex Bias in Neuroscience and Biomedical Research. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 35, n. 3, p. 565–572, jan. 2011.
- BERNARD, C.; UNIVERSITY COLLEGE, L. L. S. **An introduction to the study of experimental medicine / Translated by H.C. Greene.** [s.l.] U.S.A. : Schuman, 1865.
- BONOMINI, F. et al. Atherosclerosis and oxidative stress. **Histology and histopathology**, v. 23, n. 3, p. 10, 2008.
- BONTHU, S. et al. Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 17, n. 11, p. 2333–2340, 1997.
- BROUSSEAU, M. E.; HOEG, J. M. Transgenic rabbits as models for atherosclerosis research. **Journal of Lipid Research**, v. 40, n. 3, p. 365–375, mar. 1999.
- BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 147–152, 2014.
- CAREY, R. M. Functional intracellular renin-angiotensin systems: potential for pathophysiology of disease. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n. 5, p. R479-481, 1 mar. 2012.
- CHADE, A. R.; LERMAN, A.; LERMAN, L. O. Kidney in Early Atherosclerosis. **Hypertension**, v. 45, n. 6, p. 1042–1049, jun. 2005.

CHAPMAN, M. J. et al. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. **European Heart Journal**, v. 32, n. 11, p. 1345–1361, 1 jun. 2011.

CHAPPELL, M. C. Biochemical evaluation of the renin-angiotensin system: the good, bad, and absolute? **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 310, n. 2, p. H137–H152, 15 jan. 2016.

CHAWLA, A. et al. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5548, p. 1866–1870, 30 nov. 2001.

CLAYTON, J. A. Applying the new SABV (sex as a biological variable) policy to research and clinical care. **Physiology & Behavior**, v. 187, p. 2–5, abr. 2018.

CURTISS, L. K.; BOISVERT, W. A. Apolipoprotein E and atherosclerosis: **Current Opinion in Lipidology**, v. 11, n. 3, p. 243–251, jun. 2000.

DAI, G. et al. Biomechanical forces in atherosclerosis-resistant vascular regions regulate endothelial redox balance via phosphoinositol 3-kinase/Akt-dependent activation of Nrf2. **Circulation Research**, v. 101, n. 7, p. 723–733, 28 set. 2007.

DEFESCHE, J. C. Low-Density Lipoprotein Receptor - Its Structure, Function, and Mutations. **Seminars in Vascular Medicine**, v. 4, n. 1, p. 5–11, 2004.

DOGRU, T. et al. Plasma fetuin-A is associated with endothelial dysfunction and subclinical atherosclerosis in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical Endocrinology**, v. 78, n. 5, p. 712–717, maio 2013.

DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 1 jan. 2002.

DUBEY, R. K. et al. Sex hormones and hypertension. **Cardiovascular Research**, p. 21, 2017.

DUEWELL, P. et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1357–1361, abr. 2010.

EMERSON, M. Refinement, reduction and replacement approaches to in vivo cardiovascular research. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, n. 4, p. 749–754, out. 2010.

EMINI VESELI, B. et al. Animal models of atherosclerosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 816, p. 3–13, 5 dez. 2017.

FALUDI, A. et al. ATUALIZAÇÃO DA DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE - 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 1, 2017.

FAN, J. et al. Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine. **Pharmacology & therapeutics**, v. 0, p. 104–119, fev. 2015.

FAN, J.; WATANABE, T. Cholesterol-fed and Transgenic Rabbit Models for the Study of Atherosclerosis. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 7, n. 1, p. 26–32, 2000.

FARRELL, G. C.; LARTER, C. Z. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 43, n. 2 Suppl 1, p. S99–S112, fev. 2006.

FERNANDEZ, M. L. et al. Hamsters and guinea pigs differ in their plasma lipoprotein cholesterol distribution when fed diets varying in animal protein, soluble fiber, or cholesterol content. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1323–1332, jul. 1999.

FU, W.-J. et al. Anti-atherosclerosis and cardio-protective effects of the Angong Niuhuang Pill on a high fat and vitamin D3 induced rodent model of atherosclerosis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 195, p. 118–126, 4 jan. 2017.

FUSTER, J. J. et al. Animal Models of Atherosclerosis. In: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [s.l.] Elsevier, 2012. v. 105p. 1–23.

GAGGINI, M. et al. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Its Connection with Insulin Resistance, Dyslipidemia, Atherosclerosis and Coronary Heart Disease. **Nutrients**, v. 5, n. 5, p. 1544–1560, 10 maio 2013.

GARCIA, G. C.; CALDEIRA, T. R. Dislipidemia. **ANVISA - Saúde e Economia**, n. 3, p. 1–4, 2011.

GETZ, G. S.; REARDON, C. A. Animal models of atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 5, p. 1104–1115, maio 2012.

GISTERÅ, A.; HANSSON, G. K. The immunology of atherosclerosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 13, n. 6, p. 368–380, jun. 2017.

GLASSER, S. P.; SELWYN, A. P.; GANZ, P. Atherosclerosis: Risk factors and the vascular endothelium. **American Heart Journal**, v. 131, n. 2, p. 379–384, fev. 1996.

GRUNDY, S. M. Hypertriglyceridemia, Atherogenic Dyslipidemia, and the Metabolic Syndrome. **The American Journal of Cardiology**, v. 81, n. 4, p. 18B–25B, fev. 1998.

GRUNDY, S. M. et al. An International Atherosclerosis Society Position Paper: global recommendations for the management of dyslipidemia--full report. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 8, n. 1, p. 29–60, fev. 2014.

HAMILTON, C. A. et al. Strategies to reduce oxidative stress in cardiovascular disease. **Clinical Science**, v. 106, n. 3, p. 219–234, 1 mar. 2004.

HANSEN, K. J. et al. Prevalence of renovascular disease in the elderly: a population-based study. **Journal of Vascular Surgery**, v. 36, n. 3, p. 443–451, set. 2002.

HARRISON, D. et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis. **The American Journal of Cardiology**, v. 91, n. 3, Supplement, p. 7–11, 6 fev. 2003.

HARTVIGSEN, K. et al. A diet-induced hypercholesterolemic murine model to study atherogenesis without obesity and metabolic syndrome. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 4, p. 878–885, 2007.

HERRERA, V. L. et al. Spontaneous combined hyperlipidemia, coronary heart disease and decreased survival in Dahl salt-sensitive hypertensive rats transgenic for human cholesteryl ester transfer protein. **Nature Medicine**, v. 5, n. 12, p. 1383–1389, dez. 1999.

HU, Y. et al. Icarin Attenuates High-cholesterol Diet Induced Atherosclerosis in Rats by Inhibition of Inflammatory Response and p38 MAPK Signaling Pathway. **Inflammation**, v. 39, n. 1, p. 228–236, 2016a.

HU, Y. et al. Icarin Attenuates High-cholesterol Diet Induced Atherosclerosis in Rats by Inhibition of Inflammatory Response and p38 MAPK Signaling Pathway. **Inflammation**, v. 39, n. 1, p. 228–236, fev. 2016b.

HUANG, Q. et al. AIP1 suppresses atherosclerosis by limiting hyperlipidemia-induced inflammation and vascular endothelial dysfunction. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 33, n. 4, p. 795–804, abr. 2013.

HURTUBISE, J. et al. The Different Facets of Dyslipidemia and Hypertension in Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 18, n. 12, p. 82, 7 nov. 2016.

IGNATOWSKI, A. I. Influence of animal food on the organism of rabbits. **Izv Imp Voyenno-Med Akad Peter**, v. 16, p. 154–173, 1908.

ISHIBASHI, S. et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 2, p. 883–893, 1 ago. 1993.

ISHIBASHI, S. et al. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 5, p. 1885–1893, 1 maio 1994.

JACOB, H. J. The Rat: A Model Used in Biomedical Research. In: ANEGON, I. (Ed.). . **Rat Genomics: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. p. 1–11.

JAWIEN, J.; NASTALEK, P.; KORBUT, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 503–517, 2004.

JIANG, Y. et al. Effects of the ethanol extract of black mulberry (*Morus nigra* L.) fruit on experimental atherosclerosis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 200, p. 228–235, 2017a.

JIANG, Y. et al. Effects of the ethanol extract of black mulberry (*Morus nigra* L.) fruit on experimental atherosclerosis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 200, p. 228–235, mar. 2017b.

JORIS, I. et al. Studies on the pathogenesis of atherosclerosis. I. Adhesion and emigration of mononuclear cells in the aorta of hypercholesterolemic rats. **The American Journal of Pathology**, v. 113, n. 3, p. 341–358, dez. 1983.

KAMANNA, V. S.; ROH, D. D.; KIRSCHENBAUM, M. A. Hyperlipidemia and kidney disease: concepts derived from histopathology and cell biology of the glomerulus. **Histology and Histopathology**, v. 13, n. 1, p. 169–179, 1998.

- KANNEL, W. B. Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 275, n. 20, p. 1571–1576, 22 maio 1996.
- KAPOURCHALI, F. R. et al. Animal models of atherosclerosis. **World Journal of Clinical Cases : WJCC**, v. 2, n. 5, p. 126–132, 16 maio 2014.
- KNOWLES, J. W.; MAEDA, N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, n. 11, p. 2336–2345, 2000.
- KUBO, T. et al. Assessment of culprit lesion morphology in acute myocardial infarction: ability of optical coherence tomography compared with intravascular ultrasound and coronary angiography. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 50, n. 10, p. 933–939, 4 set. 2007.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. S. **Robbins Patologia Básica**. 9^a ed. [s.l.] Elsevier, 2013.
- LEE, Y. et al. Polarity index dependence of M13 bacteriophage-based nanostructure for structural color-based sensing. **Current Optics and Photonics**, v. 1, n. 1, p. 12–16, 2017.
- LEONG, X.-F.; NG, C.-Y.; JAARIN, K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–11, 2015.
- LI, H.; HORKE, S.; FÖRSTERMANN, U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 237, n. 1, p. 208–219, nov. 2014.
- LI, J.; CHEN, C. X.; SHEN, Y. H. Effects of total glucosides from paeony (*Paeonia lactiflora* Pall) roots on experimental atherosclerosis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 469–475, 2011.
- LI, Y. et al. Rosuvastatin attenuates atherosclerosis in rats via activation of scavenger receptor class B type I. **European Journal of Pharmacology**, v. 723, p. 23–28, jan. 2014.
- LIBBY, P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 2, p. 456S-460S, 1 fev. 2006.
- LIBBY, P.; DICARLI, M.; WEISSLEDER, R. The Vascular Biology of Atherosclerosis and Imaging Targets. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 51, n. Supplement_1, p. 33S-37S, 1 maio 2010.
- LIVERO, F. A. D. R.; GASPAROTTO JUNIOR, A. Non-genetic rats models for atherosclerosis research: from past to present. **Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)**, v. 11, p. 203–213, 1 jun. 2019.
- LOPPNOW, H.; LIBBY, P. Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. **Journal of Clinical Investigation**, v. 85, n. 3, p. 731–738, 1 mar. 1990.
- LUCZAK, M. et al. Deeper insight into chronic kidney disease-related atherosclerosis: comparative proteomic studies of blood plasma using 2DE and mass spectrometry. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, p. 20, 27 jan. 2015.

