

## INFLUÊNCIA DA TESTOSTERONA EXÓGENA: PERFIL LIPÍDICO, ESTADO OXIDATIVO E MORFOLOGIA CARDÍACA EM CAMUNDONGOS LDLR -/-

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

Ariane Borges FIGUEIREDO<sup>1,2</sup>; Bethânia Elias COSTA<sup>1\*</sup>; Onés Sabino JÚNIOR<sup>3</sup>, Adriano da Silva Santos JÚNIOR<sup>3</sup>, Erika Kristina INCERPI<sup>4</sup>, Gustavo A. G. MIRA<sup>5</sup>, Isadora E. L. R. MARCONDES<sup>5</sup>, Leandro dos SANTOS<sup>6</sup>, Leonardo L. LUCIANO<sup>3</sup>, Silviane F. MAGALHÃES<sup>7</sup>, Flávia Helena PEREIRA<sup>8</sup>, José Antônio Dias GARCIA<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Reprodução Sanidade e Bem-estar Animal, Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, Minas Gerais, Brasil

<sup>2</sup>Instituto federal do Sul de Minas Gerais, Machado, Minas Gerais, Brasil

<sup>3</sup>Curso de Medicina, Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, Minas Gerais, Brasil

<sup>4</sup>Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brasil

<sup>5</sup> Curso de Medicina, Universidade Nove de Julho, Bauru, São Paulo, Brasil

<sup>6</sup>Universidade Federal Rural do Pernambuco, Serra Talhada, Pernambuco, Brasil

<sup>7</sup>Curso de Biomedicina, Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, Brasil

<sup>8</sup>Instituto Federal do Sul de Minas Gerais, Passos, Brasil

\*bethaniaelias@hotmail.com

#### Resumo

**Introdução:** Estudos relacionam a diminuição da concentração plasmática de HDL à síndrome metabólica, diabetes e hipertrofia cardíaca. Além disso, a redução endógena de testosterona aumenta os fatores de riscos cardiovasculares. **Objetivo:** Avaliar a influência da testosterona exógena na dislipidemia e na Hipertrofia ventricular esquerda (HVE) de camundongos knockout para o gene do receptor de LDL (LDLr-/-). **Métodos:** Os animais foram divididos em quatro grupos (n=10): S - alimentados com dieta padrão para roedores; ST - alimentados com dieta padrão para roedores e receberam testosterona (Durasteston® 10mg/kg/semana, via IM); HL - alimentados com dieta hiperlipídica e HLT - alimentados com dieta hiperlipídica e receberam testosterona (Durasteston® 10mg/kg/semana, via IM). Após o experimento, o sangue foi coletado por punção do plexo venoso retro-orbital para as determinações séricas de glicose, insulina, triglicerídeos, colesterol total e suas frações. Posteriormente foi realizada toracotomia, retirada aorta torácica e o coração para análise de estado oxidativo e morfologia cardíaca. **Resultados:** Os camundongos HL e HLT apresentaram dislipidemia mista severa quando comparados com os camundongos S e ST. Contudo, os camundongos HLT apresentaram aumento nos níveis séricos de HDL quando comparados com os HL. Os camundongos ST e HLT também apresentaram HVE, caracterizada pelo aumento do diâmetro dos cardiomiócitos, contudo, não apresentaram aumento no depósito de colágeno quando comparados com os camundongos HL. A testosterona preveniu parcialmente o aumento da área imunorreativa para o CD40L (HLT vs HL). A testosterona no grupo HLT preveniu o aumento dos ânions superóxidos na aorta e do índice de Homa, quando comparados aos camundongos do grupo HL, com redução dos níveis plasmáticos de insulina, sem alterar a glicemia. **Conclusão:** Neste estudo, a testosterona exógena proporcionou efeito metabólico e cardíaco benéfico em camundongos dislipidêmicos. Contudo, a atenção em seus níveis faz se necessário em pacientes cardiopata e com diabetes mellitus tipo 2.

**Palavras-chave:** Camundongo; Estresse Oxidativo; Perfil Lipídico; Resistência Insulínica; Testosterona; Dislipidemia.

#### Abstract

**Introduction:** Studies relate the decrease in plasma concentration of HDL with metabolic syndrome, diabetes and cardiac hypertrophy. In addition, the reduction of endogenous testosterone increases cardiovascular risk factors. **Objective:** To evaluate the influence of exogenous testosterone on dyslipidemia and left ventricular hypertrophy (LVH) in knockout mice for the LDL receptor gene (LDLr-/-). **Methods:** Animals were divided into four groups (n=10): S - fed a standard rodent diet; ST - fed a standard rodent diet and received testosterone (Durasteston® 10 mg/kg/week, IM); HL - fed a high fat diet and HLT - fed a high fat diet and received testosterone (Durasteston® 10 mg/kg/week, IM). After the experiment, blood was collected by puncture of the retroorbital venous plexus for serum determinations of glucose, insulin, triglycerides, total cholesterol and its fractions. Subsequently, thoracotomy was performed, thoracic aorta and heart were removed for analysis of oxidative status and cardiac morphology. **Results:** HL and HLT mice presented severe mixed

B.

dyslipidemia compared to S and ST mice. However, HLT mice showed an increase in serum HDL levels compared to HL. ST and HLT mice also exhibited LVH, characterized by increased cardiomyocyte diameter, however, they did not show increased collagen deposition compared to HL mice. Testosterone partially prevented the increase in the immunoreactive area for CD40L (HLT vs HL). Testosterone in the HLT group prevented the increase in superoxide anions in the aorta and in the Homa index, compared to mice in the HL group, with a reduction in plasma insulin levels, without altering glycemia. **Conclusion:** In this study, exogenous testosterone provided beneficial cardiac and metabolic effects in dyslipidemic mice. However, it is necessary to pay attention to its levels in patients with heart disease and type 2 diabetes mellitus.

**Keywords:** Mouse; Oxidative Stress; Lipid Profile; Insulin Resistance; Testosterone; Dyslipidemia.

## 1. INTRODUÇÃO

A dislipidemia se caracteriza por distúrbios nas concentrações do colesterol total, das suas frações e dos triglicérides, assim como reduções nos níveis de HDL, um dos mais significantes fatores de risco para doenças cardiovasculares<sup>1</sup>.

A dislipidemia associada à trilogia composta por processo inflamatório, disfunção do endotélio e estresse oxidativo, aumenta o risco ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2<sup>2-4</sup>. A resistência à insulina tem sido associada a níveis baixos de HDL e hipertrigliceridemia, de modo que esses dois marcadores lipídicos plasmáticos relacionados são características da síndrome metabólica, diabetes e hipertrofia cardíaca<sup>6-7</sup>.