- MAIER, W. et al. Inflammatory Markers at the Site of Ruptured Plaque in Acute Myocardial Infarction: Locally Increased Interleukin-6 and Serum Amyloid A but Decreased C-Reactive Protein. **Circulation**, v. 111, n. 11, p. 1355–1361, 22 mar. 2005.
- MALACHIAS, M. V. B. et al. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 1 - Concept, Epidemiology and Primary Prevention. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, p. 1–6, set. 2016.
- MANSON, J. E. et al. Hormone Replacement Therapy , and Incident Coronary Heart Disease. **JAMA**, v. 288, n. 8, p. 980–987, 2002.
- MARCHESINI, G. et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 37, n. 4, p. 917–923, abr. 2003.
- MCKIMMIE, R. L. et al. Hepatic steatosis and subclinical cardiovascular disease in a cohort enriched for type 2 diabetes: the Diabetes Heart Study. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 103, n. 12, p. 3029–3035, dez. 2008.
- MILLER, N. E. Associations of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. **American Heart Journal**, v. 113, n. 2 Pt 2, p. 589–597, fev. 1987.
- MOGHADASIAN, M. H.; FROHLICH, J. J.; MCMANUS, B. M. Advances in Experimental Dyslipidemia and Atherosclerosis. **Laboratory Investigation**, v. 81, n. 9, p. 1173–1183, set. 2001.
- NAGHAVI, M. et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. **Circulation**, v. 108, n. 14, p. 1664–1672, 7 out. 2003.
- NAVAB, M. et al. Mechanisms of disease: proatherogenic HDL--an evolving field. **Nature Clinical Practice. Endocrinology & Metabolism**, v. 2, n. 9, p. 504–511, set. 2006.
- NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 330, n. 6, p. 326–335, dez. 2005.
- NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. Fatty liver and the metabolic syndrome. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 23, n. 2, p. 193–198, mar. 2007.
- NIIMI, M. et al. ApoE knockout rabbits: A novel model for the study of human hyperlipidemia. **Atherosclerosis**, v. 245, p. 187–193, fev. 2016.
- OKAMOTO, K. et al. CARDIOVASCULAR DISEASES IN THE SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RAT. **Japanese Circulation Journal**, v. 28, p. 943–952, dez. 1964.
- OLIVEIRA HELENA C.F. et al. Cholesteryl Ester Transfer Protein Activity Enhances Plasma Cholesteryl Ester Formation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 17, n. 6, p. 1045–1052, 1 jun. 1997.
- PAL, D. et al. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 18, n. 8, p. 1279–1285, ago. 2012.

- PAN, W. H. et al. Associations between carotid atherosclerosis and high factor VIII activity, dyslipidemia, and hypertension. **Stroke**, v. 28, n. 1, p. 88–94, jan. 1997.
- PEIRE, M. A.; PUIG–PARELLADA, P. OXYGEN-FREE RADICALS AND NITRIC OXIDE ARE INVOLVED IN THE THROMBUS GROWTH PRODUCED BY IONTOPHORESIS OF ADP. **Pharmacological Research**, v. 38, n. 5, p. 353–356, 1 nov. 1998.
- PETERS, S. A. E. et al. Improvements in risk stratification for the occurrence of cardiovascular disease by imaging subclinical atherosclerosis: a systematic review. **Heart**, v. 98, n. 3, p. 177–184, 1 fev. 2012.
- PIEDRAHITA, J. A. et al. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 10, p. 4471–4475, 15 maio 1992.
- PLUMP, A. S. et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**, v. 71, n. 2, p. 343–353, 16 out. 1992.
- PLUMP, A. S.; BRESLOW, J. L. Apolipoprotein E and the Apolipoprotein E-Deficient Mouse. **Annual Review of Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 495–518, 1 jul. 1995.
- PURUSHOTHAM, A. et al. Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation. **Cell Metabolism**, v. 9, n. 4, p. 327–338, 8 abr. 2009.
- RITTIG, K. et al. High plasma fetuin-A is associated with increased carotid intima-media thickness in a middle-aged population. **Atherosclerosis**, v. 207, n. 2, p. 341–342, dez. 2009.
- ROSENBLAT, M.; COLEMAN, R.; AVIRAM, M. Increased macrophage glutathione content reduces cell-mediated oxidation of LDL and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Atherosclerosis**, v. 163, n. 1, p. 17–28, 1 jul. 2002.
- RUSSELL, J. C. Of mice and men, rats and atherosclerosis. **Cardiovascular Research**, v. 59, n. 4, p. 810–811, 1 out. 2003.
- RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen, 1959.
- SASAKI, S. et al. Association of Blood Pressure Variability With Induction of Atherosclerosis in Cholesterol-Fed Rats. **American Journal of Hypertension**, v. 7, n. 5, p. 453–459, maio 1994.
- SCHAEDLER, M. I. et al. Redox regulation and NO/cGMP plus K⁺ channel activation contributes to cardiorenal protection induced by *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. in ovariectomized hypertensive rats. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 51, p. 7–19, 1 dez. 2018.
- SEHAYEK, E. et al. Apolipoprotein E regulates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol excretion: Studies in C57BL/6 apolipoprotein E knockout mice. **Proceedings of**

the **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 3433–3437, 2000.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 9–10, p. 916–921, nov. 1999.

SILVA, P. M.; CARDOSO, S. M.; FERREIRA, A. M. Persistent lipid abnormalities in patients with hypertension and dyslipidemia treated with statins: results of the Portuguese hypertensive subpopulation of the Dyslipidemia International Study (DYSIS). **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 37, n. 2, p. 116–121, 17 fev. 2015.

STEFAN, N. et al. Plasma Fetuin-A Levels and the Risk of Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 57, n. 10, p. 2762–2767, 1 out. 2008.

STÖGER, J. L. et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 225, n. 2, p. 461–468, dez. 2012.

SULTANA, S.; ASIF, H. M. Medicinal plants combating against hypertension: A green antihypertensive approach. **Pak. J. Pharm. Sci.**, p. 10, 2017.

TAKAHASHI, Y.; FUKUSATO, T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 42, p. 15539–15548, 14 nov. 2014.

TARGHER, G. et al. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with carotid artery wall thickness in diet-controlled type 2 diabetic patients. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 29, n. 1, p. 55–60, jan. 2006.

UMAR, A. et al. Antihypertensive effects of *Ocimum basilicum* L. (OBL) on blood pressure in renovascular hypertensive rats. **Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 33, n. 7, p. 727–730, jul. 2010.

UZU, T. et al. Prevalence and outcome of renal artery stenosis in atherosclerotic patients with renal dysfunction. **Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 25, n. 4, p. 537–542, jul. 2002.

WANG, D. et al. Endothelial dysfunction and enhanced contractility in microvessels from ovariectomized rats roles of oxidative stress and perivascular adipose tissue. **Hypertension**, v. 63, n. 5, p. 1063–1069, 2014.

WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENIG, G. Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells. **Hypertension**, v. 44, n. 4, p. 381–386, out. 2004.

WATANABE, Y. Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit) *Incidence and development of atherosclerosis and xanthoma. **Atherosclerosis**, v. 36, n. 2, p. 261–268, jun. 1980.

XIANGDONG, L. et al. Animal models for the atherosclerosis research: a review. **Protein & Cell**, v. 2, n. 3, p. 189–201, mar. 2011.

ZUCKER, I.; BEERY, A. K. Males still dominate animal studies. **Nature**, v. 465, n. 7299, p. 690–690, jun. 2010.

5 APÊNDICE



Article

Development of a Predictive Model to Induce Atherogenesis and Hepato-Renal Impairment in Female Rats

Lucas Pires Guarnier ¹ , Paulo Vitor Moreira Romão ¹, Rhanany Alan Calloi Palozi ¹ , Anieli Oliveira Silva ¹, Bethânia Rosa Lorençone ¹, Aline Aparecida Macedo Marques ¹, Ariany Carvalho dos Santos ¹, Roosevelt Isaias Carvalho Souza ¹, Karine Delgado Souza ², Emerson Luiz Botelho Lourenço ² and Arquimedes Gasparotto Junior ^{1,*}

¹ Laboratory of Electrophysiology and Cardiovascular Pharmacology, Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS 79825-070, Brazil; lucasp.guarnier@gmail.com (L.P.G.); paulovitor_moreiraromao@hotmail.com (P.V.M.R.); palozirhanany@gmail.com (R.A.C.P.); anieli.oliiveira@gmail.com (A.O.S.); bethaniasalorencone@hotmail.com (B.R.L.); alinemarques_nutri@hotmail.com (A.A.M.M.); ArianySantos@ufgd.edu.br (A.C.d.S.); RooseveltSouza@ufgd.edu.br (R.I.C.S.)

² Laboratory of Preclinical Research of Natural Products, Paranaense University (UNIPAR), Umuarama, PR 87502-210, Brazil; karinedsd@hotmail.com (K.D.S.); emerson@prof.unipar.br (E.L.B.L.)

* Correspondence: arquimedesjunior@ufgd.edu.br; Tel.: +55-(67)-3410-2333; Fax: +55-(67)-3410-2321

Received: 27 August 2019; Accepted: 20 September 2019; Published: 29 October 2019



Abstract: Therapeutic approaches for the treatment of dyslipidemia and atherosclerosis have radically changed in recent decades. Part of this advance undeniably stems from basic biomedical research that has provided a better understanding and identification of new therapeutic targets. The aim of this work was to develop a model to induce atherogenesis and hepato-renal impairment in female Wistar rats. The following groups received the respective treatments for 60 days: control animals, non-ovariectomized rats that received an atherogenic diet (NEAD), ovariectomized rats that received an atherogenic diet (NOAD), non-ovariectomized rats that received an atherogenic diet and oral N ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME; LEAD), and ovariectomized rats that received an atherogenic diet and oral L-NAME (LOAD). Animals in the NEAD, NOAD, LEAD, and LOAD groups also received methimazole and cholecalciferol daily. Urinary, biochemical, hemodynamic, and electrocardiographic parameters and renal function were assessed. Samples of the liver, heart, kidney, and arteries were collected to investigate redox status and perform histopathological analyses. All of the groups developed dyslipidemia and hepatic steatosis. Only the NEAD group developed arterial lesions that were compatible with fatty streaks. Renal function was significantly impaired in the LEAD and NOAD groups. These results indicate a viable alternative to induce atherogenesis and hepato-renal impairment in female rats.

Keywords: atherosclerosis; dyslipidemia; hepatic steatosis; kidney failure

1. Introduction

Atherosclerosis is a multifactorial condition that is associated with chronic inflammatory lesions in the arterial wall. One of the main triggers of atherosclerosis is dyslipidemia, but a wide range of extra-dietary factors may also be involved, including hypertension, smoking, and a sedentary lifestyle [1–3]. One of the main factors that is responsible for the genesis of this pathology is low-density lipoprotein (LDL). The deposition of these molecules in the subendothelial space, followed by their oxidation (oxLDL), can be considered a limiting step. Oxidized-LDL particles induce an inflammatory

response that is mediated by interleukin (IL)-1 and IL-6, resulting in the activation of adhesion molecules (intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular adhesion molecule 1 (VCAM-1)) [4]. Thus, monocyte infiltration into the subendothelial space elicits macrophages that phagocytize oxLDL molecules and become foam cells. The inflammatory response is also responsible for the migration of smooth muscle cells that secrete extracellular matrix proteins [5]. More advanced plaques are characterized by a necrotic center and neovascularization, covered by a thin fibrous cap that separates the plaques from the bloodstream. Plaques may remain stable for years but can quickly become unstable, disrupting and triggering thrombus formation and leading to a higher risk of acute cardiovascular events [6]. Consequently, atherosclerosis may lead to renal impairment, coronary heart disease, and stroke [1,7].

In addition to vascular injury itself, dyslipidemias are also involved in a wide range of diseases. Several other organs may be affected by lipid imbalance, among which the heart, kidneys, and liver are notable. The reduction of renal and hepatic function is an important factor that exacerbates subjacent cardiovascular disease and increases its morbidity and mortality [8]. Moreover, steatosis is the main cause of non-alcoholic fatty liver disease and is also associated with higher long-term mortality [3].

Therapeutic approaches for the treatment of dyslipidemia and atherosclerosis have changed radically in recent decades, mainly through a better understanding of the pathophysiological basis of the disease [9]. This advance has undeniably stemmed from basic biomedical research that has provided a better understanding and identification of new therapeutic targets [10]. One of the main problems of existing animal models, however, is their limited ability to reproduce many important pathophysiological aspects of the disease. Some models are promising and easily reproducible, but others have no resemblance to disease progression in humans [11]. Well-established animal models are generally based on the formation of atheromatous plaques that are induced by high-cholesterol diets and genetic manipulation of the pathways that are involved in cholesterol transport and metabolism. The most commonly used animal species for research on atherosclerosis and comorbid pathologies are guinea pigs, hamsters, rabbits, rats, and mice [12]. However, rodents generally have high resistance to the development of atherosclerotic plaques. Murine genetic models are currently the most widely used in preclinical research because they may exhibit different stages of the disease through the activation or inhibition of specific cells or biological pathways. The most used genetic models for studying atherosclerosis are apolipoprotein E homozygous knockout ($apoE^{-/-}$) and LDL receptor homozygous knockout ($LDLR^{-/-}$) models [13]. Despite the speed at which these models develop the disease, they do not accurately reproduce pathophysiological conditions that determine evolution of the disease in humans. Thus, there is currently an important gap in the development of non-genetic rodent models to study the disease. Associations between multiple risk factors (e.g., diet, gender, environmental factors, pharmacological manipulations, and associated pathological conditions) appear to be a plausible alternative to mimic the prevalent conditions that are observed in humans [14]. Therefore, the main objective of the present work was to develop a predictive model to induce atherogenesis and hepato-renal impairment in female rats. We also evaluated the impact of estradiol and nitric oxide (NO) in the proposed models.

2. Materials and Methods

2.1. Drugs

The following drugs, salts, and solutions were used: ketamine hydrochloride (Syntec, São Paulo, SP, Brazil), xylazine hydrochloride (Syntec, São Paulo, SP, Brazil), and heparin (Hipolabor, Belo Horizonte, MG, Brazil). *N* ω -nitro-*L*-arginine methyl ester hydrochloride (*L*-NAME), phenylephrine (Phe), sodium nitroprusside, acetylcholine, NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄, NaHCO₃, KH₂PO₄, dextrose, ethylenediaminetetraacetic acid, cholesterol, cholecalciferol, colic acid, and methimazole were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All of the other reagents were obtained in analytical grade.

2.2. Animals and Experimental Design

2.2.1. Animals

Twelve week old female Wistar rats, weighing 220–250 g, were housed in plastic cages with environmental enrichment at 22 ± 2 °C and $55\% \pm 10\%$ humidity under a 12 h/12 h light/dark cycle. The animals had ad libitum access to food and water. All of the experimental procedures were approved by the Institutional Ethics Committee of Federal University of Grande Dourados (protocol no. 13/2018; approved 22 March 2018) and conducted in agreement with the Brazilian Legal Framework on the Scientific Use of Animals.

2.2.2. Ovariectomy

Female rats were intraperitoneally anesthetized with 100 mg/kg ketamine plus 20 mg/kg xylazine. The animals then underwent laparotomy, and the two ovaries were gently removed. The non-ovariectomized groups (including the control group) underwent laparotomy, but the ovaries were not removed. After the surgical procedure, the animals were hydrated with saline solution (2 mL, subcutaneously, single administration) and received the anti-inflammatory drug ketoprofen (5 mg/kg, orally, every 12 h for 3 days) and antibiotic enrofloxacin (10 mg/kg, subcutaneously, single dose).

2.2.3. Groups and Induction of Atherogenesis and Hepato-Renal Impairment

The animals were randomly allocated to the following groups ($n = 8/\text{group}$): normotensive and non-ovariectomized rats that received a standard diet (control rats), normotensive and non-ovariectomized rats that received an atherogenic diet (NEAD), normotensive and ovariectomized rats that received an atherogenic diet (NOAD), normotensive and non-ovariectomized rats that received an atherogenic diet and oral L-NAME (25 mg/kg; LEAD), and normotensive and ovariectomized rats that received an atherogenic diet and oral L-NAME (25 mg/kg; LOAD). The atherogenic diet had the following composition: 64.4% standard diet, 0.5% cholesterol, 0.1% sodium cholate, 5% sucrose, 5% lard, 5% hydrogenated fat, and 20% egg powder. Animals in the NEAD, NOAD, LEAD, and LOAD groups received oral methimazole (2 mg/kg) daily and four intraperitoneal injections (every 2 days) of 175,000 IU/kg cholecalciferol at each dose [15]. All of the treatments were performed for 60 days. Body weight gain was monitored throughout the experimental period.

2.3. Experimental Procedures

2.3.1. Renal Function Assay

These experiments were performed on the first day after beginning the treatments and at the end of the experiment period (60 days). All of the animals were placed in metabolic cages for 24 h with food and water ad libitum. Twenty-four hour urine volume, pH, and density were measured. An aliquot was collected for electrolyte (sodium, potassium, calcium, chloride, and magnesium) and creatinine determination.

2.3.2. Electrocardiography

At the end of the experiment period, the animals were intramuscularly anesthetized with 100 mg/kg ketamine plus 20 mg/kg xylazine. After anesthesia, all of the rats underwent electrocardiography (ECG) according to the methodology of Romão et al. [16]. Using four alligator clips, the electrodes were positioned on the animal's two forelimbs and two hindlimbs. An acclimatization period of 5 min elapsed, and ECG waves were recorded for 5 min. Electrocardiography was recorded using a 12-lead ECG recorder (WinCardio, Micromed, Brasilia, Brazil) [16].

2.3.3. Blood Pressure Measurement

After ECG recording and while under deep anesthesia, systolic blood pressure (SBP) and mean arterial pressure (MAP) were determined by the direct method according to Gasparotto Junior et al. [17]. A subcutaneous injection of heparin (30 IU) was first administered. The left carotid artery was then isolated, cannulated, and connected to a pressure transducer that was coupled to a PowerLab system with Chart 7.1 software (ADInstruments, Castle Hill, Australia), and SBP, DBP (diastolic blood pressure), and MAP were recorded for 20 min.

2.3.4. Renal and Mesenteric Vascular Bed Reactivity

After the direct blood pressure measurements, the mesenteric vascular bed (MVB) and left kidney were isolated and prepared for perfusion according to previously described methods [18]. The renal artery was first cannulated, followed by cannulation of the superior mesenteric artery. The kidney and MVB were removed, isolated, coupled in a perfusion system, and continuously perfused with physiological saline solution (PSS; 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.4 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 25.0 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 11.1 mM dextrose, and 0.03 mM ethylenediaminetetraacetic acid) that was aerated with 95% O₂ and 5% CO₂ at a constant flow rate of 4 mL/min. Changes in perfusion pressure (PP; mmHg) were captured by a pressure transducer that was connected to the PowerLab system and Chart 7.1 software (ADInstruments, Castle Hill, Australia). After a stabilization time of 30 min, tissue integrity was assessed with a bolus injection of KCl (120 mmol). Different doses of Phe were then administered in the MVB (1, 3, 10, and 30 nmol, 10–30 µL) and kidney (0.1, 0.3, 1, and 3 nmol, 10–30 µL) preparations. Angiotensin II (AngII) was administered only in the kidney preparations (1, 3, 10, and 30 pmol, 10–30 µL). After a new stabilization time of 30 min, the tissues were continuously perfused with PSS plus 3 µM Phe to induce a prolonged increase in perfusion pressure. After stabilization of the contractile process, vascular reactivity to acetylcholine (ACh; MVB: 1, 3, 10, and 30 pmol; kidneys: 0.03, 0.1, 0.3, and 1 nmol) and sodium nitroprusside (SNP; MVB: 0.1, 0.3, 1, and 3 pmol; kidneys: 0.3, 1, 3, and 10 nmol) was evaluated. A 10 min period elapsed between each drug administration. At the end of the experiments, the animals were euthanized by deep anesthesia in a saturation chamber (isoflurane with >20% saturation).

2.3.5. Biochemical Analyses

Immediately before euthanasia, blood samples were collected from the previously cannulated left carotid artery. Serum was obtained by centrifugation at 1500× *g* for 10 min. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), indirect bilirubin, direct bilirubin, total bilirubin, total protein, albumin, globulin, the albumin/globulin ratio, creatinine, urea, triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), alkaline phosphatase, γ -glutamyl transpeptidase (GGT), sodium, calcium, magnesium, chloride, and potassium levels were measured using an automated biochemical analyzer (Roche Cobas Integra 400 plus). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and very-low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) were calculated according to the Friedwald formula [5]. Serum oxLDL, nitrotyrosine (NT), soluble VCAM-1 (sVCAM-1), soluble ICAM-1 (sICAM-1), IL-1 β , and IL-6 levels were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Malondialdehyde (MDA) levels were measured using an MDA assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Estradiol, thyroid-stimulating hormone (TSH), and free triiodothyronine (T3) were measured using a chemiluminescence immunoassay. Hepatic triglyceride content was measured using a previously described method [19].

2.3.6. Relative Organ Weight

After euthanasia, the heart, right kidney, and liver were cleaned, weighed, and longitudinally sectioned. The relative organ weight was determined as the following: Relative Weight (RW)% = absolute organ weight \times 100/body weight.

2.3.7. Tissue Redox Status

Samples of the aorta, heart (ventricular muscle), and right kidney were homogenized in phosphate buffer (pH 6.5) and centrifuged at $5269\times g$ for 20 min at 4 °C. Different dilutions were used for each tissue. The following enzymes were evaluated in the supernatant: catalase (CAT; according to [20]) and superoxide dismutase (SOD; according to [21]). Lipoperoxidation (LPO) rate was measured using the FOX2 method adapted by Jiang et al. [22]. The results were expressed as the amount of protein in the homogenates. The protein concentration of the samples was determined using the Bradford method [23].

2.3.8. Histopathology and Morphometry

Parts of the left ventricle, right kidney, liver, subclavian artery, and right carotid artery were placed in 10% buffered formalin. The samples were then dehydrated in alcohol, cleared with xylene, and embedded in paraffin. The samples were sectioned (5 mm) and stained with hematoxylin-eosin and orcein (arteries) and examined under a light microscope. Right and left ventricles and interventricular septum were measured. The intima layer of the subclavian and carotid artery was also measured. We assembled several blades with the entire arterial branch. All neointimal formations were identified per slide. For each atherosclerotic formation, six lines of division were established. For each neointimal formation, we performed six measurements, and one mean for each slide was calculated. When all of the slides were evaluated, a new mean for each animal was calculated. The area of the microscope was adjusted using an ocular micrometer with a 100 \times objective to determine the size of the field per square micrometer (μm^2). All images were obtained and evaluated using Motic Images Plus 2.0 software.

2.4. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test. The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of $n = 8$ animals per group. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Renal Function

Different urinary parameters in the various groups over 60 days of treatment are presented in Table 1. Animals in the LEAD and LOAD groups presented significantly lower urinary chloride, potassium, and sodium levels compared with the control group. The LOAD group exhibited significantly lower urinary creatinine levels than the control group.

Table 1. Urinary parameters in the various groups over 60 days of treatment.

Parameter	NEAD	NOAD	LEAD	LOAD	Control
Urinary volume (mL/100 g/24 h)	12.54 \pm 4.70	16.04 \pm 5.35	19.42 \pm 8.19	15.21 \pm 1.58	12.6 \pm 2.30
Chloride (mmol/dL)	171.5 \pm 12.92	136.79 \pm 22.05	82.37 \pm 11.25 ^a	73.50 \pm 11.81 ^a	141.07 \pm 18.31
Magnesium (mg/dL)	20.45 \pm 8.56	32.53 \pm 7.81	19.465 \pm 8.78	21.26 \pm 10.70	14.57 \pm 4.04
Potassium (mmol/L)	112.20 \pm 19.62	124.42 \pm 31.72	70.93 \pm 28.54 ^a	65.17 \pm 17.91 ^a	140.16 \pm 14.25
Sodium (mEq/L)	108.68 \pm 29.89	127.72 \pm 126.98	75.62 \pm 15.33 ^a	63.08 \pm 16.45 ^a	120.32 \pm 13.13
Calcium (mg/dL)	45.47 \pm 10.31	54.26 \pm 21.53	32.85 \pm 9.34	47.32 \pm 19.83	26.72 \pm 8.10
Creatinine (mg/dL)	40.71 \pm 24.74	49.74 \pm 21.17	30.38 \pm 11.34	28.03 \pm 6.43 ^a	54.47 \pm 6.30
pH	6.16 \pm 0.48	6.03 \pm 0.56	6.33 \pm 0.10	6.03 \pm 0.20	7.1 \pm 0.43

The data are expressed as the mean \pm SEM of $n = 8$ rats per group compared with the control group (^a $p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. LEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and oral $N\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME); LOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME; NEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol; NOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol.