Estudos mostraram que camundongos dislipidêmicos knockout para o gene do receptor de LDL (LDLr<sup>-/-</sup>) alimentados com dieta hiperlipídica por 15 dias, apresentaram aterosclerose, aumento de 4,7 e 1,2 vezes nas concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicérides, respectivamente, e aumento do estresse oxidativo na aorta, hipertrofia ventricular esquerda com aumento de 30% no diâmetro dos cardiomiócitos e 35,5% do aumento do colágeno intersticial e perivascular em relação aos camundongos Ldlr<sup>-/-</sup> alimentados com dieta padrão<sup>8-10</sup>. Além disso, apresentaram redução severa do HDL e aumento do processo inflamatório cardíaco marcado pelo aumento na área imunorreativa para CD40L<sup>9</sup>.

Estudos mostraram associação entre níveis baixos de testosterona a obesidade, a síndrome metabólica, intolerância à glicose, diabetes mellitus tipo 2 e risco de doenças cardiovasculares<sup>11-15</sup>. Além disso, homens com hipogonadismo aumentam a chance de ter hipercolesterolemia<sup>16</sup>.

Os autores Jones e Kelly (2018) sugeriram que a testosterona diminui os níveis de HDL por intensificar o transporte reverso do colesterol, permitindo assim que o HDL remova o excesso de colesterol da parede arterial, facilitando o transporte para o fígado para eliminação, o que leva a um aumento do catabolismo.

Contudo, estudos epidemiológicos têm demonstrado correlação entre os níveis de testosterona e doenças cardiovasculares, condições como síndromes metabólicas e diabetes mellitus tipo 2<sup>17-20</sup>. Diante da constante busca por terapias no controle da dislipidemia e prevenção da hipertrofia

cardíaca, o objetivo do estudo foi avaliar a influência da testosterona exógena na dislipidemia e na hipertrofia ventricular esquerda de camundongos dislipidêmicos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEUA IFSULDEMINAS, sob parecer de número: 05A/ 2014.

### 2.1 Design experimental

Foram utilizados camundongos machos, de 3 meses de idade, homozigotos para a ausência (knockout) do gene receptor de LDL (LDLr -/-), obtidos a partir do background C57BL6, pesando  $21 \pm 3$  gramas. Os animais foram provenientes do biotério da Universidade José do Rosário Vellano (Alfenas, MG, Brasil), mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Os camundongos LDLr -/- foram divididos em quatro tratamentos (n=10): S: animais alimentados com dieta padrão (Nuvital®) para roedores e sem aplicação de testosterona; ST: animais alimentados com dieta padrão (Nuvital®) para roedores e com aplicação de testosterona; HL: animais alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico) e sem aplicação de testosterona; HLT: animais alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico) e com aplicação de testosterona.

Os grupos de camundongos tratados com testosterona receberam Durasteston® (princípio ativo: propionato de testosterona 30mg; fempropionato de testosterona 60mg; isocaproato de testosterona 60mg; decanoato de testosterona 100mg) na dose de 10mg/kg/semana, por via intramuscular.

Após 60 dias de experimento, todos os camundongos permaneceram em jejum de 8 horas, foram pesados e, em seguida, anestesiados por via intraperitoneal (IP) utilizando-se Xilazina / Ketamina (Bayer AS® e Parke-Davis®) nas doses de 9 e 90mg/Kg, respectivamente.

### 2.2 Dosagens bioquímicas

Após o experimento, o sangue foi coletado por punção do plexo venoso retro-orbital para as determinações séricas de glicose, insulina, triglicerídeos, colesterol total e suas frações. A determinação da concentração de glicose circulante foi realizada pelo método enzimático colorimétrico, utilizando o kit glicose PAP Liquiform da Labtest Diagnóstica (Trinder 1969, Sacks

B.

2002). O nível plasmático da insulina foi mensurado com o kit comercial ELISA específico (DAKO Ltd, High Wycombe, Bucks, UK). O índice de Homa (Homair) foi calculado pela fórmula: {Homair = insulinemia de jejum [mU/L] × glicemia em jejum [mmol/L/22,5]}, para determinar a resistência à insulina.

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

A colesterolemia foi determinada pelo método enzimático, conforme kit colesterol Liquiform da Labtest, utilizando-se associação da reação de oxidação catalisada pelo colesterol oxidase, após hidrólise dos ésteres de colesterol, com leitura de absorbância em 500 nm.<sup>21</sup>. As amostras foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante do kit, e após a leitura da absorbância em 500 nm, foi calculada a concentração de colesterol em mg/dL. Foi utilizado o sistema enzimático do kit colesterol HDL da Labtest para precipitação das lipoproteínas de baixa e de alta densidade (LDL e VLDL) e determinação do HDL no sobrenadante após centrifugação<sup>22</sup>.

Os valores das concentrações do VLDL foram obtidos pela divisão dos valores de triglicérides por 5 e os valores do LDL pela subtração de HDL e VLDL do colesterol total<sup>21-22</sup>.

### 2.3 Estado oxidativo

Após a toracotomia, a aorta torácica foi removida. Os níveis de ânion superóxido foram avaliados em homogenados de aorta torácica, utilizando-se quimioluminescência de lucigenina (5mmol/L), conforme descrito por Laurindo et al. (2002). Os resultados foram relatados como contagens por minuto (cpm)/mg de proteína, quantificadas pelo método de Bradford.

### 2.4 Morfologia cardíaca

Após a toracotomia, o coração foi removido. Os átrios e a parede do ventrículo direito foram descartados e o ventrículo esquerdo pesado para calcular a razão peso ventricular (mg)/peso do camundongo (g), para determinar a hipertrofia ventricular. Após a pesagem, os ventrículos esquerdos foram para a análise histológica. Os ventrículos esquerdos destinados para a análise histológica foram fixados por 24 horas em formalina a 10%. Em seguida, foram incluídos em parafina para cortes histológicos de quatro micrômetros de espessura. Cortes histológicos foram corados com *picrosírius red* e com hematoxilina/eosina para análise quantitativa do colágeno, análise morfométrica dos cardiomiócitos e para determinar a área da placa de ateroma, respectivamente. Foram obtidas quatro fotomicrografias (200x), a partir de um mesmo ponto pré-fixado dos cortes transversais do ventrículo de cada camundongo, utilizando-se a câmera digital acoplada ao programa Leica IM50 (versão 1.20).

Foram medidos os diâmetros de 8 a 12 cardiomiócitos de cada corte histológicos, totalizando 8 cortes histológicos em cada animal.

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

Os cortes histológicos para imunistoquímica dos ventrículos foram tratados com peróxido de hidrogênio a 3% para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos com leite desnatado 2% diluído em PBS (phosphate-buffered saline) 10Mm pH 7,4. As lâminas foram incubadas por 12 horas com anticorpo policlonal produzido em coelho anti-CD40L (Santa Cruz® 1:50) em câmara úmida. Após a incubação com o anticorpo primário, foi feita a incubação com anticorpo secundário biotilado (kit Dako® LSAB+), durante uma hora a 37°C. Para evidenciar as áreas imunorreativas, os cortes foram incubados com o complexo conjugado com peroxidase (Dako® LSAB+), durante 45 minutos a 37 °C e colocados em solução de cromógeno (50mg de DAB em 50ml de PBS com 3ml de água oxigenada 10%) por três minutos. Posteriormente, coloração com hematoxilina de Harris (Sigma®) por 25 segundos. Em seguida, as lâminas foram montadas e analisadas em microscópio óptico. Todas as análises histológicas deste estudo foram executadas por um único examinador.

## 2.5 Analise estatística

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

## 3. RESULTADOS

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

B.

testosterona (ST e HLT) ganharam mais peso que os demais grupos (24,8±0,4 g e 27,1±0,4g, respectivamente). Contudo, os camundongos do grupo HL ganharam mais peso que os animais do grupo S (26,9±0,5g e 22,5±0,4g, respectivamente).

### 3.1 Perfil lipídico

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

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

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

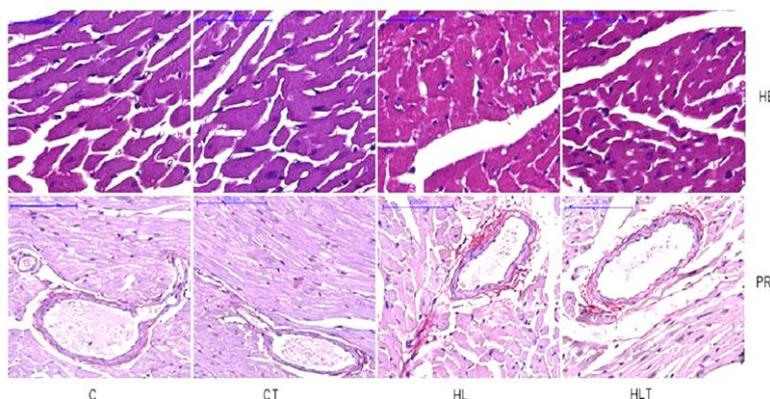
Valores expressos em média ± EPM. S: grupo controle; ST: grupo tratado com dieta padrão e testosterona; HL: grupo tratado com dieta hiperlipídica; HLT: grupo tratado com dieta hiperlipídica e testosterona; TC: colesterol total; TG: triglicéridios. n=7 em cada grupo. a P<0.05 vs S; b P<0.05 vs ST; c P<0.05 vs HL; d P<0.05 vs HLT.

### 3.3 Parâmetros morfológicos e morfométricos

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

B.

quando comparados com os camundongos do grupo HL (Figura 1). A testosterona preveniu o aumento da área imunorreativa para o CD40L no grupo HLT.



**Figura 1:** HE (coloração com hematoxilina e eosina): fotomicrografias representando o ventrículo esquerdo, mostrando o diâmetro dos cardiomiócitos. PR (coloração com picrossirius red): fotomicrografias mostrando a distribuição do colágeno intersticial e perivascular (marcado em vermelho pelo corante) no miocárdio do ventrículo esquerdo dos camundongos. C: grupo de camundongos que receberam alimentação padrão; CT: grupo de camundongos que receberam ração padrão e testosterona; HL: grupo de camundongos que receberam ração com alto teor de gordura; HLT: grupo de camundongos que receberam ração com alto teor de gordura e testosterona.

**Tabela 2. Parâmetros da Aorta e do ventrículo esquerdo (VE).**

	S	ST	HL	HLT
<u>Aorta</u>				
Ânion superóxido (cpm x 10 <sup>6</sup> /mg proteína)	6.7±1.3	6.1±1.1	14.1±1,4 <sup>a,b,d</sup>	6.9±1.5
<u>VE</u>				
Diâmetro dos cardiomiócitos (µm)	19±0,5	24±0,7 <sup>a,d</sup>	25±0,5 <sup>a</sup>	27±0,6 <sup>a,b</sup>
Colágeno (%)	5,2±0,3	5,6±0,3 <sup>c</sup>	10,3±0,5 <sup>a,b,d</sup>	6,6±0,3 <sup>c</sup>
Peso do VE (mg)/peso corpóreo (g)	3,5±0,08	4,0±0,07 <sup>a,c,d</sup>	4,5±0,04 <sup>a,b</sup>	4,6±0,06 <sup>a,b</sup>
CD40L (%)	3,2 ± 0,3	3,1 ± 0,3 <sup>c,d</sup>	7,9 ± 0,3 <sup>a,b,d</sup>	5,1 ± 0,2 <sup>a,b,c</sup>

Valores expressos em média ± EPM S: grupo controle; ST: grupo tratado com dieta padrão e testosterona; HL: grupo tratado com dieta hiperlipídica; HLT: grupo tratado com dieta hiperlipídica e testosterona. n=7 em cada grupo. a P<0.05 vs S; b P<0.05 vs ST; c P<0.05 vs HL; d P<0.05 vs HLT.

A dislipidemia severa observada nos camundongos HL gerou um maior estresse oxidativo (evidenciado pelo aumento dos ânions superóxidos na aorta) associado à resistência insulínica com aumento dos níveis de insulina e do HOMA<sub>ir</sub>, quando comparados ao grupo S (Tabela 2).

A administração de testosterona nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (grupo HLT) preveniu o aumento dos níveis plasmáticos de insulina e consequentemente do HOMA<sub>ir</sub>, sem alterar, contudo, a glicemia (Figura 1) e redução da produção de ânions superóxidos (Tabela 2). Os

camundongos do grupo ST não apresentaram diferenças entre os níveis plasmáticos de glicose, insulina, HOMA<sub>ir</sub> (Tabela 1) e ânions superóxidos quando comparados com os do grupo S (Tabela 2).