3.2. Electrocardiographic Parameters

No significant electrocardiographic changes were observed among the different experimental groups (Table 2).

Table 2. Electrocardiographic parameters in the various groups over 60 days of treatment.

Parameter	NEAD	NOAD	LEAD	LOAD	Control
PR segment (ms)	45.29 ± 1.59	49 ± 3.86	45.29 ± 3.61	42.5 ± 2.90	46.67 ± 2.72
QRS segment (ms)	39.57 ± 1.67	36 ± 0.95	38.71 ± 1.80	37.8 ± 1.06	37.89 ± 1.36
QT segment (ms)	131.6 ± 9.41	141 ± 9.41	141.7 ± 10.61	132.4 ± 11.17	134.1 ± 7.66
QTC segment (ms)	234.9 ± 15.69	256.1 ± 12.92	261.3 ± 25.07	242 ± 18.44	232.7 ± 9.891
P wave (mV)	0.063 ± 0.003	0.083 ± 0.011	0.084 ± 0.01	0.089 ± 0.006	0.084 ± 0.004
Q wave (mV)	−0.013 ± 0.002	−0.011 ± 0.001	−0.011 ± 0.001	−0.012 ± 0.001	−0.011 ± 0.002
R wave (mV)	0.38 ± 0.02	0.43 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.01

The data are expressed as the mean ± SEM of $n = 8$ rats per group. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. LEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME; LOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME; NEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol; NOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol. mV, millivolt; ms, millisecond.

3.3. Blood Pressure and Heart Rate Values

Blood pressure and heart rate data in the different groups are presented in Table 3. We found a significant increase in SBP only in the LOAD group when compared with the control.

Table 3. Blood pressure and heart rate values in the various groups over 60 days of treatment.

Parameter	NEAD	NOAD	LEAD	LOAD	Control
DBP (mmHg)	63.24 ± 4.26	60.42 ± 5.12	60.25 ± 4.32	58.82 ± 3.31	61.88 ± 3.84
SBP (mmHg)	100.55 ± 9.05	100.74 ± 10.88	109.24 ± 6.77	117.3 ± 3.88 ^a	99.7 ± 4.43
MAP (mmHg)	84.95 ± 6.33	69.26 ± 3.98	83.33 ± 4.64	75.86 ± 3.51	68.84 ± 6.24
HR (bpm)	214.9 ± 19.16	211.6 ± 16.9	159.5 ± 11.42	206.8 ± 15.35	175.3 ± 7.319

The data are expressed as mean ± SEM of $n = 8$ rats per group compared with the control group (^a $p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. DBP, diastolic blood pressure; HR, heart rate. LEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME; LOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME; MAP, mean arterial pressure; NEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol; NOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol; SBP, systolic blood pressure;

3.4. Biochemical Analyses

Biochemical parameters in the various experimental groups over 60 days of treatment are presented in Table 4. The LEAD and LOAD groups exhibited a significant increase in serum globulin levels and the albumin/globulin ratio compared with the control. Serum TG, TC, LDL-C, VLDL-C, and HDL-C levels significantly increased in the NEAD, NOAD, LEAD, and LOAD groups. HDL-C levels were significantly higher in the NOAD, LEAD, and LOAD compared with the NEAD group. LDL-C levels were significantly higher in the NEAD group when compared with all of the other experimental groups. Hepatic TG values were also significantly higher in the NEAD, NOAD, LEAD, and LOAD groups compared with the control.

Table 4. Biochemical parameters in the various groups over 60 days of treatment.

Parameter	NEAD	NOAD	LEAD	LOAD	Control
Total protein (g/dL)	6.21 ± 0.83	6.51 ± 1.14	6.62 ± 0.48	6.64 ± 0.66	6.24 ± 0.59
Albumin (g/dL)	3.61 ± 0.42	3.85 ± 0.72	3.53 ± 0.45	3.64 ± 0.52	4.10 ± 0.35
Globulin (g/dL)	2.60 ± 0.51	2.65 ± 0.53	3.08 ± 0.26 ^a	3.01 ± 0.16 ^a	2.12 ± 0.18
Alb/Glob	1.42 ± 0.28	1.47 ± 0.26	1.15 ± 0.19 ^a	1.22 ± 0.13 ^a	1.91 ± 0.13
AST (U/L)	120.71 ± 46.02	127.72 ± 103.50	116.14 ± 52.50	124.12 ± 46.75	171.83 ± 43.21
ALT (U/L)	56.18 ± 14.51	83.42 ± 98.50	57.5 ± 19.98	58.65 ± 10.56	82.77 ± 19.20
GGT (U/L)	1.71 ± 0.75	1.57 ± 0.78	1.45 ± 0.89	0.87 ± 0.69	1.62 ± 0.74
AP (U/L)	114.57 ± 39.13	114.14 ± 49.49	124.6 ± 40.97	113.12 ± 54.65	103.25 ± 65.22
IB (mg/dL)	0.035 ± 0.021	0.031 ± 0.015	0.036 ± 17.98	0.041 ± 0.014	0.033 ± 0.014
DB (mg/dL)	0.013 ± 0.008	0.017 ± 0.019	0.026 ± 0.018	0.016 ± 0.013	0.015 ± 0.009
TB (mg/dL)	0.045 ± 0.021	0.048 ± 0.016	0.062 ± 0.013	0.057 ± 0.023	0.048 ± 0.018
TG (mg/dL)	156.11 ± 10.03 ^a	177.22 ± 15.12 ^a	147.22 ± 12.03 ^a	150.19 ± 11.15 ^a	69.12 ± 7.11
Hepatic TG (mmol/L)	125.11 ± 5.08 ^a	123.32 ± 2.52 ^a	138.11 ± 7.91 ^a	145.30 ± 7.24 ^a	95.31 ± 4.73
TC (mg/dL)	168.14 ± 25.33 ^a	161.57 ± 39.04 ^a	197 ± 29.02 ^a	160.25 ± 25.12 ^a	61.37 ± 14.02
HDL-C (mg/dL)	40.21 ± 8.21 ^a	81.29 ± 9.32 ^{a,d}	92.97 ± 10.11 ^{a,d}	80.71 ± 9.21 ^{a,d}	27.12 ± 7.04
VLDL-C (mg/dL)	33.63 ± 7.71 ^a	35.44 ± 4.77 ^a	29.44 ± 4.01 ^a	30.04 ± 3.45 ^a	13.82 ± 3.22
LDL-C (mg/dL)	96.8 ± 9.32 ^{a,b,c,e}	45.33 ± 5.12 ^a	76.11 ± 7.01 ^a	50.21 ± 4.11 ^a	20.01 ± 2.33
oxLDL (ng/mL)	0.80 ± 0.10 ^a	0.92 ± 0.09 ^a	1.32 ± 0.11 ^a	2.07 ± 0.13 ^{a,b,c,d}	0.24 ± 0.05
NT (μmol/L)	0.020 ± 0.002 ^a	0.021 ± 0.003 ^a	0.023 ± 0.003 ^a	0.025 ± 0.004 ^a	0.011 ± 0.002
MDA (mmol/L)	3.00 ± 0.11 ^a	3.13 ± 0.14 ^a	3.53 ± 0.22 ^a	4.15 ± 0.33 ^a	2.13 ± 0.19
sVCAM-1 (ng/L)	3.98 ± 0.12 ^a	3.13 ± 0.37	3.78 ± 0.17 ^a	4.00 ± 0.21 ^a	2.50 ± 0.11
sICAM-1 (ng/L)	8.20 ± 1.16 ^a	6.16 ± 1.24	8.72 ± 0.94 ^a	8.70 ± 1.03 ^a	4.01 ± 0.57
IL-6 (ng/L)	301.55 ± 40.3 ^a	250.54 ± 45.1	300.11 ± 33.4 ^a	334.23 ± 22.3 ^{a,c}	165.21 ± 22.2
IL-1β (pg/mL)	430.17 ± 30.1 ^a	390.32 ± 44.2	460.22 ± 30.1 ^a	521.17 ± 30.1 ^{a,c}	333.45 ± 40.3
Creatinine (mg/dL)	0.36 ± 0.06	0.39 ± 0.13	0.42 ± 0.02	0.39 ± 0.076	0.34 ± 0.09
Urea (mg/dL)	47.02 ± 10.09	38.92 ± 6.16	50.22 ± 0.07	45.07 ± 9.34	52.06 ± 11.34
Sodium (mmol/L)	136.28 ± 5.87	135.85 ± 10.76	141.4 ± 5.27	143.37 ± 6.73	142.37 ± 6.04
Calcium (mg/dL)	11.41 ± 0.85	11.2 ± 1.70	11.46 ± 0.36	11.62 ± 0.85	10.55 ± 0.77
Potassium (mmol/L)	4.95 ± 1.33	4.37 ± 1.01	5.36 ± 0.77	4.27 ± 0.66	4.03 ± 0.39
Magnesium (mg/dL)	2.45 ± 0.42	2.42 ± 1.01	2.48 ± 0.22	2.19 ± 0.12	2.32 ± 0.14
Chloride (mmol/L)	98.14 ± 5.14	97.85 ± 6.36	102.8 ± 4.81	104.87 ± 3.39	103.87 ± 3.87
Estradiol (pg/mL)	45.99 ± 9.43	1.01 ± 0.31 ^a	55.01 ± 10.02	0.98 ± 0.21 ^a	40.22 ± 11.21
Free T3 (ng/mL)	0.54 ± 0.14	0.60 ± 0.11	0.51 ± 0.09	0.48 ± 0.08	0.50 ± 0.10
TSH (ng/mL)	5.21 ± 0.54	5.12 ± 0.77	4.93 ± 0.59	5.01 ± 0.92	4.75 ± 0.77

The data are expressed as mean ± SEM of $n = 8$ rats per group compared with the control group (^a $p < 0.05$), LEAD group (^b $p < 0.05$), NOAD group (^c $p < 0.05$), NEAD group (^d $p < 0.05$), and LOAD group (^e $p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. ALT, alanine aminotransferase; AP, alkaline phosphatase; AST, aspartate aminotransferase; DB, direct bilirubin; GGT, γ -glutamyltransferase; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; IB, indirect bilirubin; IL-6, interleukin-6; IL-1 β , interleukin-1 β ; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; LEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME; LOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME; MDA, malondialdehyde; NEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol; NOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol; NT, nitrotyrosine; oxLDL, oxidized low-density lipoprotein; sICAM, soluble intercellular adhesion molecule-1; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule-1; T3, triiodothyronine; TB, total bilirubin; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; TSH, thyroid-stimulating hormone; VLDL-C, very-low-density lipoprotein cholesterol.

Oxidized LDL, MDA, and NT levels were significantly elevated in all of the experimental groups compared with control-rats. The NEAD, LEAD, and LOAD groups exhibited significant increases in sVCAM-1, sICAM-1, IL-6, and IL-1 β levels compared with the control. As expected, estradiol levels were significantly lower in ovariectomized animals.

3.5. Renal and Mesenteric Vascular Bed Reactivity

Phe, ACh, and SNP reactivity in the isolated and perfused MVB in the various groups are presented in Table 5. The LEAD and LOAD groups exhibited higher Phe reactivity at 10 nmol compared with the control group. Moreover, at 30 nmol, the NOAD, LEAD, and LOAD groups exhibited a significant increase in Phe reactivity compared with the NEAD and control groups. Acetylcholine reactivity significantly decreased in the LOAD group at all doses tested compared with the NEAD, NOAD, LEAD,

and control groups. Similarly, the LEAD group exhibited a significant decrease in ACh reactivity at 10 μmol .

Table 5. Mesenteric vascular bed reactivity in the various groups over 60 days of treatment. The data are presented as perfusion pressure variation (mmHg) after Phe, ACh, and SNP administration.

Phe (nmol)	NEAD	NOAD	LEAD	LOAD	Control
1	1.74 \pm 0.26	1.69 \pm 0.43	1.51 \pm 0.33	1.60 \pm 0.23	2.05 \pm 0.32
3	0.89 \pm 0.31	1.88 \pm 0.91	1.78 \pm 0.83	1.57 \pm 0.50	1.05 \pm 0.34
10	3.18 \pm 0.61	2.81 \pm 0.99	4.54 \pm 1.23 ^a	4.70 \pm 0.76 ^a	1.75 \pm 0.57
30	11.77 \pm 4.42	20.56 \pm 4.83 ^{a,d}	24.70 \pm 7.15 ^{a,d}	20.56 \pm 3.93 ^{a,d}	8.07 \pm 1.47
ACh (pmol)					
1	-3.79 \pm 1.00	-5.48 \pm 0.63	-4.43 \pm 0.87	-2.14 \pm 0.30 ^{a,b,c}	-4.18 \pm 0.83
3	-6.07 \pm 0.90	-5.95 \pm 0.33	-6.03 \pm 0.95	-3.14 \pm 0.50 ^{a,b,c,d}	-5.09 \pm 0.51
10	-4.91 \pm 0.52	-4.62 \pm 0.44	-1.92 \pm 0.83 ^{a,c,d}	-2.17 \pm 0.55 ^{a,c,d}	-4.99 \pm 0.55
30	-12.38 \pm 1.22	-11.377 \pm 1.45	-12.02 \pm 1.18	-7.32 \pm 0.50 ^{a,b,c,d}	-10.19 \pm 0.86
SNP (pmol)					
0.1	-5.06 \pm 1.97	-3.61 \pm 1.71	-5.04 \pm 1.13	-2.96 \pm 0.78	-3.89 \pm 1.63
0.3	-4.40 \pm 1.76	-3.50 \pm 0.78	-4.48 \pm 2.39	-5.02 \pm 1.75	-4.05 \pm 0.81
1	-5.36 \pm 1.27	-4.58 \pm 1.38	-5.15 \pm 1.01	-4.90 \pm 1.14	-4.39 \pm 1.38
3	-4.40 \pm 1.76	-7.18 \pm 2.00	-5.80 \pm 0.88	-6.35 \pm 1.87	-6.82 \pm 1.43

The data are expressed as the mean \pm SEM of $n = 8$ rats per group compared with the control group (^a $p < 0.05$), LEAD group (^b $p < 0.05$), NOAD group (^c $p < 0.05$), and NEAD group (^d $p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Ach, acetylcholine; LEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME; LOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME; NEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol; NOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol; Phe, phenylephrine; SNP, sodium nitroprusside.

Renal vascular reactivity in the various groups over 60 days of treatment is presented in Table 6. Isolated kidney preparations in the LOAD group exhibited a significant decrease in Phe reactivity. At 1 nmol, Phe reactivity was significantly lower in the LOAD group than in the control, NEAD, NOAD, and LEAD groups. Similarly, preparations that were obtained from animals in the LOAD group exhibited a significant reduction of the constricting effects of Ang II (1 pmol) compared with the control, NEAD, NOAD, and LEAD groups. All of the experimental groups exhibited a significant reduction of the vasodilatory effects of ACh (0.1 nmol) compared with the control group.

Table 6. Renal vascular reactivity in the various groups over 60 days of treatment. The data are presented as perfusion pressure variation (mmHg) after Phe, Ang II, ACh, and SNP administration.

Phe (nmol)	NEAD	NOAD	LEAD	LOAD	Control
0.1	1.39 ± 0.67	1.07 ± 0.68	1.84 ± 0.46	0.44 ± 0.55 ^{a,c}	2.41 ± 0.58
0.3	2.32 ± 0.75	2.91 ± 0.99	1.90 ± 0.29	1.80 ± 0.48	2.49 ± 0.63
1	6.53 ± 2.51	8.00 ± 1.51	4.77 ± 0.99	2.02 ± 0.51 ^{a,b,c,d}	6.96 ± 1.77
3	48.51 ± 10.71	85.10 ± 11.96	67.50 ± 6.51	56.85 ± 7.40	65.03 ± 12.83
Ang II (pmol)					
1	25.32 ± 3.91	29.31 ± 3.99	22.02 ± 3.66	15.33 ± 1.87 ^{a,b,c,d}	23.76 ± 2.32
3	33.93 ± 5.89	45.00 ± 5.33	44.60 ± 9.43	48.22 ± 8.97	42.06 ± 10.49
10	33.43 ± 7.67	40.70 ± 7.99	47.39 ± 11.99	37.94 ± 5.84	39.44 ± 9.59
30	49.34 ± 8.16	64.70 ± 7.93	82.17 ± 13.08	68.55 ± 7.82	60.26 ± 8.54
ACh (nmol)					
0.03	-9.72 ± 2.26	-7.56 ± 2.90	-7.70 ± 1.58	-6.69 ± 1.54	-5.65 ± 1.52
0.1	-5.90 ± 1.12 ^a	-5.48 ± 1.73 ^a	-6.25 ± 1.80 ^a	-6.67 ± 0.99 ^a	-10.71 ± 0.66
0.3	-13.02 ± 2.23	-11.99 ± 1.83	-9.15 ± 2.99	-15.36 ± 2.71	-12.32 ± 1.84
1	-17.07 ± 4.10	-21.85 ± 2.98	-21.30 ± 2.37	-18.42 ± 2.15	-19.91 ± 2.43
SNP (nmol)					
0.3	-8.99 ± 1.67	-10.11 ± 1.20	-12.66 ± 2.54	-9.02 ± 0.99	-10.76 ± 2.19
1	-9.27 ± 1.12	-9.09 ± 1.69	-11.19 ± 1.91	-11.94 ± 1.94	-8.00 ± 2.39
3	-10.99 ± 1.55	-13.12 ± 1.23	-12.87 ± 1.98	-13.5 ± 1.12 ^a	-14.36 ± 1.22
10	-12.66 ± 1.05	-15.78 ± 2.12	-14.51 ± 1.99	-14.24 ± 1.77	-15.95 ± 2.13

The data are expressed as the mean ± SEM of $n = 8$ rats per group compared with the control group (^a $p < 0.05$), LEAD group (^b $p < 0.05$), NOAD group (^c $p < 0.05$), and NEAD group (^d $p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. ACh, acetylcholine; Ang II, angiotensin II; LEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME; LOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME; NEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol; NOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol; Phe, phenylephrine; SNP, sodium nitroprusside.

3.6. Body Weight and Relative Weight of Heart, Kidney, and Liver

The initial and final body weight and relative weight of the heart and right kidney did not show any statistically significant changes compared to the different experimental groups (Table 7). The relative weight of the liver in the NEAD, NOAD, LEAD, and LOAD groups were significantly increased when compared with the control group (Table 7).

Table 7. Body weight and relative weight of the heart, kidney, and liver in the various groups over 60 days of treatment.

Parameter	NEAD	NOAD	LEAD	LOAD	Control
Initial body weight	237 ± 16.12	232 ± 10.1	240 ± 19.21	249 ± 17.12	241 ± 18.32
Final body weight	287 ± 20.21	299 ± 22.21	283 ± 19.21	300 ± 22.21	267 ± 19.91
Heart	0.28 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.26 ± 0.02
Kidney	0.33 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.01
Liver	4.16 ± 0.15 ^a	4.64 ± 0.30 ^a	3.98 ± 0.20 ^a	4.32 ± 0.27 ^a	3.17 ± 0.15

The data are expressed as mean ± SEM of $n = 8$ rats per group compared with the control group (^a $p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. LEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME; LOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME; NEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol; NOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol.

3.7. Tissue Redox Status

The levels of SOD, CAT, and LPO in cardiac, renal, and arterial tissues are presented in Table 8. In ventricular muscle, we found a significant increase in SOD and CAT levels in the LOAD group. Similarly, in kidney tissue, the LOAD and NEAD groups exhibited a significant increase in SOD and LPO levels. The LEAD group exhibited only an increase in LPO levels. The NOAD group exhibited a significant reduction of CAT levels in renal tissue. In arterial tissue, the LOAD group exhibited a significant increase in SOD, CAT, and LPO levels compared with the control group. Similarly, the NEAD and LEAD groups exhibited significant increases in CAT levels. In arterial tissue, LPO levels were significantly lower in the NOAD group than in the NEAD, LEAD, LOAD, and control groups.

Table 8. Tissue redox status in the various groups over 60 days of treatment.

	Heart	NEAD	NOAD	LEAD	LOAD	Control
SOD						
(mmol/hydroperoxides/mg protein)		27.92 ± 1.90	27.98 ± 1.83	34.09 ± 2.64	45.01 ± 3.07 ^{a,c,d}	25.67 ± 1.18
CAT (μmol/min/mg protein)						
		272.8 ± 46.7	221.1 ± 32.62	325.2 ± 57.71	663.9 ± 77.59 ^{a,b,c,d}	253.3 ± 42.96
LPO (U/mg protein)						
		202.7 ± 35.26	129.6 ± 22.95	134.9 ± 27.62	144.5 ± 39.82	164.7 ± 15.88
Kidney						
SOD						
(mmol/hydroperoxides/mg protein)		54.59 ± 6.38 ^{a,b,c}	12.27 ± 1.63	14.79 ± 1.40	68.04 ± 14.43 ^{a,b,c}	18.17 ± 4.54
CAT (μmol/min/mg protein)						
		1221.1 ± 153.1	695.4 ± 41.9 ^{a,b,d,e}	1071.2 ± 125.4	1302.3 ± 92.8	1038.4 ± 116.0
LPO (U/mg protein)						
		262.9 ± 26.16 ^{a,c}	83.44 ± 18.24	217.9 ± 23.93 ^{a,c}	274.6 ± 41.7 ^{a,c}	108.4 ± 7.52
Aorta						
SOD						
(mmol/hydroperoxides/mg protein)		22.41 ± 1.85	16.93 ± 1.34	24.65 ± 2.60	78.42 ± 3.19 ^{a,b,c,d}	22.62 ± 0.81
CAT (μmol/min/mg protein)						
		618.3 ± 73.07 ^{a,c}	275.6 ± 22.74	563.2 ± 78.26 ^{a,c}	952.7 ± 72.55 ^{a,b,c,d}	238.2 ± 14.35
LPO (U/mg protein)						
		204.62 ± 26.81 ^{a,b}	44.25 ± 19.76 ^{a,b,d}	128.21 ± 32.22	280.61 ± 35.39 ^{a,b,c}	105.62 ± 9.31

The data are expressed as the mean ± SEM of $n = 8$ rats per group compared with the control group (^a $p < 0.05$), LEAD group (^b $p < 0.05$), NOAD group (^c $p < 0.05$), NEAD group (^d $p < 0.05$), and LOAD group (^e $p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. CAT, catalase; LEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME; LOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME; LPO, lipoperoxides; NEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol; NOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol; SOD, superoxide dismutase.

3.8. Cardiac and Arterial Morphometry

The interventricular septum and intimal layer of the subclavian and carotid arteries in the NEAD group exhibited significant thickening compared with all of the other experimental groups (Table 9). The right and left ventricles exhibited no significant changes in any of the groups.

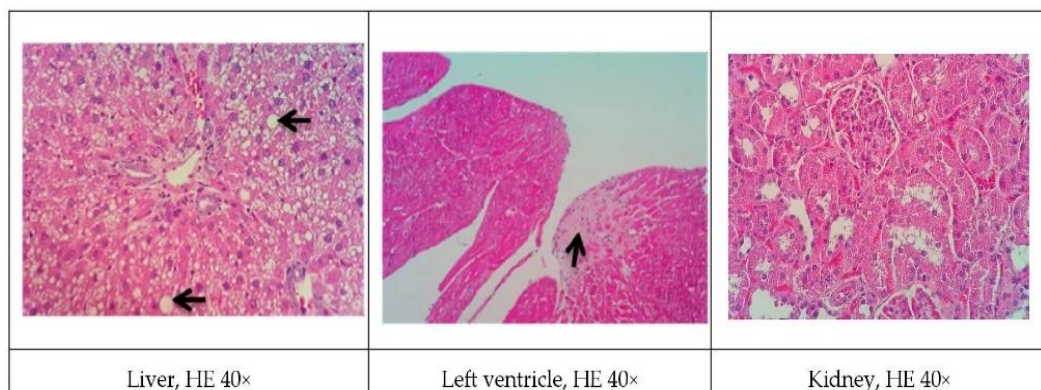
Table 9. Cardiac and arterial morphometry in the various groups over 60 days of treatment.