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se que camundongos *Ldlr*<sup>-/-</sup> alimentados com dieta hiperlipídica (grupo HL) apresentaram uma dislipidemia mista severa com aumento níveis séricos do colesterol total, LDL, VLDL e triglicérides e declínio acentuado nos níveis plasmáticos de HDL, corroborando com os resultados apresentados por Gonçalves *et al.* (2017). Essa dislipidemia está associada a aumentos no estresse oxidativo da aorta e processo inflamatório cardíaco quando comparados com animais do grupo S. O HDL possui um importante papel como molécula protetora contra inflamação e estresse oxidativo<sup>9, 28,29</sup>. Acredita-se que a diminuição plasmática de HDL associada ao estresse oxidativo (caracterizado pelo aumento do superóxido) e ao processo inflamatório (caracterizado pelo aumento na expressão de CD40L) leve à diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico, com consequente desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda nos camundongos HL. Estudos mostram que o superóxido (O<sub>2</sub>) produzido em camundongos *LDLr*<sup>-/-</sup> alimentados com uma dieta rica em gordura é significativamente maior do que em camundongos *LDLr*<sup>-/-</sup> alimentados com dieta padrão<sup>8,30</sup>. Além disso, a resistência insulínica, associada à hiperinsulinemia, decorrente dos distúrbios metabólicos dos lipídeos observado por Okoshi *et al.* (2007) colabora para a ativação de vias hipertróficas ventriculares, o que também pode explicar as alterações dos camundongos HL observadas neste estudo.

A administração de testosterona nos camundongos do grupo ST induziu a HVE, representada por aumento de diâmetros de cardiomiócitos, com provável efeito deste hormônio em seus receptores específicos, sem interferir no depósito de colágeno, quando comparados com o grupo S. Esta hipertrofia de cardiomiócitos também foi observada em culturas de miócitos tratados com testosterona mediada por um receptor específico de andrógeno<sup>32</sup>.

Estudo de Barquilha (2011) também mostrou que a testosterona pode modificar a atividade PPARs (receptor ativado por proliferador de peroxissoma), causando a hipertrofia de cardiomiócitos.

Os camundongos HLT que tiveram a testosterona associada à dislipidemia, também apresentaram hipertrofia ventricular esquerda, porém, com menor depósito de colágeno e prevenção parcial na diminuição dos níveis de HDL, quando comparados com o grupo HL. Cai *et al.* (2015) demonstraram que a deficiência de testosterona induzida por castração causou aumento significativo dos níveis séricos de colesterol em porcos alimentados com dieta rica em colesterol, e esses efeitos foram revertidos pela administração de testosterona. Isto segundo os autores pode ser atribuído em

parte pela diminuição da depuração hepática do LDL. Shapiro *et al.* (1999) demonstraram aumento dos níveis de HDL, após injeções intravenosas de testosterona e, Nordoy *et al.* (1979) mostraram que há uma associação positiva entre níveis de testosterona e HDL, como observado no presente estudo.

O efeito anti-inflamatório e antioxidante do HDL nos camundongos HLT preveniu o processo inflamatório, o estresse oxidativo e melhorou a resistência insulínica, prevenindo parcialmente o aumento dos níveis séricos da insulina. A terapia de reposição melhora o modelo homeostático de resistência à insulina e hemoglobina A1c em diabéticos<sup>37</sup>. Acredita-se que a fibrose observada na hipertrofia no grupo HL tenha relação com a hiperinsulinemia e, portanto, tem características diferentes da hipertrofia observada no grupo HLT que se apresenta com menor fibrose, porém, com uma tendência a um maior diâmetro de cardiomiócitos. Contudo, as vias desses diferentes tipos de hipertrofia necessitam ser investigadas.

Os camundongos S e ST não tiveram variação nos valores de insulina, comparados aos camundongos HL e HLT. A hiperinsulinemia observada nos camundongos HL foi associada à resistência insulínica desencadeada pela dislipidemia mista severa, contudo a testosterona nos camundongos do grupo HLT preveniu parcialmente a hiperinsulinemia. Nosso resultado corrobora com a metanálise de Ding *et al.* (2006), a qual verificou que homens com maiores níveis de testosterona tinham um risco 42% menor de diabetes mellitus tipo 2 e prevenção parcial da hiperinsulinemia, do processo inflamatório cardíaco, da resistência insulínica, além de prevenção total do estresse oxidativo da aorta. Portanto, a obesidade está frequentemente associada à hiperlipidemia e diabetes mellitus tipo 2 (DM2), duas condições intimamente relacionadas a doenças cardiovasculares<sup>39</sup>. A reposição de testosterona em homens com diabetes tipo 2 e hipogonadismo diminui a mortalidade por causas cardíacas, portanto significa que tal hormônio tem um papel importante na saúde. Porém não está claro se a testosterona está envolvida com a proteção da saúde cardiovascular e/ou estabilização ou melhoria da doença cardiovascular previamente estabelecida<sup>40</sup>.

Níveis baixos de testosterona endógena biodisponíveis demonstraram estar associados a taxas mais elevadas de mortalidade, todas relacionadas a causas cardiovasculares<sup>41-42</sup>. Sá *et al.* (2009) demonstraram que a testosterona endógena exerce um efeito neutro e/ou benéfico no sistema cardiovascular (SCV) masculino. Já Whitsel *et al.* (2001), demonstraram que a administração de testosterona exógena (intramuscular) esteve relacionada à redução dos valores do HDL, o que contrapõe os achados no nosso estudo (grupo HLT). No estudo de Haring *et al.* (2013), as baixas concentrações totais de testosterona estão prospectivamente associadas a um perfil lipídico adverso e aumento do risco de dislipidemia incidente. Kirby *et al.* (2019) observaram melhorias no controle glicêmico e nos perfis lipídicos em homens hipogonadais recebendo terapia de reposição de testosterona. Essas descobertas são particularmente interessantes e podem contribuir para explicar o

maior risco de doença cardiovascular em homens com menores concentrações totais de testosterona<sup>47,43</sup>.

Em revisão, Kirby et al. (2019) concluíram que muitos estudos demonstram que uma baixa concentração sérica de testosterona é associada ao aumento do risco de óbito cardiovascular e que a terapia de reposição pode ter benefícios clínicos relevantes, em concordância com Elagizi et al. (2018) que por sua vez mostrou que o nível fisiológico normal de testosterona é benéfico para a saúde cardiovascular em homens e que sua deficiência está associada a um perfil metabólico desfavorável e aumento de eventos de doenças cardiovasculares.