Parameter (μm)	NEAD	NOAD	LEAD	LOAD	Control
Right ventricle	575.4 \pm 87.12	688.5 \pm 55.79	652.4 \pm 18.71	666.4 \pm 19.87	662.9 \pm 77.23
Left ventricle	2113 \pm 122.23	2399 \pm 101.20	1845 \pm 138.20	1925 \pm 81.08	1755 \pm 201.21
IV septum	6044 \pm 703.11 ^{a,b,c,e}	2103 \pm 103.71	1749 \pm 40.58	1434.1 \pm 86.52	1309.2 \pm 88.51
SA (intima layer)	64.80 \pm 3.67 ^{a,b,c,e}	3.10 \pm 0.81	6.67 \pm 0.81	4.54 \pm 0.90	3.58 \pm 0.57
CA (intima layer)	29.61 \pm 2.49 ^{a,b,c,e}	2.94 \pm 0.27	3.68 \pm 0.35	3.10 \pm 0.46	2.94 \pm 0.29

The data are expressed as the mean \pm SEM of $n = 8$ rats per group compared with the control group (^a $p < 0.05$), LEAD group (^b $p < 0.05$), NOAD group (^c $p < 0.05$), and LOAD group (^e $p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. CA, carotid artery; IV, interventricular; LEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME; LOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME; NEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol; NOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol; SA, subclavian artery.

3.9. Histopathological Analysis

Representative histological images of the liver, left ventricle, kidney, and arteries (subclavian and carotid) in the various experimental groups are shown in Figures 1–5. All of the animals that received the high-fat diet exhibited significant lipid accumulation in periportal and mediozonal hepatocytes, with a discrete-to-moderate focus of mononuclear inflammatory infiltrate. The NEAD (Figure 1) and LOAD (Figure 4) groups exhibited the diffuse formation of cytoplasmic lipid macro- and microvesicles and slight random individual hepatocyte necrosis. In the NOAD (Figure 2) and LEAD (Figure 3) groups, hepatic steatosis acquired a microvesicular aspect without displacing the cell nucleus. In cardiac tissue in the NEAD (Figure 1) and LOAD (Figure 4) groups, we observed a focally extensive area of fibrous tissue deposition that was associated with mild cardiac fiber necrosis and mild mononuclear inflammatory infiltrates into the left ventricular myocardium near the endocardium. In the kidney in the LOAD group, we found some areas of mononuclear inflammatory infiltrate and the presence of eosinophilic amorphous material (Figure 4). Only the NEAD group exhibited atheromatous lesions (Figure 1).

**Figure 1.** Cont.

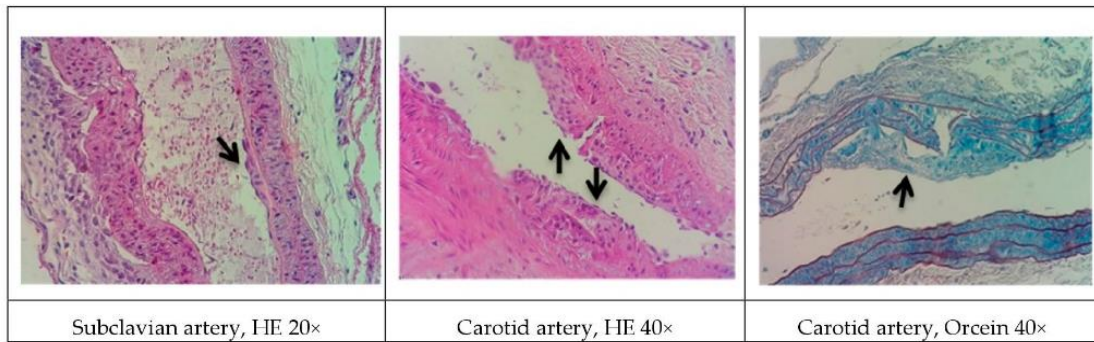


Figure 1. Representative cross-sections of the liver, left ventricle, kidney, and subclavian and carotid arteries in the NEAD group. Black arrows indicate cardiac fibrosis, lipid macrovesicles in the liver, and lipid striae in the arteries. HE, hematoxylin-eosin staining; NEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol.

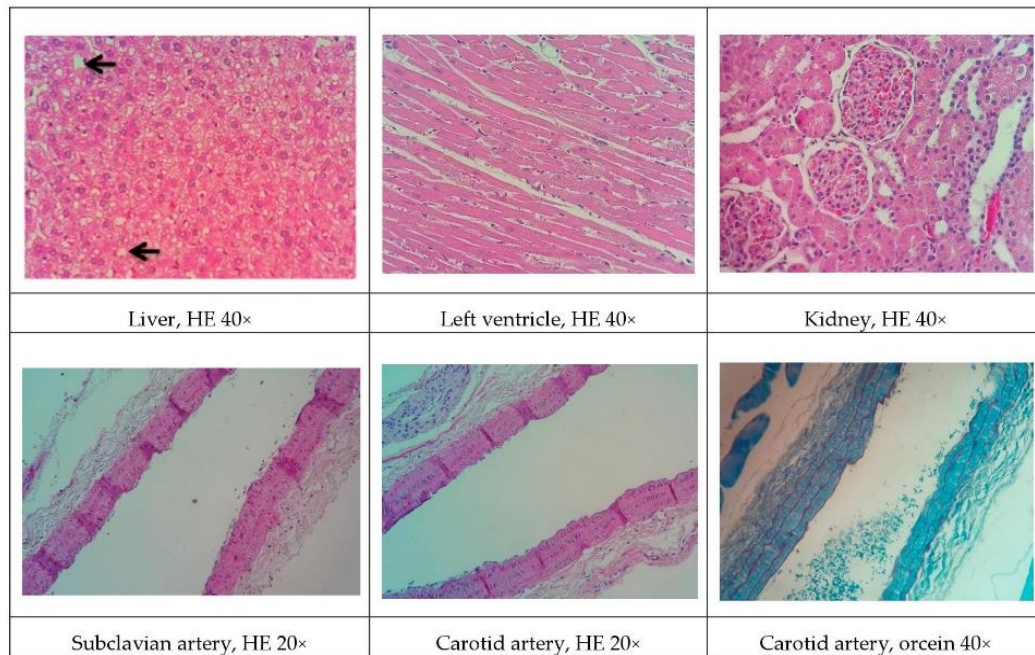


Figure 2. Representative cross-sections of the liver, left ventricle, kidney, and subclavian and carotid arteries in the NOAD group. Black arrows indicate lipid macrovesicles in the liver. HE, hematoxylin-eosin staining; NOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, and cholecalciferol.

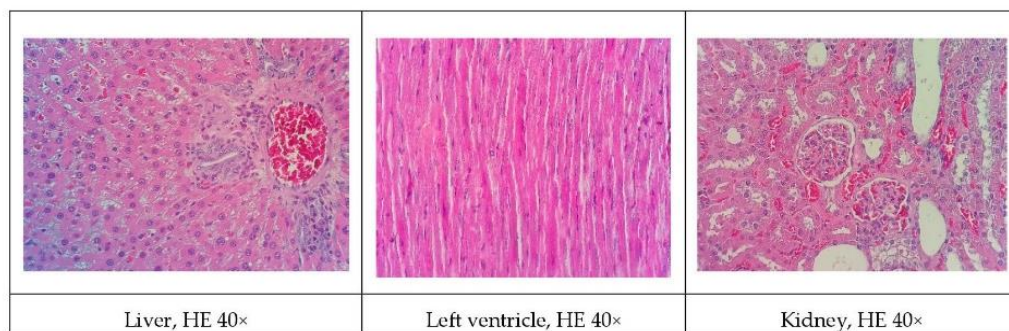


Figure 3. Cont.

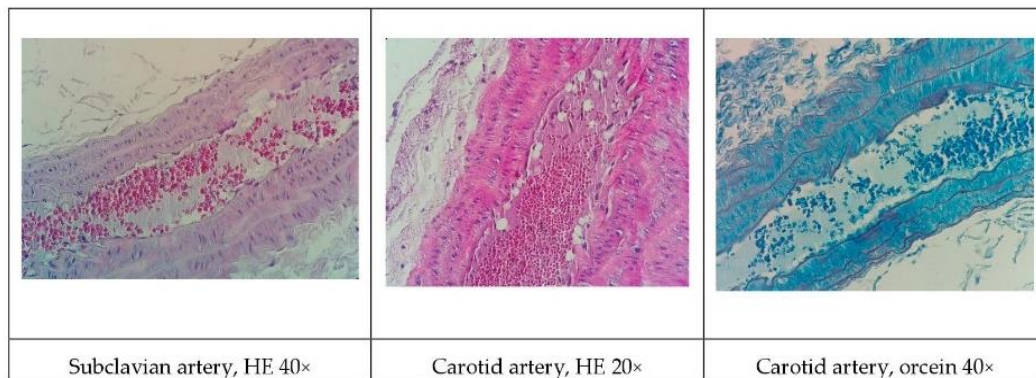


Figure 3. Representative cross-sections of the liver, left ventricle, kidney, and subclavian and carotid arteries in the LEAD group. HE, hematoxylin-eosin staining; LEAD, normotensive and non-ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME.

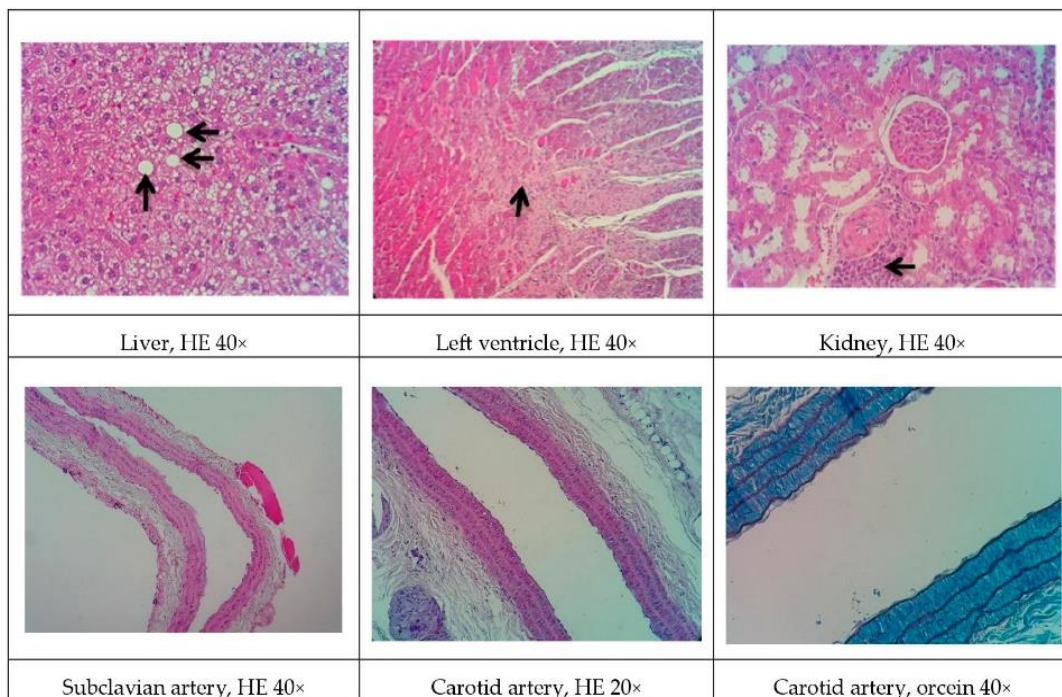


Figure 4. Representative cross-sections of the liver, left ventricle, kidney, and subclavian and carotid arteries in the LOAD group. Black arrows indicate cardiac fibrosis, lipid macrovesicles in the liver, and inflammatory infiltrate in renal tissue. HE, hematoxylin-eosin staining; LOAD, normotensive and ovariectomized rats that received the atherogenic diet, methimazole, cholecalciferol, and L-NAME.