O estudo de Liebson (2000) demonstrou que a HVE aumenta o risco de doença cardíaca coronária (redução da reserva de fluxo coronário), insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral, isquemia cerebral transitória, mortalidade total e morte súbita. Em contrapartida Kirby et al. (2019) demonstraram uma correlação negativa entre níveis endógenos de testosterona e espessura íntima-média das artérias carótidas, aorta abdominal e aorta torácica, o que sugere que homens com níveis mais baixos de testosterona endógena podem estar em maior risco de desenvolvimento de aterosclerose de forma mais generalizada. A dieta hiperlipídica pode levar à obesidade, que por sua vez, está associada com o aumento da mortalidade cardiovascular. O perfil hemodinâmico do paciente hipertenso obeso é o de expansão de volume de sangue e aumento da pré-carga e da massa ventricular esquerda<sup>50</sup>.

O CD40L é uma proteína transmembrana que exerce um efeito pró-oxidante e, no miocárdio dos camundongos dos grupos HL e HLT, foram encontrados níveis maiores que nos grupos S e ST. A interação com o receptor CD40 inicia a resposta inflamatória, que por sua vez participa do início e progressão da doença cardiovascular aterosclerótica e induz a resistência insulínica, favorecendo a síndrome coronariana aguda<sup>51</sup>, podendo ocorrer a ativação da via NF-kappa b perpetuando a resposta inflamatória<sup>52</sup> e a fosforilação do IKK (inibidor Kappa b quinase), ativando genes envolvidos na inflamação e na hipertrofia cardíaca<sup>53</sup>.

O estudo de Christison et al. (1996) demonstrou que a hiperlipidemia grave pode ser considerada o fator metabólico indutor do maior estresse oxidativo hepático em ratos. No presente estudo, observou estresse oxidativo na aorta no sistema cardiovascular, aumentando a peroxidação lipídica da molécula de HDL e, conseqüentemente, a sua remoção hepática, com diminuição dos níveis plasmáticos do HDL e da sua função cardiovascular protetora antioxidante e anti-inflamatória, favorecendo o processo inflamatório cardiovascular e a resistência insulínica nos camundongos do grupo HL, o que também pode ser confirmado neste estudo, no qual o índice de LDL do grupo HL foi maior, comparado ao grupo HLT. Todavia, os níveis de HDL são menores no grupo HL, comparados ao grupo HLT, sugerindo um efeito terapêutico benéfico da testosterona exógena, associada a uma dieta hiperlipídica.

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se que camundongos *Ldlr*<sup>-/-</sup> alimentados com dieta hiperlipídica (grupo HL) apresentaram uma dislipidemia mista severa com aumento níveis séricos do colesterol total, LDL, VLDL e triglicérides e declínio acentuado nos níveis plasmáticos de HDL, corroborando com os resultados apresentados por Gonçalves *et al.* (2017). Essa dislipidemia está associada a aumentos no estresse oxidativo da aorta e processo inflamatório cardíaco quando comparados com animais do grupo S. O HDL possui um importante papel como molécula protetora contra inflamação e estresse oxidativo<sup>9,29,30</sup>. Acredita-se que a diminuição plasmática de HDL associada ao estresse oxidativo (caracterizado pelo aumento do superóxido) e ao processo inflamatório (caracterizado pelo aumento na expressão de CD40L) leve à diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico, com consequente desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda nos camundongos HL. Estudos mostram que o superóxido (O<sub>2</sub>) produzido em camundongos *LDLr*<sup>-/-</sup> alimentados com uma dieta rica em gordura é significativamente maior do que em camundongos *LDLr*<sup>-/-</sup> alimentados com dieta padrão<sup>8,30</sup>. Além disso, a resistência insulínica, associada à hiperinsulinemia, decorrente dos distúrbios metabólicos dos lipídeos observado por Okoshi *et al.* (2007) colabora para a ativação de vias hipertróficas ventriculares, o que também pode explicar as alterações dos camundongos HL observadas neste estudo.

A administração de testosterona nos camundongos do grupo ST induziu a HVE, representada por aumento de diâmetros de cardiomiócitos, com provável efeito deste hormônio em seus receptores específicos, sem interferir no depósito de colágeno, quando comparados com o grupo S. Esta hipertrofia de cardiomiócitos também foi observada em culturas de miócitos tratados com testosterona mediada por um receptor específico de andrógeno<sup>32</sup>.

Estudo de Barquilha (2011) também mostrou que a testosterona pode modificar a atividade PPARs (receptor ativado por proliferador de peroxissoma), causando a hipertrofia de cardiomiócitos.

Os camundongos HLT que tiveram a testosterona associada à dislipidemia, também apresentaram hipertrofia ventricular esquerda, porém, com menor depósito de colágeno e prevenção parcial na diminuição dos níveis de HDL, quando comparados com o grupo HL. Cai *et al.* (2015) demonstraram que a deficiência de testosterona induzida por castração causou aumento significativo dos níveis séricos de colesterol em porcos alimentados com dieta rica em colesterol, e esses efeitos foram revertidos pela administração de testosterona. Isto segundo os autores pode ser atribuído em parte pela diminuição da depuração hepática do LDL. Shapiro *et al.* (1999) demonstraram aumento dos níveis de HDL, após injeções intravenosas de testosterona e, Nordoy *et al.* (1979) mostraram que há uma associação positiva entre níveis de testosterona e HDL, como observado no presente estudo.

O efeito anti-inflamatório e antioxidante do HDL nos camundongos HLT preveniu o processo inflamatório, o estresse oxidativo e melhorou a resistência insulínica, prevenindo parcialmente o aumento dos níveis séricos da insulina. A terapia de reposição melhora o modelo homeostático de resistência à insulina e hemoglobina A1c em diabéticos<sup>37</sup>. Acredita-se que a fibrose observada na hipertrofia no grupo HL tenha relação com a hiperinsulinemia e, portanto, tem características diferentes da hipertrofia observada no grupo HLT que se apresenta com menor fibrose, porém, com uma tendência a um maior diâmetro de cardiomiócitos. Contudo, as vias desses diferentes tipos de hipertrofia necessitam ser investigadas.

Os camundongos S e ST não tiveram variação nos valores de insulina, comparados aos camundongos HL e HLT. A hiperinsulinemia observada nos camundongos HL foi associada à resistência insulínica desencadeada pela dislipidemia mista severa, contudo a testosterona nos camundongos do grupo HLT preveniu parcialmente a hiperinsulinemia. Nosso resultado corrobora com a metanálise de Ding *et al.* (2006), a qual verificou que homens com maiores níveis de testosterona tinham um risco 42% menor de diabetes mellitus tipo 2 e prevenção parcial da hiperinsulinemia, do processo inflamatório cardíaco, da resistência insulínica, além de prevenção total do estresse oxidativo da aorta. Portanto, a obesidade está frequentemente associada à hiperlipidemia e diabetes mellitus tipo 2 (DM2), duas condições intimamente relacionadas a doenças cardiovasculares<sup>39</sup>. A reposição de testosterona em homens com diabetes tipo 2 e hipogonadismo diminui a mortalidade por causas cardíacas, portanto significa que tal hormônio tem um papel importante na saúde. Porém não está claro se a testosterona está envolvida com a proteção da saúde cardiovascular e/ou estabilização ou melhoria da doença cardiovascular previamente estabelecida<sup>40</sup>.

Níveis baixos de testosterona endógena biodisponíveis demonstraram estar associados a taxas mais elevadas de mortalidade, todas relacionadas a causas cardiovasculares<sup>41-42</sup>. Sá *et al.* (2009) demonstraram que a testosterona endógena exerce um efeito neutro e/ou benéfico no sistema cardiovascular (SCV) masculino. Já Whitsel *et al.* (2001), demonstraram que a administração de testosterona exógena (intramuscular) esteve relacionada à redução dos valores do HDL, o que contrapõe os achados no nosso estudo (grupo HLT). No estudo de Haring *et al.* (2013), as baixas concentrações totais de testosterona estão prospectivamente associadas a um perfil lipídico adverso e aumento do risco de dislipidemia incidente. Kirby *et al.* (2019) observaram melhorias no controle glicêmico e nos perfis lipídicos em homens hipogonadais recebendo terapia de reposição de testosterona. Essas descobertas são particularmente interessantes e podem contribuir para explicar o maior risco de doença cardiovascular em homens com menores concentrações totais de testosterona<sup>47,42</sup>. Em revisão, Kirby *et al.* (2019) concluíram que muitos estudos demonstram que uma baixa concentração sérica de testosterona é associada ao aumento do risco de óbito cardiovascular e que a terapia de reposição pode ter benefícios clínicos relevantes, em concordância com Elagizi *et al.* (2018)

B.

que por sua vez mostrou que o nível fisiológico normal de testosterona é benéfico para a saúde cardiovascular em homens e que sua deficiência está associada a um perfil metabólico desfavorável e aumento de eventos de doenças cardiovasculares.

O estudo de Liebson (2000) demonstrou que a HVE aumenta o risco de doença cardíaca coronária (redução da reserva de fluxo coronário), insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral, isquemia cerebral transitória, mortalidade total e morte súbita. Em contrapartida Kirby et al. (2019) demonstraram uma correlação negativa entre níveis endógenos de testosterona e espessura íntima-média das artérias carótidas, aorta abdominal e aorta torácica, o que sugere que homens com níveis mais baixos de testosterona endógena podem estar em maior risco de desenvolvimento de aterosclerose de forma mais generalizada. A dieta hiperlipídica pode levar à obesidade, que por sua vez, está associada com o aumento da mortalidade cardiovascular. O perfil hemodinâmico do paciente hipertenso obeso é o de expansão de volume de sangue e aumento da pré-carga e da massa ventricular esquerda<sup>50</sup>.

O CD40L é uma proteína transmembrana que exerce um efeito pró-oxidante e, no miocárdio dos camundongos dos grupos HL e HLT, foram encontrados níveis maiores que nos grupos S e ST. A interação com o receptor CD40 inicia a resposta inflamatória, que por sua vez participa do início e progressão da doença cardiovascular aterosclerótica e induz a resistência insulínica, favorecendo a síndrome coronariana aguda<sup>51</sup>, podendo ocorrer a ativação da via NF-kappa b perpetuando a resposta inflamatória<sup>52</sup> e a fosforilação do IKK (inibidor Kappa b quinase), ativando genes envolvidos na inflamação e na hipertrofia cardíaca<sup>53</sup>.

O estudo de Christison et al. (1996) demonstrou que a hiperlipidemia grave pode ser considerada o fator metabólico indutor do maior estresse oxidativo hepático em ratos. No presente estudo, observou estresse oxidativo na aorta no sistema cardiovascular, aumentando a peroxidação lipídica da molécula de HDL e, conseqüentemente, a sua remoção hepática, com diminuição dos níveis plasmáticos do HDL e da sua função cardiovascular protetora antioxidante e anti-inflamatória, favorecendo o processo inflamatório cardiovascular e a resistência insulínica nos camundongos do grupo HL, o que também pode ser confirmado neste estudo, no qual o índice de LDL do grupo HL foi maior, comparado ao grupo HLT. Todavia, os níveis de HDL são menores no grupo HL, comparados ao grupo HLT, sugerindo um efeito terapêutico benéfico da testosterona exógena, associada a uma dieta hiperlipídica.

## 6. CONCLUSÕES

Neste estudo, a testosterona exógena proporcionou efeito metabólico e cardíaco benéfico em camundongos dislipidêmicos. Sugerindo, portanto, a reposição desta, em pacientes dislipidêmicos

com resistência insulínica; diabetes mellitus tipo 2; e com hipogonadismo. Visto que, seria uma estratégia terapêutica válida; a qual pode proporcionar aos pacientes, maior qualidade de vida. Porém, mais estudos devem ser realizados nessa área; com ênfase nas vias pelas quais alterações fenotípicas, mediadas pela testosterona, ocorrem.

## AGRADECIMENTOS

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

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

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Faludi AA, Oliveira de MC, Saraiva JFK, Chacra APM, Bianco HT, Neto AA, et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. *Arq. Bras. Cardiol.* 2017;109(2) [acesso 1 Març 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.5935/abc.20170121>.
2. Araújo AB, Dixon JM, Suarez EA, Murad MH, Guey LT, Witter GA. Endogenous testosterone and mortality in men: A systematic review and meta-analysis. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 2011; 96(10) [acesso 20 abr 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1137>
3. Haring R, Baumeister SE, Völzke H, Dörr M, Felix SB, Kroemer HK, et al. Prospective association of low total testosterone concentrations with an adverse lipid profile and increased incident dyslipidemia. *Eur. J. Cardiovasc.* 2011;18(1) [acesso 22 abr 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1097/HJR.0b013e32833c1a8d>.
4. Dhindsa S, Prabhakar S, Sethi M, Bandyopadhyay A, Chaudhuri A, Dandona P. Frequent occurrence of hypogonadotropic hypogonadism in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89(11) [acesso 21 abr 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0804>.
5. Martins MV, Souza JD, Martinho KO, Franco FS, Tinôco ALA. Association between triglycerides and HDL-cholesterol ratio and cardiovascular risk factors among elderly persons receiving care under the family health strategy of Viçosa, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Geriatria e*