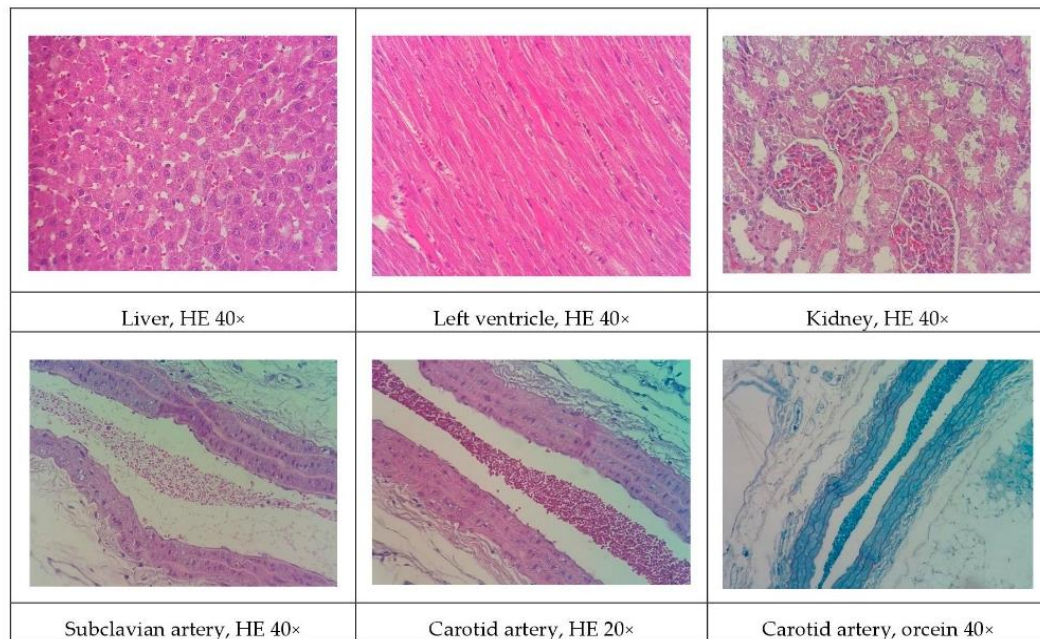


Figure 5. Representative cross-sections of the liver, left ventricle, kidney, and subclavian and carotid arteries in the control group. HE, hematoxylin-eosin staining.

4. Discussion

Animal models cannot fully reproduce all stages of the development of atherosclerosis in humans. However, in many cases, they can predict important pathophysiological mechanisms of the disease and assist in the identification of new therapeutic targets [14]. Non-genetic rodent models (unlike rabbits) are unable to form short-term atherosclerotic plaques with a high-fat diet (HFD). Therefore, most rodent models consist of a combination of high cholesterol or a HFD and the administration of suprapharmacological doses of vitamin D3 or antithyroid drugs [24]. Several studies to date have utilized mixed models with a notable lack of consensus on precise dietary ingredients and exposure times (e.g., 6–17 weeks). Additionally, no consensus has been reached with regard to animal age, cholesterol or fat content, pharmacological adjuvants, and the presence or absence of sex hormones and hypertension, among other factors [24]. Given these discrepant data, we performed a 60 day treatment regimen that was based on two assumptions. First, when using rats in different models of heart disease, functional changes occur rapidly (within 1 or 2 weeks), but structural changes tend to appear later (e.g., after 6–8 weeks) [25]. Second, when using other non-rodent species, such as rabbits, significant results have been obtained after 60 days of dietary exposure [26].

Despite the fact that females are known to have specific cardiovascular characteristics, the treatments that are specifically directed toward this gender are nonexistent [27]. Additionally, there is a dearth of animal models of atherosclerotic disease for this genus. Estradiol has antioxidant and cardioprotective effects, but the scientific community has a tendency to test only male animals [28]. In fact, a recent review of non-genetic rat models for atherosclerosis research reported only one study that was conducted with females [24]. Thus, we used the same HFD associated with methimazole and cholecalciferol in the four experimental groups (NEAD, NOAD, LEAD, and LOAD). However, in two groups (NOAD and LOAD), we removed the ovaries to mimic the clinical condition that occurs after menopause in women. In one group with ovaries (LEAD) and another group without ovaries (LOAD), we also administered the NO synthase inhibitor L-NAME to reduce the body supply of NO, an important vasodilator and antioxidant and antiplatelet agent [29]. No studies of which we are aware have used L-NAME in the proposed model. We included L-NAME to increase LDL oxidation,

a limiting step in atheromatous plaque formation. Additionally, NO is an important endothelial mediator that controls vascular tone, and NO inhibition can induce endothelial dysfunction that precedes atherosclerotic lesions [30].

In rodents, a standard HFD alone is incapable of inducing more advanced stages of atherosclerosis. Data have shown that an HFD leads only to earlier events of the disease, such as slight thickening of the intimal layer of the arteries [31]. Thus, we expanded the diet to reduce total purified cholesterol and included 20% egg powder, offering a higher content of protein and other fat sources. We also added sucrose and hydrogenated fat. Several studies indicate that diets that are rich in sucrose or hydrogenated fat may induce endothelial dysfunction, raise blood pressure, and cause long-term cardiovascular and renal complications [32,33]. In addition to diet, one alternative to reduce rodent resistance to atherosclerosis is the co-administration of drugs that favor development of the disease. Studies have shown that the co-administration of cholecalciferol facilitates the induction of significant vascular and soft tissue calcifications [34]. Another synergistic effect can be obtained with a drug that reduces metabolism in animals. The use of antithyroid drugs (e.g., methimazole and propylthiouracil) has shown promising results. Fu et al. [35] reported that male Sprague-Dawley rats that were treated with cholecalciferol (600,000 IU/kg) combined with a HFD (81.3% basic feed, 10% lard, 3% cholesterol, 0.5% sodium cholate, and 5% sugar) and 0.2% propylthiouracil (for 17 weeks) developed dyslipidemia and lipid striae in different arterial branches. Additionally, signs of atherogenesis were observed in rats with a shorter exposure time (10 weeks) after treatment with cholecalciferol (70 U/kg, continuous administration for 3 days), propylthiouracil (0.7%), and a HFD (80.3% normal diet, 11% fat, 4.5% cholesterol, 1.5% sodium cholate, and 4% refined sugar) [36].

Although all the models proposed in this study have induced relevant pathophysiological changes, including dyslipidemia and steatosis, one fact caught our attention. Only the NEAD group showed increased LDL-C and significant atherosclerotic lesions. Several data have shown that estrogen promotes natural protection to the endothelium and is related to the decrease of serum cholesterol, especially LDL-C. This natural protection occurs through the regulation of anti-atherogenic agents, such as nitric oxide and indirect effects on the liver [37]. In humans, estrogens lower circulating LDL-C and increase HDL-C [38]. On the other hand, it is currently known that estrogen has been shown to lower hepatic and plasma proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) levels in animals and humans. Changes in circulating PCSK9 contribute to the established increase in LDL-C [39]. In fact, PCSK9 regulates LDL-C by promoting the endosomal/lysosomal degradation of the LDL-C receptor (LDLR) [40]. We think that the probable cause of the contradictory results may be associated with the hepatic alterations induced by an HFD. Hepatic steatosis modulates lipid regulatory genes, including PCSK9 and the LDLR, contributing to increasing LDL-C levels and atherosclerosis [41].

Another significant difference among the present experimental models involved cardiovascular hemodynamics. Interestingly, L-NAME raised blood pressure only in the LOAD group. This is likely attributable to the fact that non-ovariectomized females (LEAD group) had high levels of circulating estradiol, which likely contributed to the observed cardioprotective effects [28,42]. As expected, we observed higher Phe reactivity and lower ACh reactivity in the mesenteric vessels in the L-NAME-treated groups, with even more pronounced effects in ovariectomized animals (LOAD group). This was mainly attributable to the antioxidant effects of estradiol, which exerts protective effects on endothelial function even in the absence of NO [43]. Although these results show an increase in cardiovascular risk factors in the LOAD group, these changes do not specifically reflect atherosclerotic lesions. The effects on local oxidative stress and LDL-C and HDL-C levels may play a more important role in this case.

Some of the data on cardiac architecture were also interesting. Although we did not detect any significant electrocardiographic alterations, we also observed important cardiac structural changes, including fibrosis and hypertrophy, especially in the NOAD group. Hypertension is a well-known risk factor for the development of ventricular hypertrophy. In the present study, only the LOAD group exhibited a significant increase in SBP. Nevertheless, no trace of cardiac muscle hypertrophy

was found in this group. We believe this was attributable to the slight elevation of blood pressure and the time of exposure to these hemodynamic changes [44]. It is unclear whether cholesterol alone is sufficient in causing cardiac hypertrophy. Several studies have shown that cholesterol loading significantly increases the cellular surface area and upregulates the hypertrophy marker gene β -myosin heavy chain. Cholesterol loading alone activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT pathways. Conversely, cholesterol-induced hypertrophic features, such as an increase in cell surface area and the expression of β -myosin heavy chain mRNA, are markedly inhibited by the PI3K kinase inhibitor LY294002. Therefore, cholesterol may play a key role in the development of cardiac hypertrophy through activation of the PI3K/AKT pathway [45].

In general, renal function in the experimental groups was significantly influenced by L-NAME administration. The administration of L-NAME in the proposed models did not improve the atherogenic profile and actually aggravated renal function. Concentric inflammatory areas in the kidneys were commonly observed among the histological findings in these animals. L-NAME may reduce renal function by causing less dilation of the efferent arteriole and reducing glomerular perfusion pressure and filtration rate [46]. Thus, in the proposed model, the addition of L-NAME had a greater impact on renal function than on the development of the atherosclerotic process.

The present study had two important limitations. First, during execution of the protocols, we could not determine why only the NEAD group exhibited higher LDL levels and lower HDL levels if the diet that was offered to the animals was the same. The presence of estradiol and absence of L-NAME may be a possible reason, but further studies are needed to examine this possibility. Second, the use of more effective methodologies to raise blood pressure could have been employed. The use of spontaneously hypertensive rats or animals with renovascular hypertensive may be promising, which would simulate conditions that are closer to the human condition. Nevertheless, the present findings reveal a new non-genetic rat model of atherosclerotic disease that may contribute to further research on the prevention, staging, and regression of atherosclerosis and its comorbidities.

5. Conclusions

The present study identified a viable alternative to induce atherogenesis and hepato-renal impairment in female rats. Although the absence of estradiol and inhibition of NO synthesis did not directly affect hepatic changes or atherosclerotic plaque formation, renal function appeared to be highly dependent on NO levels.

Author Contributions: All of the authors participated in the design and interpretation of the studies, the analysis of the data, and the review of the manuscript. L.P.G., P.V.M.R., R.A.C.P., A.O.S., B.R.L., A.A.M.M., A.C.d.S., R.I.C.S. and K.D.S. conducted the experiments. E.L.B.L. was responsible by funding acquisition. A.G.J. was responsible for data discussion and manuscript revision and was the senior researcher who was responsible for this work. All of the authors read and approved the final manuscript.

Funding: This research was funded by Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (grant no. 59/300.046/2015) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant no. 449464/2014-8 and 407685/2018-9).