- Gerontologia,2017;20(2), 236-243. [acesso 1 abr 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1590/1981-22562017020.160059>.
6. Lee TM, Lin MS, Chou TF, Tsai CH, Chang NC. Effect of pravastatin on left ventricular mass by activation of myocardial K ATP channels in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*. 2004;176(2) [acesso 2 Març 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.06.005>.
7. Ormazabal V, Nair S, Elfeky O, Aguayo C, Salomão C, Zuñiga F. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol*. 2018;17(1) [acesso 2 abr 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0762-4>.
8. Krieger MH, Santos KF, Shishido SM, Wanschel AC, Estrela HF, Santos L et al. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide*. 2006;14(1) [acesso 1 Jun 2020]. Disponível: [doi: 10.1016/j.niox.2005.07.011](https://doi.org/10.1016/j.niox.2005.07.011)
9. Garcia JAD, de Lima CC, Messoria LB, Cruz AF, Marques AP, Simão TP, et al. Efeito anti-inflamatório da lipoproteína de alta densidade no sistema cardiovascular de camundongos hiperlipidêmicos. *Rev. Port. Cardiol*. 2011;30(10) [acesso 22 abr 2020]. Disponível: [https://doi.org/10.1016/S0870-2551\(11\)70024-5](https://doi.org/10.1016/S0870-2551(11)70024-5).
10. Pereira JL, Souza PCS, Shinzato VI, Sasso S, Santo BLSE, Santana LF, Restel TI, Freitas KC. Ganho de peso e alterações metabólicas em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. *Ciência&Saúde* 2018;11(1) [acesso 4 Març 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.15448/1983-652X.2018.1.27672>
11. Cheung, MWL. Modeling dependent effect sizes with three-level meta-analyses: A structural equation modeling approach. *Psychological Methods*. 2014;19(2) [acesso 2 Jun 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1037/a0032968>
12. Kelly DM, Jones TH. Testosterone: A vascular hormone in health and disease. *J Endocrinol*. 2013;217(3) [acesso 18 abr 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0582>
13. Ohlsson C, Mohan S, Sjogren k, Tivesten A, Isgaard J, Isaksson O, et al. Aspectos genéticos da formação de epitestosterona e disposição androgênica: influência de polimorfismos nas enzimas CYP17 e UGT2B. *Farmacogenética e Genômica*. 2011;30(5) [acesso 2 abr 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1210/er.2009-0010>
14. Bronzati L, Bertoglio SR, Coelho LJS, Lourenço AC. Síndrome Metabólica Associada ao Hipogonadismo, Resistência Insulínica, Dislipidemia e Deficiência de vitamina D – Relato de Caso.

- Rev. UNINGÁ. 2019; 56(4) [acesso 20 abr 2020]. Disponível: <http://revista.uninga.br/index.php/uninga/article/view/3150>
15. Ramirez VDAA. Prevalência de Deficiência Androgênica em Pacientes do Sexo Masculino com Diabetes Mellitus Tipo 2 [Tese]. São Paulo (SP): Residência Médica do Hospital do Servidor Público Municipal de São Paulo; 2016.
16. Lahsen, M. Síndrome metabólico y diabetes. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2014;25(1) [acesso 2 Jun 2020]. Disponível: [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70010-0](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70010-0)
17. Saad F. O papel da testosterona no diabetes melito tipo 2 e síndrome metabólica em homens. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 2009;53(8) [acesso 4 Març 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302009000800002>
18. Zarotsky V, Huang MY, Carman W, Morgentaler A, Singhal PK, Coffin D, Jones TH. Systematic literature review of the risk factors, comorbidities, and consequences of hypogonadism in men. *Andrology*. 2014;2(6) [acesso 5 mai 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1111/andr.274>.
19. Kloner RA, Carlson C, Dobs A, Kopecky S, Mohler ER. Testosterone and Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2016;67(5) [acesso 1 Jun 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.12.005>.
20. Oskui PM, French WJ, Herring MJ, Mayeda GS, Burstein S, Kloner RA. Testosterone and the Cardiovascular System: A Comprehensive Review of the Clinical Literature. *Journal of the American Heart Association*. 2013;2(6) [acesso 3 Març 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000272>
21. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* 1969;6(1) [acesso 10 Jun 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1177/000456326900600108>
22. Sacks DA. On methods and materials. *Diabetes Care*. 2002;25(5) [acesso 5 Jun 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.2337/diacare.25.5.939>
23. Laurindo FRM, Souza HP, Pedro MP, Janiszewski M. Redox aspects of vascular response to injury. *Methods Enzymol.* 2002;352 [acesso 1 Març 2020]. Disponível: [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(02\)52039-5](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(02)52039-5).

- B.
24. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 1972;18(6) [acesso 22 abr 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1093/clinchem/18.6.499>.
25. Warnick GR, Nauck M, Rifai N. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays. *Clin Chem.* 2001; 47(9) [acesso 12 Jun 2020]. Disponível: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11514391/>
26. Martin SS, Blaha MJ, Elshazly MB, Brinton EA, Toth PP, McEvoy JW, et al. Friedewald-estimated versus directly measured low-density lipoprotein cholesterol and treatment implications. *J Am Coll Cardiol.* 2013;20;62(8) [acesso 2 Març 2020]. Disponível: doi: 10.1016/j.jacc.2013.01.079
27. Gonçalves ICV, Cerdeira CD, Camara EP, Garcia JAD, Brigagão MRPL, Silva RBV, Santos GB. Tempol improves lipid profile and prevents left ventricular hypertrophy in LDL receptor gene knockout (LDLr<sup>-/-</sup>) mice on a high-fat diet. *Rev. Port. de Cardiol.* 2017;36(9) [acesso 22 abr 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1016/j.repc.2017.02.014>.
28. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ. Res.* 2004; 95(8) [acesso 20 abr 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000146094.59640.13>
29. Jomard A & Osto E. High Density Lipoproteins: Metabolism, Function, and Therapeutic Potential. *Front. Cardiovasc. Med.* 2020;7(39) [acesso 23 abr 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00039>.
30. Barud W, Palusinsk R, Beltowski J, Wójcicka G. Inverse relationship between total testosterone and anti-oxidized low density lipoprotein antibody levels in ageing males. *Atherosclerosis.* 2002;164(2) [acesso 20 abr 2020]. Disponível: [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(02\)00069-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(02)00069-2)
31. Okoshi K., Guimarães JFC, Muzio DBP, Fernandes AAH, Okoshi MP. Diabetic cardiomyopathy. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 2007;51(2) [acesso 3 Març 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01514>
32. Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M et al. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary

B.

vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ. Res.* 2000; 86(2) [acesso 20 abr 2020]. Disponível: <https://doi: 10.1161/01.res.86.2.e29>.

33. Barquilha G. Uma análise da incidência de efeitos colaterais em usuários de esteróides anabolizantes praticantes de musculação da cidade de Bauru. *RBPFEEX.* 2011; 3(14) [acesso 20 abr 2020]. Disponível: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4923624>

34. Yu W. Wu J. Cai F. Xiang J. Zha W. Fan D. Guo S. Ming Z. Liu C. Curcumin alleviates diabetic cardiomyopathy in experimental diabetic rats. *PLoS One.* 2015;7(12):e52013 [acesso 4 abr 2020]. Disponível: <https://doi: 10.1371/journal.pone.0052013>

35. Shapiro J, Christiana J, Frishman WH. Testosterone and other anabolic steroids as cardiovascular drugs. *Am. J. Ther.* 1999; 6(3) [acesso 6 Jun 2020]. Disponível: <https://doi:10.1097/00045391-199905000-00008>.

36. Nordoy A, Aakvaag A, Thelle D. Sex hormones and high density lipoproteins in healthy males. *Atherosclerosis* 1979; 34(4) [acesso 3 Març 2020]. Disponível: [https://doi: 10.1016/0021-9150\(79\)90067-4](https://doi: 10.1016/0021-9150(79)90067-4).

37. Corona G., Monami M., Rastrelli G., Aversa A., Sforza A., Lenzi A., Forti G., Mannucci E. & Maggi M. Type 2 diabetes mellitus and testosterone: A meta-analysis study. *Int. J. Androl.* 2011;34(6) [acesso 21 abr 2020]. Disponível: <https://doi: 10.1111/j.1365-2605.2010.01117.x>.

38. Ding EL, Song Y, Malik VS, Liu S. Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Jama Network.* 2006; 295(11) [acesso 21 abr 2020]. Disponível: [doi: 10.1001/jama.295.11.1288](https://doi: 10.1001/jama.295.11.1288).

39. Stunkard AJ. Factores determinantes de la obesidad: Opinión actual. In: La obesidad en la pobreza: un nuevo reto para la salud pública [Tese]. Washington (DC): Organización Panamericana de la Salud. 2000 [acesso 10 Jun 2020]. Disponível: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/4006>

40. Jones TH & Kelly DM. Randomized controlled trials – mechanistic studies of testosterone and the cardiovascular system. *Asian Journal of Andrology.* 2018;20(2) [acesso 23 abr 2020]. Disponível: [doi: 10.4103/aja.aja\\_6\\_18](https://doi: 10.4103/aja.aja_6_18)

41. Menke A, Guallar E, Rohrmann S, Nelson WG, Rifai N, Kanarek N, et al. Sex steroid hormone concentrations and risk of death in US men. *Am. J. Epidemiol.* 2010;171(5) [acesso 2 Març 2020]. Disponível: <https://doi: 10.1093/aje/kwp415>.

42. Maron Ek. Níveis Séricos de Testosterona no Envelhecimento Masculino Associados aos Sintomas Sexuais como Fatores Preditores para Síndrome Coronariana Aguda [Tese]. Campos (RJ):

Programa de Pós-graduação em Mestrado Profissional em Pesquisa Operacional e Inteligência Computacional, da Universidade Candido Mendes; 2019.

43. Sá de EQC, Sá de FCF, Guedes AD, Verreschi do ITN. Testosterona sérica e doença cardiovascular em homens. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 2009;53(8) [acesso 4 Març 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302009000800004>.

44. Whitsel EA, Boyko AM, Matsumoto AM, Anawalt BD, Siscovick DS. Intramuscular testosterone esters and plasma lipids in hypogonadal men: a meta-analysis. *Am. J. Med.* 2001;111(4) [acesso 12 Jun 2020]. Disponível: [https://doi: 10.1016/s0002-9343\(01\)00833-6](https://doi: 10.1016/s0002-9343(01)00833-6).

45. Haring R, Völzke H, Spielhagen C, Nauck M, Wallaschofski H. The role of sex hormone-binding globulin and testosterone in the risk of incident metabolic syndrome. 2013;20(6) [acesso 23 abr 2020]. Disponível: <https://doi: 10.1177/2047487312452965>

46. Kirby M, Hackett G, Sudarshan R. Testosterone and the Heart. *Eur Cardiol.* 2019;14(2) [acesso 1 Jun 2020]. Disponível: <https://doi: 10.15420/ecr.2019.13.1>.

47. Malkin CJ, Pugh PJ, Morris PD, Asif S, Jones TH, Channer KS. Low serum testosterone and increased mortality in men with coronary heart disease. *Heart* 2010; 96(22) [acesso 2 Març]. Disponível: <https://doi: 10.1136/hrt.2010.195412>

48. Elagizi A, Köhler TS, Lavie CJ. 2018. Review: Testosterone and Cardiovascular Health. Elsevier - Mayo Clinic Proceeding. 2018;93(1) [acesso 21 abr 2020]. Disponível: <https://doi: 10.1016/j.mayocp.2017.11.006>.

49. Liebson E. Anosognosia and mania associated with right thalamic haemorrhage. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 200;68(1) [acesso 2 Març 2020]. Disponível: <https://doi: 10.1136/jnnp.68.1.107>.

50. Samesina N. & Amodeo C. Hipertrofia ventricular esquerda. *Rev. Bras. Hipert.* 2001;8(2) [acesso 5 Jun 2020]. Disponível: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-335054>

51. Arbel Y, Finkelstein A, Halkin A, Stanley A, Bittner V. Neutrophil/lymphocyte ratio is related to the severity of coronary artery disease and clinical outcome in patients undergoing angiography--the growing versatility of NLR. *Atherosclerosis.* 2013;228(1):44-5 [acesso 2 mai 2020]. Disponível: <https://doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.02.008>.

52. Costa MR. Efeitos da suplementação do licopeno sobre processos fisiopatológicos da doença gordurosa não alcoólica do fígado induzida por dieta hipercalórica rica em carboidratos simples

B.

[Dissertação]. Botucatu (SP): Universidade estadual paulista júlio de mesquita filho - Faculdade de medicina; 2019.

53. Vellaichamy E, Sommana NK, Pandey KN. Reduced GMP signaling activates NF- $\kappa$ B in hypertrophied hearts of mice lacking natriuretic peptide receptor-A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;327(1):106-111. Disponível: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.153>.

54. Christison J. Rapid reduction and removal of HDL-but not LDL-associated cholesteryl ester hydroperoxides by rat liver perfused in situ. *Biochem. J.* 1996;314(3) [acesso 21 abr 2020]. Disponível: <https://doi.org/10.1042/bj3140739>.