Acknowledgments: We thank the University Hospital of the Federal University of Grande Dourados for performing the biochemical analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Li, J.; Chen, C.X.; Shen, Y.H. Effects of total glucosides from paeony (*Paeonia lactiflora* Pall) roots on experimental atherosclerosis in rats. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *135*, 469–475. [CrossRef]
2. Hurtubise, J.; McLellan, K.; Durr, K.; Onasanya, O.; Nwabuko, D.; Ndisang, J.F. The different facets of dyslipidemia and hypertension in atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2016**, *18*, 82. [CrossRef]

3. Lonardo, A.; Nascimbeni, F.; Mantovani, A.; Targher, G. Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: Cause or consequence? *J. Hepatol.* **2018**, *68*, 335–352. [[CrossRef](#)]
4. Ley, K.; Laudanna, C.; Cybulsky, M.I.; Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 678–689. [[CrossRef](#)]
5. Sakakura, K.; Nakano, M.; Otsuka, F.; Ladich, E.; Kolodgie, F.D.; Virmani, R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ.* **2013**, *22*, 399–411. [[CrossRef](#)]
6. Weber, C.; Noels, H. Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1410–1422. [[CrossRef](#)]
7. Li, D.; Zhang, L.; Dong, F.; Liu, Y.; Li, N.; Li, H.; Lei, H.; Hao, F.; Wang, Y.; Zhu, Y.; et al. Metabonomic changes associated with atherosclerosis progression for LDLR^{-/-} mice. *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 2237–2254. [[CrossRef](#)]
8. Nwose, E.U.; Obianke, J.; Richards, R.S.; Bwititi, P.T.; Igumbor, E.O. Prevalence and correlations of hepatorenal functions in diabetes and cardiovascular disease among stratified adults. *Acta Biomed.* **2019**, *90*, 97–103. [[CrossRef](#)]
9. Kessler, T.; Vilne, B.; Schunkert, H. The impact of genome-wide association studies on the pathophysiology and therapy of cardiovascular disease. *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8*, 688–701. [[CrossRef](#)]
10. Van der Laan, A.L.; Boenink, M. Beyond bench and bedside: Disentangling the concept of translational research. *Health Care Anal.* **2015**, *23*, 32–49. [[CrossRef](#)]
11. Andersen, M.L.; Winter, L.M.F. Animal models in biological and biomedical research: Experimental and ethical concerns. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **2017**, *91*, e20170238. [[CrossRef](#)]
12. Getz, G.S.; Reardon, C.A. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 1104–1115. [[CrossRef](#)]
13. Johnston, J.M.; Francis, S.E.; Kiss-Toth, E. Experimental models of murine atherosclerosis: Does perception match reality? *Cardiovasc. Res.* **2018**, *114*, 1845–1847. [[CrossRef](#)]
14. Emini Veseli, B.; Perrotta, P.; De Meyer, G.R.A.; Roth, L.; Van der Donckt, C.; Martinet, W.; De Meyer, G.R.Y. Animal models of atherosclerosis. *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *816*, 3–13. [[CrossRef](#)]
15. Jiang, Y.; Dai, M.; Nie, W.J.; Yang, X.R.; Zeng, X.C. Effects of the ethanol extract of black mulberry (*Morus nigra* L.) fruit on experimental atherosclerosis in rats. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, *200*, 228–235. [[CrossRef](#)]
16. Romão, P.V.M.; Palozi, R.A.C.; Guarnier, L.P.; Silva, A.O.; Lorençone, B.R.; Nocchi, S.R.; de Freitas Sari Moura, C.C.; Lourenço, E.L.B.; Silva, D.B.; Gasparotto Junior, A. Cardioprotective effects of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel in a rabbit model of doxorubicin-induced heart failure. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *242*, 112042. [[CrossRef](#)]
17. Gasparotto Junior, A.; Gasparotto, F.M.; Lourenço, E.L.B.; Crestani, S.; Stefanello, M.E.A.; Salvador, M.J.; da Silva-Santos, J.E.; Marques, M.C.A.; Kassuya, C.A.L. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *134*, 363–372. [[CrossRef](#)]
18. McGregor, D.D. The effect of sympathetic nerve stimulation of vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J. Physiol.* **1965**, *177*, 21–30. [[CrossRef](#)]
19. Qasem, R.J.; Cherala, G.; D’Mello, A.P. Maternal protein restriction during pregnancy and lactation in rats imprints long-term reduction in hepatic lipid content selectively in the male offspring. *Nutr. Res.* **2010**, *30*, 410–417. [[CrossRef](#)]
20. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 121–126. [[CrossRef](#)]
21. Marklund, S.; Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **1974**, *47*, 469–474. [[CrossRef](#)]
22. Jiang, Z.Y.; Hunt, J.V.; Wolff, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* **1992**, *202*, 384–389. [[CrossRef](#)]
23. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]
24. Livero, F.A.D.R.; Gasparotto Junior, A. Non-genetic rats models for atherosclerosis research: From past to present. *Front. Biosci. Schol. Ed.* **2019**, *11*, 203–213. [[CrossRef](#)]

25. Younis, W.; Alamgeer; Schini-Kerth, V.B.; Junior, A.G.; Majid, M. Cardioprotective effect of *Asphodelus tenuifolius* Cav. on blood pressure and metabolic alterations in glucose-induced metabolic syndrome rats: An ethnopharmacological approach. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *214*, 168–178. [[CrossRef](#)]
26. Santiago, P.G.; Gasparotto, F.M.; Gebara, K.S.; Bacha, F.B.; Livero, F.A.D.R.; Strapazon, M.A.; Junior, E.L.C.; Kassuya, C.A.L.; de Souza, L.M.; Gasparotto Junior, A. Mechanisms underlying antiatherosclerotic properties of an enriched fraction obtained from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. *Phytomedicine* **2017**, *34*, 162–170. [[CrossRef](#)]
27. Abdel-Rahman, A.A. Influence of sex on cardiovascular drug responses: Role of estrogen. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2017**, *33*, 1–5. [[CrossRef](#)]
28. Knowlton, A.A.; Lee, A.R. Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacol. Ther.* **2012**, *135*, 54–70. [[CrossRef](#)]
29. Bohlen, H.G. Nitric oxide and the cardiovascular system. *Compr. Physiol.* **2015**, *5*, 808–823. [[CrossRef](#)]
30. Li, H.; Horke, S.; Förstermann, U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **2014**, *237*, 208–219. [[CrossRef](#)]
31. Wu, J.; Zhao, M.; Zheng, H.; Zhang, H.; Jiang, Y. Pentoxifylline alleviates high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis and early atherosclerosis in rats by inhibiting AGE and RAGE expression. *Acta Pharmacol. Sin.* **2010**, *31*, 1367–1375. [[CrossRef](#)]
32. Ahmed, H.; Hannan, J.L.; Apolzan, J.W.; Osikoya, O.; Cushen, S.C.; Romero, S.A.; Goulopoulou, S. A free-choice high-fat, high-sucrose diet induces hyperphagia, obesity, and cardiovascular dysfunction in female cycling and pregnant rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2019**, *316*, R472–R485. [[CrossRef](#)]
33. Kramer, B.; França, L.M.; Zhang, Y.; de Andrade Paes, A.M.; Gerdes, A.M.; Carrillo-Sepulveda, M.A. Western diet triggers Toll-like receptor 4 signaling-induced endothelial dysfunction in female Wistar rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2018**, *315*, H1735–H1747. [[CrossRef](#)]
34. Price, P.A.; Faus, S.A.; Williamson, M.K. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2000**, *20*, 317–327. [[CrossRef](#)]
35. Fu, W.J.; Lei, T.; Yin, Z.; Pan, J.H.; Chai, Y.S.; Xu, X.Y.; Yan, Y.X.; Wang, Z.H.; Ke, J.; Wu, G.; et al. Anti-atherosclerosis and cardio-protective effects of the Angong Niu Huang Pill on a high fat and vitamin D3 induced rodent model of atherosclerosis. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, *195*, 118–126. [[CrossRef](#)]
36. Diao, S.L.; Sun, J.W.; Ma, B.X.; Li, X.M.; Wang, D. Influence of crocetin on high-cholesterol diet induced atherosclerosis in rats via anti-oxidant activity together with inhibition of inflammatory response and p38 MAPK signaling pathway. *Saudi J. Biol. Sci.* **2018**, *25*, 493–499. [[CrossRef](#)]
37. Walsh, B.W.; Schiff, I.; Rosner, B.; Greenberg, L.; Ravnkar, V.; Sacks, F.M. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *325*, 1196–1204. [[CrossRef](#)]
38. Lundeen, S.G.; Carver, J.M.; McKean, M.-L.; Winneker, R.C. Characterization of the Ovariectomized Rat Model for the Evaluation of Estrogen Effects on Plasma Cholesterol Levels. *Endocrinology* **1997**, *138*, 1552–1558. [[CrossRef](#)]
39. Ghosh, M.; Gälman, C.; Rudling, M.; Angelin, B. Influence of physiological changes in endogenous estrogen on circulating PCSK9 and LDL cholesterol. *J. Lipid. Res.* **2015**, *56*, 463–469. [[CrossRef](#)]
40. Roubtsova, A.; Chamberland, A.; Marcinkiewicz, J.; Essalmani, R.; Fazel, A.; Bergeron, J.J.; Seidah, N.G.; Prat, A. PCSK9 deficiency unmasks a sex- and tissue-specific subcellular distribution of the LDL and VLDL receptors in mice. *J. Lipid. Res.* **2015**, *56*, 2133–2142. [[CrossRef](#)]
41. Lebeau, P.F.; Byun, J.H.; Platko, K.; MacDonald, M.E.; Poon, S.V.; Faiyaz, M.; Seidah, N.G.; Austin, R.C. Diet-induced hepatic steatosis abrogates cell-surface LDLR by inducing de novo PCSK9 expression in mice. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 9037–9047. [[CrossRef](#)]
42. Dornas, W.C.; Silva, M.E. Animal models for the study of arterial hypertension. *J. Biosci.* **2011**, *36*, 731–737. [[CrossRef](#)]
43. Fidarov, A.F.; Vihma, V.; Bogautdinov, R.P.; Morozkina, S.N.; Shavva, A.G.; Tikkanen, M.J. Novel structural features increase the antioxidant effect of estrogen analogues on low density lipoprotein. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *154*, 142–149. [[CrossRef](#)]
44. Nadruz, W. Myocardial remodeling in hypertension. *J. Hum. Hypertens.* **2015**, *29*, 1–6. [[CrossRef](#)]

45. Lee, H.; Yoo, Y.S.; Lee, D.; Song, E.J. Cholesterol induces cardiac hypertrophy by activating the AKT pathway. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2013**, *138*, 307–313. [[CrossRef](#)]
46. Tsuchiya, K.; Tomita, S.; Ishizawa, K.; Abe, S.; Ikeda, Y.; Kihira, Y.; Tamaki, T. Dietary nitrite ameliorates renal injury in L-NAME-induced hypertensive rats. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **2010**, *22*, 98–103. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

6 CONCLUSÃO

O presente estudo identificou uma alternativa viável para induzir aterogênese e comprometimento hepato-renal em ratos fêmeas. A dieta aterogênica padronizada e adaptada, se mostrou eficiente na indução de dislipidemia e formação de placas ateroscleróticas, quando associadas com outros fatores. Embora a ausência de estradiol e a inibição da síntese de NO não afetem diretamente as alterações hepáticas ou a formação da placa aterosclerótica, a função renal parece ser altamente dependente dos níveis de NO. A presença de estradiol nesse estudo, ao contrário de muitos estudos, não demonstrou sua eficácia cardioprotetora, mas sim uma atividade coadjuvante intensificando o quadro de dislipidemia e aumentando as chances de formação de aterosclerose.

Apesar da eficácia do modelo, existe a possibilidade de aprimoramento, alterando as formas de indução de hipertensão como co-fator para indução de aterosclerose. Novos estudos, utilizando tratamentos, necessitam ser realizados para testar a eficácia do modelo.

7 ANEXO

7.1 Aprovação do Comitê de Ética do Uso de Animais em pesquisa (CEUA)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 14 de maio de 2018.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “***Desenvolvimento e validação da predição de um modelo de aterosclerose em ratas ovariectomizadas com hipertensão renovascular***”, registrada sob o protocolo de nº 13/2018, sob a responsabilidade de *Arquimedes Gasparotto Junior* – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 16/03/2018.

<i>Finalidade</i>	() Ensino (X) Pesquisa Científica
<i>Vigência da autorização</i>	15/05/2018 a 01/03/2020
<i>Espécie/linhagem/raça</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Nº de animais</i>	75 <i>Wistar</i>
<i>Peso/idade</i>	60 dias
<i>Sexo</i>	Fêmeas
<i>Origem</i>	Biotério Central UFGD

Melissa Negrão Sepulveda

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA