



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Jorge Luiz Medeiros Junior

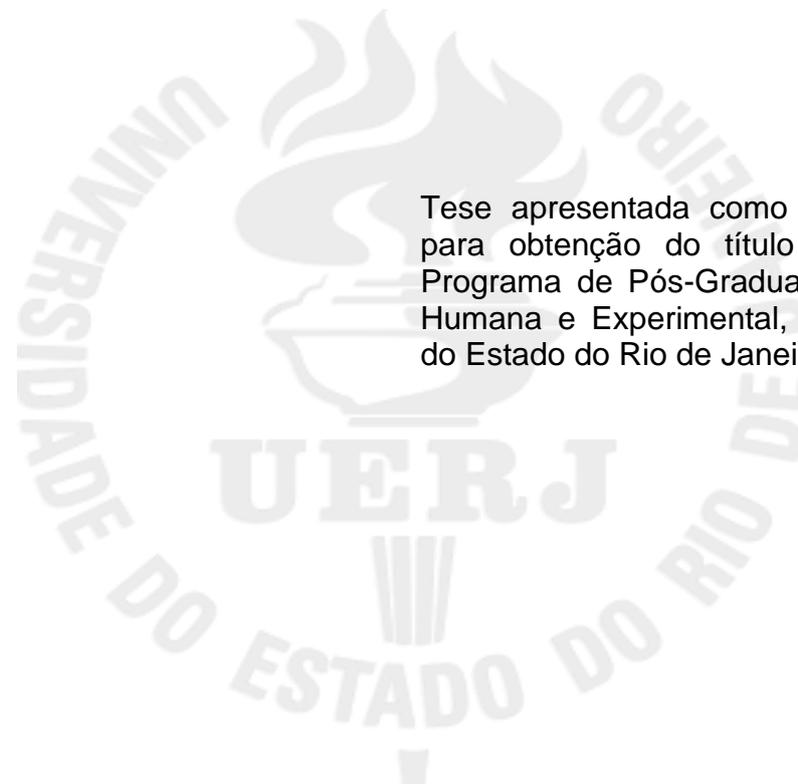
**Expressão de proteoglicanos e fatores inflamatórios no arco
aórtico e tecido peniano de camundongos ApoE (-/-) submetidos à
dieta *High-Fat***

Rio de Janeiro

2018

Jorge Luiz Medeiros Junior

Expressão de proteoglicanos e fatores inflamatórios no arco aórtico e tecido peniano de camundongos ApoE (-/-) submetidos à dieta *High-Fat*



Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

M488 Medeiros Junior, Jorge Luiz.
Expressão de proteoglicanos e fatores inflamatórios no arco aórtico e tecido peniano de camundongos ApoE (-/-) submetidos à dieta *High-Fat*. / Jorge Luiz Medeiros Junior. – 2018.
71 f.

Orientador: Luiz Eduardo Macedo Cardoso
Coorientador: Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Aterosclerose - Teses. 2. Aorta - Teses. 3. Pênis - Teses. 4. Apolipoproteínas E. 5. Proteoglicanas. I. Cardoso, Luiz Eduardo Macedo. II. Mandarim-de-Lacerda, Carlos Alberto. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.13-004.6

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Jorge Luiz Medeiros Junior

Expressão de proteoglicanos e fatores inflamatórios no arco aórtico e tecido peniano de camundongos ApoE (-/-) submetidos à dieta *High-Fat*

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 24 de agosto de 2018.

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Ana Luiza Bastos
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Glauber Monteiro Dias
Instituto Nacional de Cardiologia

Prof.^a Dra. Ângela de Castro Resende
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Daniel Arthur Barata Kasal
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmão e minha esposa Marcela.meus maiores exemplos e incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jorge Luiz Medeiros e Jorgeth Leite Medeiros, pelo amor, dedicação, noites de sonos perdidas e ensinamentos, estes guardo por toda vida: integridade, honestidade, respeito ao próximo, fazer o bem sem olhar à quem.

A minha esposa Marcela Menezes, minha companheira, obrigado por estar comigo sempre comigo, nos momentos felizes e nas adversidades. Sempre me apoiando, não me deixando desistir, com sua voz meiga e seu jeito carinhoso. Te amo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Eduardo Macedo, muito obrigado por ter aceitado minha orientação, acreditar em mim, por estender a mão quando muitos me viraram as costas, por todos os seus ensinamentos, sua preocupação com a pesquisa, aprendi muito com o senhor nesses 12 anos de convivência e vou ser eternamente grato.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda por ter permitido a realização deste projeto no LMMC, por todo o aporte financeiro, ensinamentos, discussão e apoio na realização deste projeto, por te me acolhido no seu laboratório como um dos seus alunos.

As Professoras Dr^a Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda e Dr^a Vanessa Souza-Mello, pelo aporte financeira para realização deste projeto.

Aos amigos Prof^o Diogo Benchimol, Prof^o Bruno Félix Patrício, Prof^a Bianca Gregório, Prof^o Waldemar Silva Costa, pessoas especiais, amigos de longa data, que me apoiaram muito para realização deste doutorado, que torciam a cada vitória ou notícia do andamento deste trabalho.

Em especial a Celina Borges, Aline Penna e Fabiane Ferreira Martins por toda ajuda no projeto, pela elaboração do artigo, por todas as palavras de incentivo e apoio. Serei eternamente grato.

As Professoras do LMMC, Prof^a Dr^a Sandra Barbosa e Isabele Bringhenti que sempre me apoiaram nessa longa caminhada, não me deixando desistir.

Ao amigos que o LMMC me deu Andre Vianna, Michele Soares (Mi), Thatiany Marinho (Thaty), Willian Lannes, Luana Camelo, Filipe Gabriel, Priscila Carapeto e Raquel, os dias de trabalho foram fáceis com vocês ao meu lado, vou sentir saudades da convivência harmoniosa e feliz. Nunca esquecerei vocês.

Aos demais amigos e professores do LMMC/BHex, Janayna Dias, Francielle Graus, Guilherme Sá, Tamiris Rachid, Carolina Chamma, Flávia Veiga, Helder

Gonçalves, Cristiane (Florzinha), Victor Motta, Thais Ceciliano, Gezileia Lau .
Obrigada pelo cuidado e atenção que sempre tiveram comigo.

Aos amigos da Anatomia Humana da Faculdade Medicina de Valença, Profº Mário Manoel Parreira Fortes e Profº Domênico Petrillo, pelo apoio em todos os momentos que precisei.

Aos secretários do BHEX, José Carlos, Carol e Isabel. Obrigada pela atenção e disposição em me ajudar todas as vezes que precisei.

Superar é preciso. Seguir em frente é essencial. Olhar pra
trás é perda de tempo.
Passado se fosse bom era presente.

Clarice Lispector

RESUMO

MEDEIROS JUNIOR, Jorge Luiz. **Expressão de proteoglicanos e fatores inflamatórios no arco aórtico e tecido peniano de camundongos ApoE (-/-) submetidos à dieta *High-Fat***. 71 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2018.

Estudos recentes sobre dados de saúde pública nos Estados Unidos mostrou que as taxas de mortalidade devido à doença coronariana têm declinado nas últimas décadas. Apesar desses dados, que refletem maior conhecimento populacional sobre a doença, globalmente o infarto do miocárdio ainda é uma das principais causas de morte. Os camundongos machos com três meses de idade foram divididos em quatro grupos de 16 animais cada um, como se segue: animais C57CL/B6 recebendo uma dieta controle (C) ou dieta *high-fat* (HF); E ApoE recebendo uma dieta controle (ApoE) ou uma dieta *high-fat* (ApoE-HF). Nos animais C57CL / B6 e ApoE, quando alimentados com uma dieta *high-fat*, houve aumento significativo de massa corporal (51,1%, $p < 0,001$ e 39,3%, $p < 0,001$, respectivamente) em comparação com os grupos que receberam uma dieta normal. Assim, em animais HF, houve aumento da expressão de biglycan, lumican, e syndecan-1 em relação ao grupo C. Deficiência de Apolipoproteína E (ApoE vs C) resultou em efeitos semelhantes sobre estes proteoglicanos, e também aumentou a expressão da fibromodulina, biglycan, decorin, syndecan e lumican. Quando comparado o ApoE vs ApoE-HF houve aumento significativo de decorin e uma redução significativa de biglycan e syndecan. Em relação aos fatores de crescimento houve aumento significativo na expressão gênica nos grupos HF e ApoE em relação ao grupo C, PDGFa, PDGFb, TGF β 2, TGF β 3. Em relação ao TGF β 1 o grupo ApoE obteve aumento significativo em relação ao grupo C e ApoE-HF. Na expressão VEGF o grupo ApoE-HF teve aumento significativo em relação ao grupo ApoE. A expressão de mRNA dos proteoglicanos biglycan, decorin, lumican, fibromodulin e syndecan-1 houve aumento significativo no grupo APOE (4x, 4x, 4x, 13x, 3x, respectivamente, todos $p < 0,001$) em comparação com grupo C. Em relação ao grupo APOE-HF houve aumento significativo nestes proteoglicanos (21% a 2x, todos $p < 0,05$) em comparação com grupo APOE. As expressões de PDGF-A e B no grupo APOE foram maiores significativamente (4x, $p < 0,001$) em comparação com grupo controle. A expressão de TGF- β 1 foi aumentada significativamente no grupo APOE vs C (4x, $p < 0,001$) e em APOE-HF vs APOE (64%, $p < 0,001$). Na aorta de camundongos ApoE (- / -) a expressão gênica de proteoglicanos e fatores de crescimento associados à aterosclerose se replicam em certos parâmetros nos eventos fisiopatológicos que ocorrem em humanos. No entanto, existem diferenças importantes que devem ser levada em conta quando se utiliza este tipo de modelo de aterosclerose. Em relação ao metabolismo de proteoglicano vascular, a semelhança com seres humanos pode ser evidenciada quando os animais são alimentados com dieta rica em lipídeos. Em relação ao pênis as condições que levam à aterosclerose na ApoE são acompanhadas por alterações no metabolismo dos proteoglicanos penianos. Embora existam algumas diferenças em relação ao que ocorre nas artérias humanas, essas alterações devem também favorecer a doença vascular e suas repercussões hemodinâmicas. Os resultados também mostram que a ApoE, especialmente sob uma dieta rica em gordura, é um modelo adequado para investigar a DE vasculogênica e suas associações com doença cardiovascular.

Palavras-chave: Aterosclerose. Aorta. Pênis. ApoE. Proteoglicanas. Fator de crescimento.

ABSTRACT

MEDEIROS JUNIOR, Jorge Luiz. **Expression of proteoglycans and inflammatory factors in the aortic arch and penile tissue in ApoE (- / -) mice submitted to the High-Fat diet.** 71 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2018.

Recent studies of public health data in the United States have shown that mortality rates due to coronary heart disease have declined in recent decades. Despite these data, which reflect greater population knowledge about the disease, globally, myocardial infarction is still one of the main causes of death. Three-month-old male mice were divided into four groups of 16 animals each, as follows: C57CL/B6 animals receiving a control diet (C) or high-fat diet (HF); And ApoE receiving a control diet (ApoE) or a high-fat diet (ApoE-HF). In the C57CL / B6 and ApoE animals, when fed a high-fat diet, there was a significant increase in body mass (51.1%, $p < 0.001$ and 39.3%, $p < 0.001$, respectively) compared to the groups that received a normal diet. Thus, in HF animals, there was an increase in the expression of biglycan, lumican, and syndecan-1 compared to group C. Apolipoprotein E (ApoE vs C) deficiency resulted in similar effects on these proteoglycans, and also increased the expression of fibromodulin, biglycan, decorin, syndecan and lumican. When comparing ApoE vs ApoE-HF there was a significant increase in decorin and a significant reduction in biglycan and syndecan. Regarding growth factors, there was a significant increase in gene expression in groups HF and ApoE compared to group C, PDGF α , PDGF β , TGF β 2, TGF β 3. In relation to TGF β 1 the ApoE group had a significant increase compared to the C group and ApoE-HF. In VEGF expression, the ApoE-HF group had a significant increase compared to the ApoE group. The mRNA expression of the proteoglycans biglycan, decorin, lumican, fibromodulin and syndecan-1 was significantly increased in the APOE group (4x, 4x, 4x, 13x, 3x, respectively, all $p < 0.001$) compared to the C group. APOE-HF group had significant increase in these proteoglycans (21% to 2x, all $p < 0.05$) compared to APOE group. PDGF-A and B expressions in the APOE group were significantly higher (4x, $p < 0.001$) compared to the control group. TGF- β 1 expression was significantly increased in the APOE vs C group (4x, $p < 0.001$) and in APOE-HF vs APOE (64%, $p < 0.001$). In the aorta of ApoE mice (- / -) the gene expression of proteoglycans and growth factors associated with atherosclerosis is replicated in certain parameters in the pathophysiological events that occur in humans. However, there are important differences that must be taken into account when using this type of atherosclerosis model. Regarding vascular proteoglycan metabolism, similarity to humans can be evidenced when animals are fed a lipid-rich diet. In relation to the penis, the conditions that lead to atherosclerosis in ApoE are accompanied by alterations in the metabolism of penile proteoglycans. Although there are some differences in relation to what occurs in human arteries, these changes should also favor vascular disease and its hemodynamic repercussions. The results also show that ApoE, especially under a high-fat diet, is a suitable model to investigate vasculogenic ED and its associations with cardiovascular disease.

Keywords: Atherosclerosis. Aorta. Penis. ApoE. Proteoglycan. Growth factor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hipótese da resposta à retenção	17
Figura 2 - Desenvolvimento placa aterosclerose	24
Figura 3 - Histologia arco aórtico camundongo	27
Figura 4 - Arco aórtico e Aorta torácica camundongo, sua relação <i>in situ</i>	28
Figura 5 - Arco aórtico e base do coração de camundongo dissecado	28
Figura 6 - Artéria aorta camundongo dissecada e corada com oil red.....	29
Figura 7 - Pênis do camundongo, vista anterior	32
Figura 8 - Pênis de rato, com o terço médio selecionado.....	36
Figura 9 - Resultado massa corporal	41
Figura 10 - Imagens Camundongos massa corporal.....	43
Figura 11 - Lesões ateroscleróticas	44
Figura 12 - Resultados da análise sérica	45
Figura 13 Resultados teste oral de tolerância a glicose e o gráfico de área sobre a curva.....	46
Figura 14 - Resultados da expressão dos diferentes proteoglicanos no arco aórtico.....	47
Figura 15 - Resultados da expressão dos fatores de crescimento no arco aórtico.....	48
Figura 16 - Resultados da expressão dos diferentes proteoglicanos no pênis.....	49
Figura 17 - Resultados marcadores de estresse oxidativo no pênis	50
Figura 18 - Resultados da expressão dos fatores de crescimento no pênis.....	51
Figura 19 - Resultados de perfil inflamatório no pênis	52
Figura 20 - Fotomicrografias de imunohistoquímica de alfa actina de músculo liso	53
Figura 21 - Resultados da testosterona livre sérica	54
Figura 22 - Resultados da expressão proteica de α actina, colágeno tipo I, colágeno tipo III e Elastina	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e Desvantagens dos modelos animais comuns para o desenvolvimento de aterosclerose.....	23
Tabela 2 - Composição da dieta padrão e dieta <i>high fat</i> , com base na formulação AIN - 93M para roedores de laboratório	35
Tabela 3 - Sequência Primers utilizados RT-PCR do arco aórtico	39
Tabela 4 - Sequência Primers utilizados RT-PCR do pênis	40
Tabela 5 - Resultados da morfometria do corpo cavernoso	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína kinase
AMPc	Adenosina 3',5'- monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de Variância
APOE	Apolipoproteína E
ApoE -/-	Nocauté Apolipoprotéina E
AR	Receptor de andrógeno
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina do soro bovino
CC	Corpo cavernoso
cDNA	DNA complementar
CS	Condroitin sulfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DE	Disfunção erétil
DEV	Disfunção erétil vasculogênica
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
GAG	Glicosaminoglicanas
GPX	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione redutase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IL-6	Interleucina-6
kDa	Kilodalton
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLR (-/-)	Nocauté ao Receptor da Lipoproteína de baixa densidade
MC	Massa corporal
MEC	Matriz Extracelular
MMPs	Metaloproteinase
NADPH - Nox 5	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato-5
NaCl	Cloreto de Sódio
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>

PDGFa	Fator de crescimento derivado de plaquetas subunidade A
PDGFb	Fator de crescimento derivado de plaquetas subunidade B
PDGFRs	Receptores de fator de crescimento derivado de plaquetas
RNA	Ácido ribonucléico
SOD	Superóxido Dismutase
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TGF β 1	Fator de transformação do crescimento beta isorfoma 1
TGF β 2	Fator de transformação do crescimento beta isorfoma 2
TGF β 3	Fator de transformação do crescimento beta isorfoma 3
u.a.	Unidades arbitrárias
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	33
1.1	Geral	33
1.2	Específico	33
2	MATERIAL E MÉTODO	34
2.1	Protocolo experimental	34
2.1.1	<u>Dietas</u>	34
2.1.2	<u>Arco aórtico</u>	35
2.1.3	<u>Pênis</u>	36
2.2	Procedimentos histológicos	36
2.3	Imunohistoquímica do músculo liso pênis	37
2.4	Morfometria corpo cavernoso	37
2.5	Análise dos lipídeos plasmáticos	37
2.6	Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)	38
2.7	Método Oil Red	38
2.8	RT-qPCR	38
2.9	Western blotting pênis	41
2.10	Análise estatística	42
3	RESULTADOS	43
3.1	Massa corporal	43
3.2	Placas aterosclerose	44
3.3	Lipídeos plasmáticos	45
3.4	Teste oral de tolerância à glicose	46
3.5	Expressão gênica proteoglicanos arteriais no arco aórtico	46
3.6	Expressão gênica de fatores de crescimento no arco aórtico	48
3.7	Expressão gênica proteoglicanos arteriais no pênis	49
3.8	Expressão gênica marcadores de estresse oxidativo no pênis	50
3.9	Expressão gênica fatores de crescimento no pênis	51
3.10	Expressão gênica do perfil inflamatório no pênis	52
3.11	Morfometria do corpo cavernoso (CC) peniano	52
3.12	Testosterona Livre	54

3.13	Western Blot	54
4	DISCUSSÃO	56
	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIA	63

INTRODUÇÃO

Aterosclerose

Estudos recentes sobre dados de saúde pública nos Estados Unidos mostrou que as taxas de mortalidade devido à doença coronariana têm declinado nas últimas décadas (Dalen *et al.*, 2014). Apesar desses dados, que refletem maior conhecimento populacional sobre a doença, globalmente o infarto do miocárdio ainda é uma das principais causas de morte (Hsu *et al.*, 2013; Yusuf *et al.*, 2014).

A aterosclerose é caracterizada pela deposição de lipídios por infiltração de células inflamatórias (por exemplo, células T e monócitos circulantes) e posterior formação da placa ateromatosa, que afeta principalmente a túnica íntima dos vasos sanguíneos (o revestimento mais interno dos vasos) (Nakhlband *et al.*, 2018). Como consequência ocorre um estreitamento luminal dos vasos sanguíneos causado pela formação de placa que reduz o fluxo sanguíneo para o coração, o cérebro ou os órgãos periféricos, levando à doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral ou doença vascular periférica (Hultgardh-Nilsson *et al.*, 2015).

Um fator crucial na aterogênese é também a disfunção endotelial, a qual precede a formação da placa de ateroma, e está associada com um aumento da permeabilidade para lipoproteínas e com a aderência e migração de células T e monócitos para o interior da túnica íntima (Matsuzawa e Lerman, 2014). Uma das principais características da doença é de fato a infiltração de LDL para o interior da túnica íntima da parede arterial (Sakakura *et al.*, 2013), o que provavelmente é facilitado pela disfunção endotelial (Matsuzawa e Lerman, 2014).

Durante décadas, houve um foco significativo no componente inflamatório de aterosclerose. As evidências indicam agora que a inflamação contribui consideravelmente para o início e progressão da aterosclerose, diversas observações histopatológicas e imunoquímicas sugerem que processos inflamatórios ativos podem desencadear a ruptura da placa e o risco de um evento atero-trombótico clinicamente significativo.

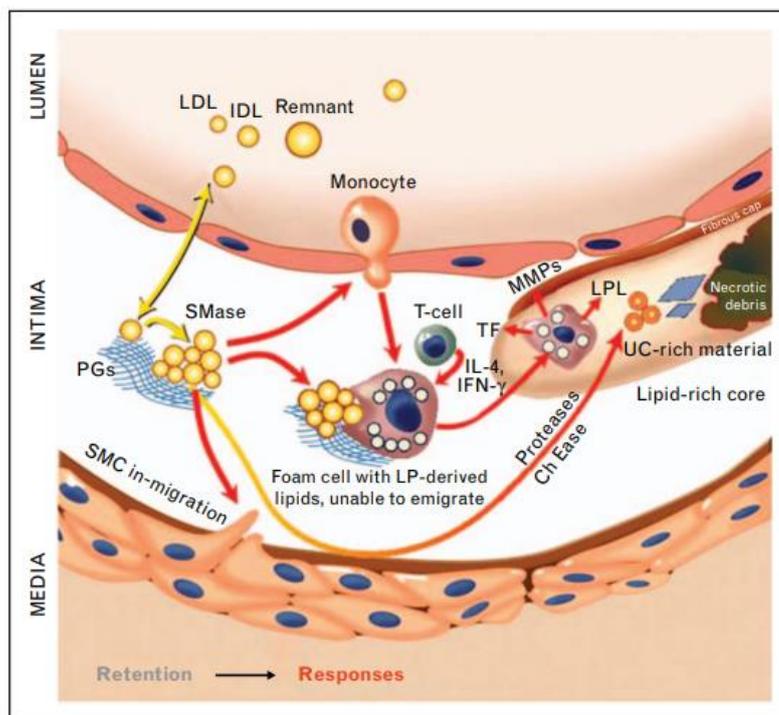
Os monócitos desempenham papéis centrais na aterogênese e são rapidamente atraídos para locais de fluxo alterados, caracterizados por inflamação de baixo grau. A diferenciação de monócitos em macrófagos está associada com a regulação positiva da atividade de fagocitose, levando ao acúmulo de lipídios e à formação de células de espuma típicas. Essas células expressam uma série de fatores, bem como metaloproteinases de matriz (MMPs) que são responsáveis pela

degradação da matriz, o que pode levar a instabilidade da placa (Taleb, 2016). A aterosclerose pode ser considerada um componente inflamatório crônico significativo. A inflamação também contribui para dislipidemia associada a elevações de VLDL, LDL e triglicérides, bem como redução de HDL (Escarcega *et al.*, 2018).

A molécula de LDL entra assim em contato com a túnica íntima arterial, que contém uma matriz extracelular (MEC) frouxa e enriquecida em pelo menos três tipos de proteoglicanos intersticiais. A aterosclerose tem fatores de risco bem conhecidos, os quais envolvem principalmente história familiar, hipertensão arterial, tabagismo, e níveis elevados de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade (LDL) (Rudolf e Lewandrowski, 2014).

A interação entre LDL e proteoglicanos promove modificação e agregação de LDL e captação por macrófagos, levando à formação de células espumosas. A conversão de macrófagos em células espumosas estimula a liberação de fatores potencialmente aterogênicos que alteram ainda mais o metabolismo dos proteoglicanos. As lipoproteínas retidas e alteradas, juntamente com os macrófagos vizinhos, estimulam a quimiotaxia e a transformação e proliferação das células musculares lisas, o que causa aumento na síntese de proteoglicanos. Um dos eventos iniciais na aterogênese é a retenção de LDL na túnica íntima por interações específicas com os proteoglicanos na parede das artérias. (Hultgardh-Nilsson *et al.*, 2015). Este evento dá início a uma reação inflamatória, e é conhecido como hipótese da resposta à retenção, como podemos observar na Figura 1 (Boren e Williams, 2016).

Figura 1 – Hipótese da resposta à retenção (Boren e Williams, 2016).



As membranas basais baseiam-se e suportam a função das células endoteliais e incorporam as células do músculo liso, sendo a fonte da maioria das células do músculo liso dentro das placas ateroscleróticas. As células musculares lisas recrutadas são capazes de produzir fibras do tecido conjuntivo, que pode tornar as placas mais estáveis ao cercar o núcleo inflamatório da placa com uma espessa camada de colágeno (Schwartz *et al.*, 2000).

Proteoglicanos e Glicosaminoglicanos

Os proteoglicanos são glicoconjugados complexos que contêm uma cadeia central proteica e pelo menos uma cadeia lateral de um polissacarídeo denominado glicosaminoglicano (GAG). Nesses polissacarídeos, a unidade monomérica é um dissacarídeo que contém uma hexosamina e, na maioria das vezes, um ácido hexurônico. Esse dissacarídeo em geral possui um grupamento carboxila e quantidades variáveis de grupamentos sulfato, os quais conferem assim aos GAG uma alta densidade de cargas aniônicas. Variações específicas nessas estruturas químicas definem os diferentes tipos de GAG, como hialuronan, condroitin sulfato, dermatan sulfato, e heparan sulfato. Os Proteoglicanos ocorrem em todos os tipos de matriz extracelular, e sua parte protêica contém, por sua vez, quantidades variáveis de domínios de adesão. Os proteoglicanos têm, dessa forma, grande capacidade de

interações específicas com o meio circundante, e suas funções fisiológicas são basicamente decorrentes dessa propriedade.

Em decorrência desse envolvimento de proteoglicanos e GAG com a biologia celular dos tecidos, alterações na expressão e estrutura dessas moléculas estão associadas a diversas disfunções e doenças (Bertassoni e Swain, 2014). Vários estudos têm mostrado que esses proteoglicanos da túnica íntima estão histologicamente associados com a lesão aterosclerótica em humanos (Gutierrez *et al.*, 1997; Fukuchi *et al.*, 2002; Nakashima *et al.*, 2007). Todos esses proteoglicanos possuem cadeias laterais de condroitin sulfato ou dermatan sulfato, as quais se ligam especificamente a LDL através de interações iônicas (Cardoso e Mourao, 1994).

A LDL que se infiltra pelo endotélio, como descrito acima, é assim retida na túnica íntima, o que facilita a subsequente oxidação da lipoproteína. Esses eventos então dão início a uma complexa reação inflamatória na parede arterial, a qual por sua vez leva à formação da placa de ateroma (Ross, 1999; Khalil *et al.*, 2004; Tabas *et al.*, 2007; Galkina e Ley, 2009; Fogelstrand e Boren, 2012). Fatores regulatórios secretados nessa reação inflamatória, tais como PDGF e TGF- β , não apenas aumentam a expressão de proteoglicanos na túnica íntima, mas também estimulam a alongação da cadeia de GAG. Essas cadeias, além disso, podem ter seus padrões modificados de sulfatação (Cardoso *et al.*, 2010). Vale notar que, *in vitro*, cadeias mais longas de GAG têm maior afinidade por LDL (Cardoso e Mourao, 1994). Portanto, a reação inflamatória aumenta a aterogenicidade da camada íntima.

Os glicosaminoglicanos estão associados ao lúmen arterial e contém principalmente sulfato de heparan, sulfato de condroitin e ácido hialurônico. O sulfato de heparano compreende 50 a 90% do total glicosaminoglicanos. Duas proteínas principais se ligam as cadeias de sulfato de heparano: syndecan-1 e glypican-1, estas duas proteínas possuem funções distintas. Por exemplo, o syndecan-1 pode transmitir um sinal para a célula para reconstruir o citoesqueleto, enquanto glypican-1 está envolvido na sinalização para ativar a síntese de óxido nítrico (Jarrold *et al.*, 1999; Leonova e Galzitskaya, 2015)

A hipótese da "resposta à retenção" da aterosclerose propõe que o principal passo inicial na aterogênese é a retenção subendotelial de lipoproteínas aterogênicas, como lipoproteína baixa densidade (LDL), por moléculas de matriz extracelular (MEC), particularmente proteoglicanos de sulfato de condroitina / sulfato de dermatano (Leonova e Galzitskaya, 2015).

As células arteriais produzem cinco tipos de proteoglicanos, que incluem superfície celular e os proteoglicanos sulfato de heparan de membrana basal, e três proteoglicanos intersticiais; versican, biglycan e decorin. Os Proteoglicanos e seus glicosaminoglicanos (GAGs) estão envolvidos em importantes funções arteriais, tais como permeabilidade, suporte estrutural, regulação do equilíbrio de fluidos e eletrólitos, coagulação sanguínea, agregação plaquetária, calcificação e metabolismo lipídico (Jarrold *et al.*, 1999).

Os proteoglicanos possuem um papel importante na fibrilogênese do colágeno e na organização e estrutura da matriz extracelular. Como tal, mudanças nos proteoglicanos podem afetar a composição, estabilidade e a elasticidade da matriz extracelular (Tannock, 2014).

Estudos recentes têm descrito papel importante para os proteoglicanos solúveis, participando na regulação dos processos inflamatórios, como por exemplo biglycan, principalmente em sua forma solúvel, que é liberada na matriz extracelular durante a lesão tecidual. Este tipo tem sido observado interagindo com diversas moléculas, incluindo proteínas morfogênicas (BMP) -2,4,6, TGF- β , TNF- α , VEGF (Jarrold *et al.*, 1999; Tannock, 2014).

Os GAGs formam ligações covalentes a tipos específicos de proteínas nucleares que se acumulam nas lesões vasculares. Estas moléculas incluem versican, biglycan e decorin, lumican, fibromodulina e perlecan, embora outros tipos de proteoglicanos estejam presentes, mas em quantidades menores.

O Condroitin Sulfato (CS) é um glicosaminoglicano predominantemente encontrado na matriz extracelular em torno da cartilagem, ligamentos, tendões, vasos sanguíneos e pele (Martinez-Calatrava *et al.*, 2010). O CS é uma classe de GAGs sulfatados que são polissacarídeos lineares e consistem em repetição de unidades dissacarídicas compostas de ácido urônico e N-acetil-hexosamina. Por causa de sua unidade dissacarídeo característica $[(-4\text{GlcA}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta 1-)]_n$, onde GlcA e GalNAc representam ácido glucurônico e N-acetilgalactosamina, respectivamente, CS podem ser classificados como galactosaminoglicano (Mikami e Kitagawa, 2013).

Estudos demonstram que algumas proteoglicanas compostas por condroitin sulfato têm sido implicados não apenas em diversos eventos fisiológicos como citocinese, morfogênese e plasticidade neuronal, mas também em processos patológicos, incluindo desordens esqueléticas, formação de cicatriz glial após lesão cerebral e infecções por vírus e bactérias (Little *et al.*, 2008; Mikami e Kitagawa, 2013).

Sindecan

Os Sindecans são proteoglicanos de sulfato de heparan transmembrana envolvidos na regulação do crescimento celular, diferenciação, adesão, desenvolvimento neuronal e metabolismo lipídico (Os sindecans são expressos de uma maneira específica do tecido para facilitar diversos processos celulares). Existem 4 tipos de sindecana, atuando na maioria dos tipos celulares. O sindecana-1 possui papel importante no metabolismo lipídico, cicatrização de feridas, regulação na migração de leucócitos e reorganização do citoesqueleto endotelial, atuando contra o estresse causado pela tensão de cisalhamento evitando assim o desenvolvimento de aterosclerose, em contrapartida o aumento da expressão deste tipo de sindecana influencia a migração de macrófagos, facilitando a formação de placas ateroscleróticas. (Leonova e Galzitskaya, 2015).

Decorin

O decorin é o membro mais bem caracterizado da família de proteoglicanos extracelulares pequenos e ricos em leucina, presente nos tecidos conjuntivos, tipicamente em associação as fibrilas de colágeno e frequentemente é observado a sua interação com moléculas de LDL e poderia contribuir para formação de placas de aterosclerose (Jarrold *et al.*, 1999; Jarvinen e Prince, 2015). Em mamíferos o decorin contém uma porção central de proteína monomérica de 42 kDa e uma única cadeia de GAG de condroitina / sulfato de dermatan, ligada a um resíduo de serina próximo do terminal N. (Gutierrez *et al.*, 1997; Jarrold *et al.*, 1999; Jarvinen e Prince, 2015).

Biglican

O biglican é um membro da classe I de pequenos proteoglicanos ricos em leucina sendo amplamente expresso, consistindo de um núcleo de proteína de 42 kDa e uma ou duas cadeias de glicosaminoglicano (GAG) ligado covalentemente no seu terminal N (Thompson *et al.*, 2014; Thompson *et al.*, 2018)

Em lesões ou em estresse tecidual o biglican, é clivado através de enzima de enzimas proteolíticas, se transformando em uma forma livre de biglican, que participa de inúmeros eventos inflamatórios crônicos em diversas patologias, como falência renal aguda, lúpus, nefrites e nefropatias diabéticas (Roedig *et al.*, 2018)

O biglican possui um papel importante no desenvolvimento aterosclerose, porém, sua real ação ainda é controversa e recentemente estudos tem demonstrado que sua hiperexpressão aumentou as placas de aterosclerose, mas sua diminuição não teve um papel protetor (Thompson *et al.*, 2018).

Versican

O versican é um proteoglicano de condroitin sulfato que está presente na MEC dos vasos sanguíneos normais e aumenta drasticamente em todas as formas de doenças vasculares (Wight e Merrilees, 2004).

O gene e a proteína versican seguem um modelo de domínio. O domínio globular amino-terminal (G1) liga-se ao hialuronan, e o domínio globular carboxi-terminal (G3) se assemelha a família selectina das proteínas, constituída por uma lectina do tipo C adjacente a dois fatores de crescimento epidérmico (EGF) e uma região reguladora do complemento (Wight e Merrilees, 2004). O versican é uma grande Proteoglicana de CS contendo uma proteína do núcleo de cerca de 260 kDa com 15-20 cadeias CS ligados (Wight, 2018). Esta proteoglicana está principalmente associado as células musculares lisas arteriais. Caso ocorra lesões vasculares, os lipídios e macrófagos se acumulam juntamente com este proteoglicano nas bordas do núcleo necrótico em placas mais avançadas (Mikami e Kitagawa, 2013).

Fibromodulina

A fibromodulina é uma proteína citosólica caracterizada por um núcleo de proteína substituído covalentemente por cadeias de glicosaminoglicano. A fibromodulina é um pequeno proteoglicano rico em leucina de 59 kDa expresso principalmente em cartilagem, esclera e tecidos expostos a tensão de tração, como tendões, com isso tem sido relatada como sendo mais alta nos tecidos conjuntivos, onde desempenha um papel central na organização da fibrila de colágeno (Shami *et al.*, 2013; Jan *et al.*, 2016). Ele regula a formação de fibrilas de colágeno por ligação ao colágeno tipo I, 16 e, assim, influencia a formação do arcabouço de colágeno 17 por um mecanismo molecular ainda desconhecido (Shami *et al.*, 2013), entretanto a fibromodulina facilita a arquitetura dos componentes de matriz, que por sua vez afeta “turnover” celular e a composição da matriz e ajuda a evitar a colagenólise.

Lumican

O lumican, um proteoglicano pequeno, rico em leucina, de classe II, desempenha um papel importante na organização da MEC e é um importante modulador de funções incluindo inflamação associada ao tumor (Yang, C. T. *et al.*, 2018).

Na sua composição é o proteoglicano mais heterogêneo entre o tipos de glicosaminoglicano (GAG), com uma massa de 4000-19.000 kDa. Numerosas formas de lumican com cadeias de polilactosamina foram descritas em vários tecidos, além da córnea. Em vários tecidos, lumican pode existir na forma glicoproteica, substituída por oligossacarídeos curtos ou cadeias de polilactosamina pouco sulfatadas / não sulfatadas em vez de keratan sulfato, o lumican é encontrado como uma glicoproteína com um peso molecular variando de 40 a 175 kDa (Karamanou *et al.*, 2018).

1.3 Modelos animais para aterosclerose

Para o entendimento mais detalhado sobre a fisiopatologia da aterosclerose, e principalmente para investigações sobre o envolvimento de fatores nutricionais e farmacológicos nessa doença, são utilizados diversos modelos animais (Getz e Reardon, 2012). A escolha do modelo animal para os estudos em aterosclerose é bem diversificada, porém cada modelo possui limitações, como podemos observar na tabela 1.

Tabela 1 – Vantagens e Desvantagens dos modelos animais comuns para o desenvolvimento de aterosclerose.

ANIMAIS	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Camundongo e Rato	Baixo custo Fácil de manusear e manter. Reprodução gerível	Tipicamente resistente à aterogênese A maior parte colesterol é transportada através de Partículas HDL O pequeno tamanho dos animais limita o sangue e restringe dissecação de pequenas artérias Metabolismo lipídico diferente do humano.
Camundongos ApoE -/-	Facil de manipulação Reprodução gerível Linhagem estabelecida desenvolvimento de aterosclerose. Aumento de complexidade na lesão aterosclerótica com dieta <i>high-fat</i> .	Desenvolvimento incompleto da placa.
Coelho	Baixo custo. Fácil de manusear e manter. Sensível à indução de colesterol diabétes oe aterosclerose. Suficientemente grande para permitir experimentos fisiológicos.	Lesões restritas quando comparados com humanos Deficiência de lipase hepática, causando hepatotoxicidade quando administrada dieta <i>high-fat</i> .
Porco	Anatomicamente e fisiologicamente semelhante ao Humano (sistema cardiovascular). Suscetível à aterosclerose espontânea e Padrões comparáveis de distribuição de placas	Aumento de tamanho, dificultando o manipulação e manuseio. Alto custo de manutenção.
Cão	Fácil manipulação. Tamanho ideal.	Resistência aterogênica.
Primatas não humanos	Semelhança em dieta e genética	Baixa disponibilidade Tempo de vida longo (resultando em experimentos complexos) Hospedeiro de perigosas zoonoses virais

Legenda: Adaptada das tabela 1.

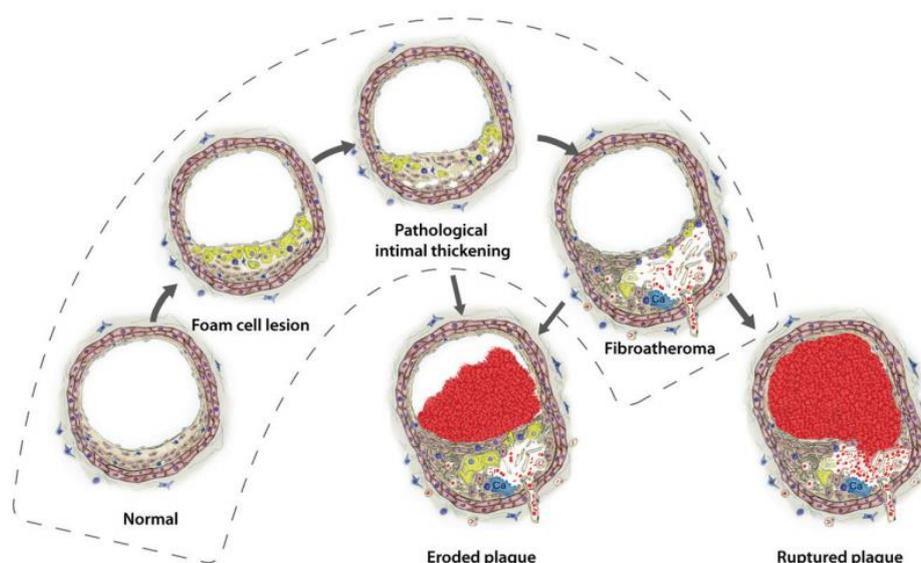
Fonte: Leong *et al.*, 2015 e Getz e Reardon, 2006

As Cepas de camundongos têm se revelado bastante adequadas como modelos para aterosclerose, principalmente em animais knockout para proteínas envolvidas na fisiopatologia da doença. A cepa C57BL/6 (*wild type*), que é geralmente usada como base para os knockouts, é normalmente resistente para aterosclerose,

só desenvolvendo lesões de estágio inicial, mesmo com hipercolesterolemia induzida. Por outro lado, os animais ApoE(-/-) e o LDLR(-/-) desenvolvem lesões expressivas, por vezes mesmo com dieta padrão.

O ApoE(-/-) é o modelo de aterosclerose em camundongo mais usado (Getz, 2008; Getz e Reardon, 2012), desenvolvendo lesões complexas e em várias artérias, mesmo com dieta padrão, porém estes tipos de lesões não chegam ao estágio de ruptura como observado na espécie humana, como podemos observa . Com dieta high-fat, as lesões são complexas e de vários estágios, mais ricas em lipídeos, e com células espumosas e capa fibrosa, além de se desenvolverem mais rapidamente (Getz e Reardon, 2006). Já a cepa LDLR(-/-) apresenta, com dieta padrão, lesões menos severas, necessitando assim de dieta high-fat para desenvolver aterosclerose mais complexa (Getz e Reardon, 2006).

Figura 2 – Desenvolvimento placa aterosclerose.



Legenda: linha tracejada indica os tipos lesões que podem ocorrer em modelos animais, particularmente camundongo.

Fonte: Shim *et al.*, 2016

Todos os modelos animais possuem suas limitações, contudo a sua utilidade é inegável para estudos de mecanismos moleculares específicos, e os camundongos propensos ao desenvolvimento de aterosclerose diferem dos humanos com doença arterial, o que restringe as investigações como descrito acima (Pasterkamp *et al.*, 2017). Apesar das limitações do modelo animal vista acima, os camundongos são

modelos de aterosclerose eficientes, relativamente baratos e, devido ao seu curto tempo de geração, podem ser facilmente criados em conjunto com outras cepas de superexpressão ou deficientes em genes de interesse. Além disso, o uso de anticorpos e drogas experimentais é acessível devido ao pequeno tamanho corporal. (Shim *et al.*, 2016)

Proteoglicanos arteriais em modelos de aterosclerose em camundongos

Os diversos dados discutidos evidenciam o papel crucial dos proteoglicanos arteriais na fisiopatologia da aterosclerose. Além disso, resultados de imunohistoquímica em humanos, tanto em artérias normais quanto em lesões ateroscleróticas avançadas, mostram que a localização específica dos diferentes tipos de proteoglicanos, assim como de fatores envolvidos na doença, como fatores de crescimento, também são importantes para o entendimento da aterogênese (Gutierrez *et al.*, 1997; Evanko *et al.*, 1998). No entanto, o modelo em camundongo ApoE não chega a desenvolver lesões com rupturas de placas, por exemplo, com isso, as análises estruturais sofrem limitações, não possibilitando estudos de localização dos diferentes proteoglicanos. Com isso, o foco das análises desenvolvidas será voltada para a expressão gênica dos diferentes proteoglicano arteriais.

Na cepa C57BL/6 (wild type) não há marcação para versican na parede arterial, mas esse proteoglicano é expresso em camundongos LDLR(-/-) (Seidelmann *et al.*, 2008). Um outro estudo mostrou a presença de biglican and perlecan nessa mesma cepa knockout (Tang *et al.*, 2013). Entretanto, outros autores mostraram, tanto em camundongos LDLR(-/-) quanto ApoE(-/-), que biglycan e perlecan se localizam na lesão aterosclerótica, enquanto versican estaria ausente (Kunjathoor *et al.*, 2002). Deve-se salientar que nesse último estudo não foram avaliados aspectos do metabolismo de proteoglicanos que são relevantes na aterosclerose em humanos, tais como:

- Os animais foram alimentados apenas com dieta standard, o que não induz o desenvolvimento de lesões mais complexas;
- A expressão gênica dos proteoglicanos e glicosaminoglicanos no mesmo experimento.
- Não foram feitas a marcações de fatores de crescimento associados ao metabolismo de proteoglicanos na aterogênese.
-

Morfologia dos Vasos Sanguíneos de Camundongos

Os vasos sanguíneos na sua maioria possuem características estruturais comuns. Entretanto conforme o tamanho do vaso sanguíneo, as arteriais por exemplo podem ser divididas, de acordo com o calibre de forma crescente, em arteríolas, artérias de médio calibre ou artéria musculares e artérias de grande calibre ou artérias elásticas. Os vasos sanguíneos são normalmente compostos das seguintes camadas ou túnicas: túnica íntima, túnica média e túnica adventícia, que variam seus componentes estruturais dependendo do calibre.

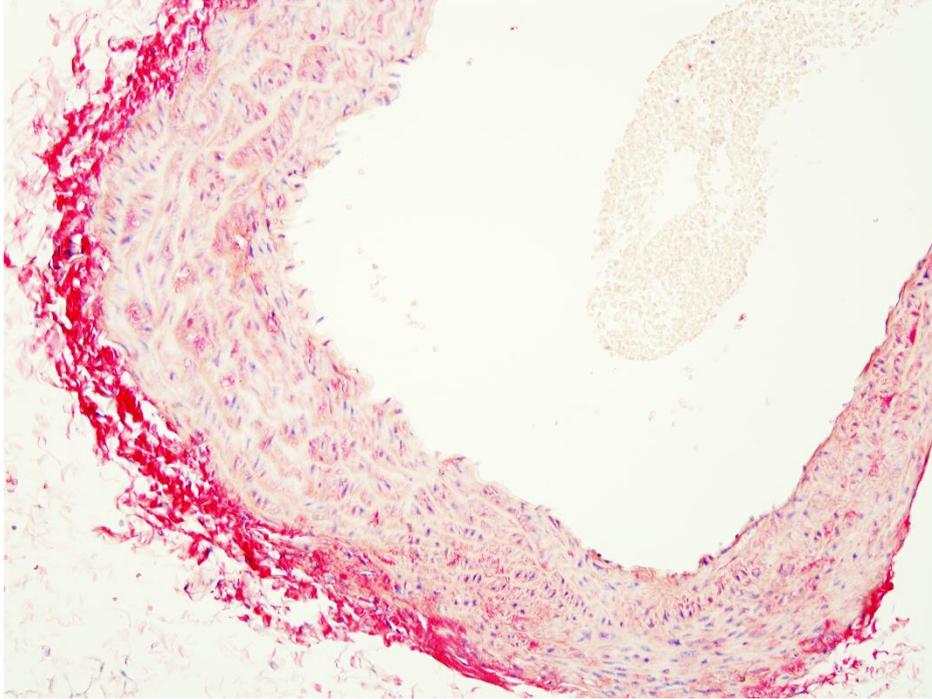
A túnica íntima apresenta uma camada de células endoteliais apoiada na limitante elástica interna, sendo assim diferente do encontrado em humanos, por não possuírem uma camada subendotelial formada por tecido conjuntivo frouxo (Sims, 1989). Nas artérias, a túnica íntima está separada da túnica média por lâmina elástica interna, denominada limitante elástica interna. Esta lâmina, composta principalmente de elastina, contém aberturas (fenestras) que possibilitam a difusão de substâncias para nutrir células situadas mais profundamente na parede do vaso.

A túnica média consiste principalmente de camadas concêntricas de células musculares lisas interpostas com quantidades variáveis de matriz extracelular fibrosa (fibras do sistema elástico, colágeno do tipo III) e substância amorfa (proteoglicanos e glicoproteínas).

A matriz extracelular fibrosa dos vasos formada de colágenos dos tipos I e III são principais tipos de colágeno encontrados nos tecidos arteriais. Colágeno do tipo I é predominantemente localizado na adventícia arterial, enquanto colágeno tipo III é o principal tipo de colágeno na túnica média. Os tipos de colágeno I e III desempenham importante papel na fisiologia arterial, prevenindo expansão arterial além dos limites fisiológicos (Jarrold *et al.*, 1999).

Os Vasos de maior calibre, normalmente contêm vasa vasorum (vasos dos vasos) que são arteríolas, capilares e vênulas que se ramificam profusamente na adventícia e, em menor quantidade, na porção externa da média, porém, nos camundongos esses vasos estão ausentes conforme descrito por (Heistad e Marcus, 1979).

Figura 3 - Histologia do arco aórtico de camundongos.



Legenda: Picro sirius red. 200x

Anatomia da Aorta de Camundongos

A aorta origina-se do ventrículo esquerdo através do anel fibroso e imediatamente se amplia para o bulbo aórtico e irradia a artéria coronária esquerda e direita. Como a aorta ascendentes sobe craniodorsalmente do lado direito do tronco pulmonar, seguindo seu trajeto craniodorsal e em forma convexa forma a arco aórtico, logo na sua emergência cardíaca, sua continuação em direção caudal, em posição dorsal, paralela aos corpos vertebrais da coluna vertebral, sendo chamada de aorta torácica; assim continua seu trajeto até atravessar o diafragma através do hiato aórtico, passando então, a ser denominada de aorta abdominal. Esta, ainda paralela aos corpos vertebrais, segue caudalmente emitindo em seu percurso, diversos ramos às vísceras abdominais; na altura da quarta, quinta ou sexta vértebra lombar, esta se divide em artérias ilíacas (Schummer, 1981).

Figura 4 - Arco aórtico e Aorta torácica camundongo, sua relação *in situ*.



Legenda: Dissecção arco aórtico e aorta torácica de camundongo, sua relação *in situ*.

Figura 5 - Arco aórtico e base do coração de camundongo dissecado.



Legenda: Dissecção arco aórtico e base do coração.

Figura 6 - Artéria aorta camundongo dissecada e corada com oil red



Legenda: Dissecção de artéria aorta completa corada com oil red.

Disfunção Erétil e Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença sistêmica na qual a placa se acumula no interior das artérias que podem levar a sérios problemas relacionados à qualidade de vida, dentre eles, em homens podemos citar a disfunção erétil, sendo definida como a incapacidade de alcançar e / ou manter ereção peniana para uma relação sexual satisfatória (Baumann *et al.*, 2017; Durmus *et al.*, 2017). A disfunção erétil (DE) é uma doença multicausal associada ao envelhecimento, tabagismo e diversas condições patogênicas, como hipertensão, hipercolesterolemia e hiperglicemia (Fraga-Silva *et al.*, 2014).

O mecanismo subjacente mais comum da DE é vascular, sendo a vasculogênica um indicador de disfunção endotelial e um preditor de hiperlipidemia, um importante fator de risco para aterosclerose, é frequentemente observada em pacientes com DE. O aumento do tônus e / ou contratilidade do músculo liso dentro do corpo cavernoso e artérias penianas é o principal mecanismo responsável para DE (Fraga-Silva *et al.*, 2014; Durmus *et al.*, 2017).

Na hiperlipidemia, a lipoproteína de baixa densidade oxidada elevada causa disfunção endotelial, através da geração de radicais livres que prejudicam a expressão genica do óxido nítrico sintase, que facilitaria o aumento do tônus, podendo ter como consequência a DE (Baumann *et al.*, 2017; Durmus *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017). Os Sintomas do trato urinário inferior, DE e início tardio hipogonadismo são altamente prevalentes em homens idosos e estão significativamente associados com uma qualidade de vida reduzida.

Nas pesquisas experimentais em aterosclerose, o camundongo knockout ApoE é amplamente utilizado, uma vez que desenvolve lesões arteriais semelhantes às dos seres humanos. Ele também é usado em investigações sobre ED vasculogênico (Xie *et al.*, 2007), mas não há informações sobre proteoglicanos em seus tecidos eréteis.

Estresse Oxidativo e Disfunção Erétil

Os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio são gerados pelo metabolismo do oxigênio, que é balanceado pela taxa de formação de oxidantes e pela taxa de eliminação do oxidante. O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio e os sistemas de defesa antioxidante (Sinha e Dabla, 2015).

Exposição ao álcool, medicamentos, trauma, infecções, dieta de baixo valor nutricional, toxinas, radiação, hipertensão arterial ou atividade física extenuante podem levar a um aumento no estresse oxidativo que pode por sua vez induz DE. Espécies reativas, como o ânion superóxido, podem interagir com NO para formar peroxinitrito e, assim, diminuir a biodisponibilidade do NO. Além disso, os radicais peroxinitrito e superóxido pode aumentar a incidência de apoptose no endotélio do músculo cavernoso, levando assim ao dano do endotélio e redução do nível de NO (Adefegha *et al.*, 2018).

O mecanismo fisiopatológico da disfunção endotélio é multifatorial e muitas vezes caracterizada pela biodisponibilidade degradada do óxido nítrico, diminuiu

vasodilatação e o agravamento da inflamação, precedido por lesões ateroscleróticas. A produção de óxido Nítrico desempenha um papel fisiológico no processo de ereção. O óxido nítrico é considerado o mais importante fator para o relaxamento dos corpos cavernosos (CC) e os vasos penianos necessários para a responsável pela ereção (Bozkurt *et al.*, 2018), 2018).

A ereção é essencialmente um evento neurovascular que requer endotélio intacto e funcional e músculo liso no CC. Sabe-se que a aterosclerose é um processo inflamatório envolvendo um número de citocinas pró-inflamatórias, representando um aumento estado de estresse oxidativo (Zhang *et al.*, 2017; Bozkurt *et al.*, 2018).

Citocinas pró-inflamatória

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDa. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteinoquinas ativadas por mitógenos. Diferentemente dos hormônios clássicos, as citocinas não são armazenadas como moléculas preformadas e atuam especialmente por mecanismos parácrino (em células vizinhas) e autócrino (nas próprias células produtoras)(Oliveira *et al.*, 2011).

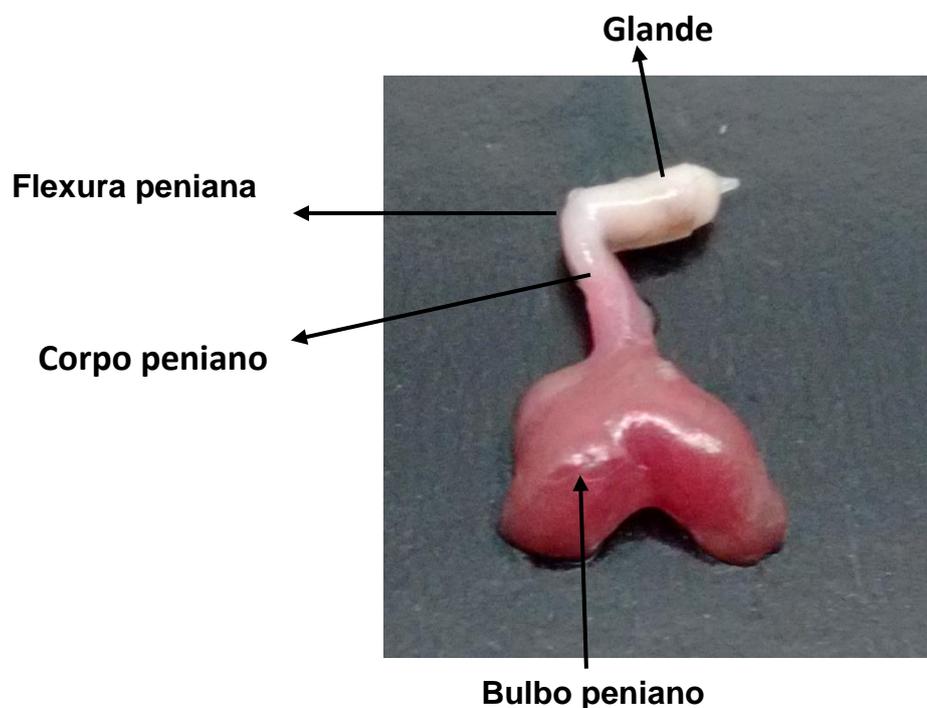
A Interleucina-6 (IL-6), uma citocina pró-inflamatória, que é produzida de vários tecidos, incluindo os macrófagos ativados e o músculo liso e células endoteliais, também pode promover a secreção de outras citocinas e, entre outras, estimula quimiotaxia de monócitos e macrófagos para promover a aterogênese (Zhang *et al.*, 2018).

Anatomia e histologia do pênis

O pênis do camundongo é composto por corpos cilíndricos de estrutura erétil: um par de corpos cavernosos, unidos entre si e situados dorsalmente ao corpo esponjoso, situado ventralmente, além de fâscias, nervos e vasos, todos recobertos pela pele. A maior parte do pênis é formada pelos corpos cavernosos, os quais se originam na sínfise púbica correndo lado a lado. Ventralmente aos corpos cavernosos localiza-se o corpo esponjoso, que abriga no seu interior a uretra e possui duas dilatações: uma proximal, o bulbo esponjoso e outra distal, a glândula do pênis. Estas estruturas são envolvidas por uma camada de tecido fibroso, a túnica albugínea, que varia em espessura tornando-se mais delgada ao envolver o corpo esponjoso

Próximo ao seu terço distal, a haste peniana apresenta uma flexura em ângulo reto. Apresenta pouco tecido erétil e um processo ósseo localizado mais distalmente.

Figura 7 – Pênis do camundongo, vista anterior.



Legenda: Dissecção pênis de camundongo evidenciando suas porções em vista anterior .

Os corpos cavernosos são formados por uma camada de células musculares lisas localizadas na região subendotelial que circunda os espaços vasculares (sinusóides), situados entre as trabéculas. São encontrados feixes longitudinais e transversais. As fibras musculares lisas dos corpos cavernosos são os elementos que se encontram em menor número entre os componentes do corpo cavernoso do pênis (Pinheiro *et al.*, 2000) .

As fibras colágenas são os constituintes mais numerosos das trabéculas dos corpos cavernosos. Estão dispostas compactamente e entremeadas com prolongamentos citoplasmáticos de fibroblastos. As fibras do sistema elástico encontram-se presentes nos corpos cavernosos como uma malha frouxa e ramificada. Na periferia do corpo cavernoso as fibras são mais espessas formando um eixo paralelo ao longo do pênis.

1. OBJETIVOS

1.1 Gerais

Avaliar a adequação do modelo de aterosclerose em camundongos ApoE(-/-) no que se refere à expressão protéica e metabolismo de proteoglicanos no arco aórtico e no pênis.

1.2 Específicos

Determinar em animais ApoE(-/-) com e sem dieta high-fat:

- A expressão gênica de diferentes proteoglicanos (versican, decorin, biglycan, lumican, sindecan 1, fibromodulin,) no pênis e na parede arterial normal e na lesão aterosclerótica usando método RT- PCR.
- A expressão gênica de diferentes fatores de crescimento como PDGF e TGF-beta que possuem associações específicas com proteoglicanos.no pênis e na parede arterial normal e na lesão aterosclerótica
- Avaliar estrutural do músculo liso do corpo cavernoso do pênis com e sem lesão aterosclerótica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Protocolo experimental

Os camundongos knockout da Apolipoproteína-E (ApoE) foram adquiridos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil, e os camundongos C57CL / B6 foram adquiridos da Faculdade de Medicina, Universidade São Paulo (USP), São Paulo, Brasil. Ambas as cepas derivam de colônias mantidas no Laboratório Jackson (Bar Harbor, ME, EUA).

Os camundongos machos com três meses de idade foram divididos em quatro grupos de 16 animais cada um, como se segue:

- **Grupo C** - animais C57CL/B6 recebendo uma dieta controle.
- **Grupo HF** - animais C57CL/B6 recebendo uma dieta *high-fat* (HF).
- **Grupo ApoE** - Animais knockout da Apolipoproteína-E recebendo dieta controle.
- **Grupo ApoE-HF**. Animais knockout da Apolipoproteína-E recebendo dieta *high-fat*.

2.1.1 Dietas

Todas as dietas foram preparadas sob encomenda e confeccionadas pela PragSoluções (Jaú, São Paulo, Brasil). A dieta controle segue as recomendações macro e micronutrientes para roedores de laboratório, conforme descrito pelo Instituto Americano de Nutrição (AIN-93M)(Reeves *et al.*, 1993). A dieta *high-fat* foi baseada na dieta controle, mas continha 40% de banha de porco e 10% de óleo de soja como energia (Tabela 1). Os animais tiveram livre acesso a água e alimentos, e mantidos a uma temperatura controlada (21 ± 2 ° C) com um ciclo claro-escuro de 12h. A dieta foi administrada por quatro meses, e após jejum durante 6 horas, todos os animais foram sacrificados com sobredose de tiopental sódico.

Tabela 2 - Composição da dieta padrão e dieta *high fat*.

Nutrientes (g/Kg)	C	HF
Caseína	140	175
Amido de Milho	619.7	347.7
Sacarose	100	100
Óleo de Soja	40	40
Banha de Porco	–	238
Fibras	50	50
L-Cystine	1.8	1.8
Choline	2.5	2.5
Antioxidante	1.0	1.0
Mix mineral	35	35
Mix Vitamina	10	10
Total massa (g)	1000	1000
Carboidratos (% Energia)	76	36
Proteínas (% Energia)	14	14
Lipídeos (% Energia)	10	50
Total Energia (kJ/Kg)	15 960.0	21 000.0

Legenda: Composição da dieta padrão e dieta *high fat*, com base a formulação AIN-93M para roedores de laboratório.

Imediatamente após o sacrifício, o sangue foi colhido através de punção cardíaca e o plasma foi separado por centrifugação (120 xg durante 15 minutos à temperatura ambiente) e armazenado a -80 ° C para análises bioquímicas posteriores. O arco aórtico e pênis foram dissecados e processado da seguinte forma:

2.1.2 Arco aórtico:

Os animais foram distribuídos aleatoriamente para os seguintes procedimentos:

I - O arco retirado e armazenado a -80 ° C para análise quantitativa em tempo real de PCR (RT-qPCR); (n=7)

II - O arco foi retirado e fixado em formalina tamponada a 4% para histoquímica; (n=3)

III - Enquanto ainda fresco, foi transferido para PBS a 4 ° C e depois submetido ao procedimento oil red (n=4)..

2.1.3 Pênis

O pênis dos camundongos dos diferentes grupos, foi dissecado e o seu terço médio clivado. Para as análises de RT-qPCR e Western Blotting foram utilizados, os mesmos animais sendo seu terço médio clivado e congelado separadamente:

I - O terço médio do penis foi clivado e armazenado a -80°C para análise quantitativa em tempo real de PCR (RT-qPCR); (n=8)

II - O terço médio do penis foi clivado e armazenado a -80°C para análise quantitativa em western blotting (n=8)

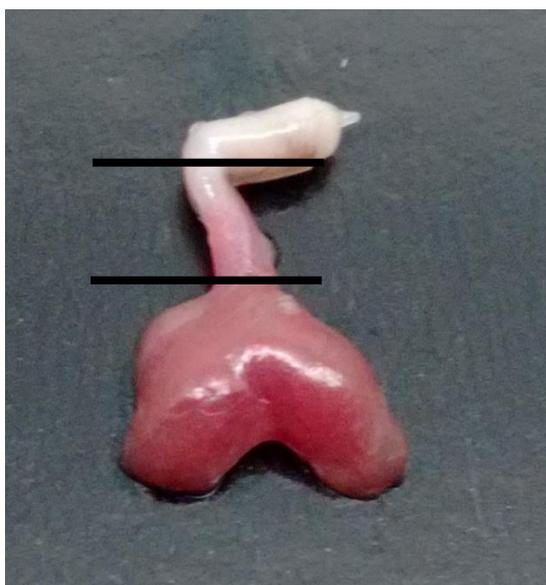
III - O terço médio do pênis foi retirado e fixado em formalina tamponada a 4% e seguida processado utilizando procedimentos histológicos de rotina (n=8)

Como os diferentes métodos tinham diferentes sensibilidades e exigências de massa tecidual, o número real de amostras variou de acordo com a experimento e é adequadamente indicado juntamente com os resultados.

2.2 Procedimentos histológicos

Para a análise histológica foram utilizados cortes transversais no terço médio do corpo do pênis e arco aórtico. As amostras foram lavadas em solução salina (0,9% NaCl) e fixadas por imersão em formalina 4% em tampão fosfato salino (PBS) por um período mínimo de 24 horas.

Figura 8 – Pênis de rato, com o terço médio selecionado entre as barras negras.



Legenda: Dissecção pênis de camundongo, terço médio selecionado.

O material foi submetido às técnicas histológicas de rotina: desidratado em álcool e clarificado em xilol para posterior inclusão em parafina. Foram feitos cortes histológicos com 5 µm espessura e corados pela Hematoxilina & Eosina para verificar a integridade dos tecidos e picro sirius red (Sirius Red F3B, Sigma, St. Louis, MO, EUA, catálogo N ° D0303) para avaliação das fibras colágenas no arco aórtico a fim de verificar as placas fibrosas de colágeno em torno da placa ateroscleróticas. As fotomicrografias foram capturadas no microscópio Olympus BX51 acoplado a uma câmara digital Olympus DP71 (Olympus, Tóquio, Japão).

2.3 Imunohistoquímica do músculo liso pênis

Foi realizada a técnica de Avidina Biotina para a identificação das células musculares lisas, utilizando anticorpo monoclonal anti-mouse anti- α actina de músculo liso (Abcam, N° catálogo EPR5368, Carlsbad, CA, E.U.A.)

Foram realizados controles negativos, associado ao anticorpo primário, foi utilizado um kit de polímeros imunohistoquímico *Envision + Dual Link System HRP (DAB+)* (Dako, Vila Carpinteria, CA, E.U.A). A revelação foi feita com solução de 3,3, diamino-benzidina tetrahydroclorido (DAB) a 0,1% (Dako, Vila Carpinteria, CA, E.U.A) em H₂O₂, lavados em água destilada, desidratados em uma serie crescente de etanol, diafanizados em xilol e montados com Enthelan.

2.4 Morfometria corpo cavernoso

As análises morfométricas de músculo liso, tecido conjuntivo e sinusóide do corpo cavernoso foram realizadas utilizando-se fotomicrografias obtidas com objetiva de 20 X. O software ImageJ (versão 1,41 NIH, Bethesda, E.U.A.), carregada com o seu próprio plugin grid.class (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/>), foi usada para gerar uma grade contendo 98 pontos. A grade foi sobreposta as fotomicrografias digitais dos tecidos eréteis do corpo cavernoso. A densidade de superfície do músculo liso, tecido conjuntivo, e sinusoides foram determinadas pela contagem de pontos e expressa por percentagem do espaço de referência.

2.5 Análise dos lipídeos plasmáticos

Os lipídios plasmáticos foram analisados através do método de espectrofotometria (Bioclin System II, Bioclin / Quibasa, Belo Horizonte, Brasil) utilizando kits de ensaio para o colesterol total (N ° de catálogo K083-2), HDL (n ° de

catálogo K071-23) LDL directa (n ° de catálogo K088-27) e triacilglicerol (n ° de catálogo 117-2).

2.6 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

O TOTG foi realizado pouco antes do sacrifício, após os animais terem mantidos em jejum durante 6 horas. Uma amostra de sangue foi obtida a partir da veia da cauda e, em seguida, uma solução de glicose a 25% em solução salina foi administrada aos animais por gavagem numa dose de 1,0 g /kg de peso corporal. Foram então obtidas amostras de sangue adicionais aos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a gavagem, e a concentração de glicose foi aferida nas amostras usando um glucômetro (Accu-Chek, Roche, São Paulo, Brasil). A curva glicêmica foi traçada, e os resultados são dados como a área sob a curva.

2.7 Método Oil Red

Para identificar macroscopicamente placas ateromatosas, arcos aórticos inteiros foram corados usando o procedimento Oil Red O (Sigma, St. Louis, MO, EUA, catálogo N ° O9755) como descrito anteriormente (Andres-Manzano *et al.*, 2015).

2.8 RT-qPCR

O RNA total foi extraído de todo o arco aórtico (aproximadamente 30 mg) utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, CA, EUA, catálogo n ° 15596026). A concentração de RNA foi determinada utilizando espectroscopia Nanovue plus (GE Life Sciences) e 1 µg de RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen, n ° de catálogo 18068015). A síntese do cDNA da primeira cadeia foi realizada utilizando iniciadores Oligo (dT) para mRNA e transcriptase reversa Superscript III (ambos da Invitrogen). Realizou-se RT-qPCR utilizando um termociclador BioRad CFX96 C1000 e a mistura SYBR Green (Invitrogen, n ° de catálogo 11784200). Os iniciadores para o RT-qPCR foram concebidos utilizando o software em linha Primer 3 e são indicados na Tabela 2. Foi utilizado o TBP (proteína de ligação a TATA) como controle endógeno para normalizar a expressão dos genes selecionados. O de RT-qPCR para o gene alvo e o controle endógeno foram aproximadamente iguais e foram calculadas através de uma série de diluições de cDNA. As reações de PCR em tempo real foram conduzidas após um programa de pré-desnaturação e ativação da polimerase (4 minutos a 95 ° C). Em seguida, quarenta e quatro ciclos, cada um consistindo de 95 ° C durante 10s e 60 ° C durante 15s, foram seguidos por um programa de curva de fusão (60 a 95 °

C com taxa de aquecimento de 0,1 ° C / s). Os controles negativos consistiram em poços nos quais o cDNA foi substituído por água destilada. A razão de expressão relativa de mRNA foi calculada pela equação, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ em que $-\Delta Ct$ representa a diferença entre o número de ciclos (Ct) dos genes alvo e o controle endógeno.

Tabela 3. Sequência Primers utilizados RT-PCR do arco aórtico.

Name	5' - 3'	Primers
Biglycan	FW	GGTGGGCATCAATGACTTCT
	RV	AGGGTTGTTGAAGAGGCTGA
Decorin	FW	AAGAAGGGGCCTTCAAGAAC
	RV	AAGCCTTTCCA ACTTCACGA
Fibromodulin	FW	CGTCCCTGACAGCTACTTCC
	RV	TGCTGGAGTTGAAGGTGTTG
Lumican	FW	AAGAGTGTGCCAATGGTTCC
	RV	CACTGCAGGTCTGTGACGTT
PDGFa	FW	TGCCTTGGAGACAAGTCTGA
	RV	TCTTGCAA ACTGCAGGAATG
PDGFb	FW	CGGCCTGTGACTAGAAAGTCC
	RV	CCTTGTCATGGGTGTGCTTA
Sulfotransferase	FW	GAGGCAGATTCAGACCTTCG
	RV	TGAATCCATGTTGTCCCTGA
Syndecan	FW	CTCAGAGCCTTTTGGACAGG
	RV	TACAGCATGAAAGCCACCAG
TBP	FW	CAGCCTTCCACCTTATGCTC
	FW	TTGCTGCTGTCGTCTTTGTT
TGFβ1	FW	GACTCTCCACCTGCAAGACC
	RV	CGAGCCTTAGTTTGGACAGG
TGFβ2	FW	TGGCTTCACCACAAAGACAG
	RV	CCTCGAGCTCTTCGCTTTTA
TGFβ3	FW	GATGAGCACATAGCCAAGCA
	RV	CATCGAAAGACAGCCATTCA
VEGF	FW	ATCTTCAAGCCGTCCTGTGT
	RV	TATGTGCTGGCTTTGGTGAG
Versican	FW	TTCAGGCAGCTTGGAGAAAT
	RV	CAGGGTTCTCACCCCAAGTA

Legenda:PDGFa – Fator de crescimento derivado de plaquetas subunidade A;PDGFb Fator de crescimento derivado de plaquetas subunidade B; VEGF – Fator de crescimento vascular endothelial; TGF β 1 - Fator de transformação do crescimento beta isoforma 1; TGF β 2 - Fator de transformação do crescimento beta isoforma 2 ; TGF β 3 - Fator de transformação do crescimento beta isoforma 3; IL6 – Interleucina 6

Tabela 4 - Sequência Primers utilizados RT-PCR do pênis.

Name	5' - 3'	Primers
Biglican	FW	GGTGGGCATCAATGACTTCT
	RV	AGGGTTGTTGAAGAGGCTGA
Decorin	FW	AAGAAGGGGCCTTCAAGAAC
	RV	AAGCCTTTCCAACCTTCACGA
Fibromodulin	FW	CGTCCCTGACAGCTACTTCC
	RV	TGCTGGAGTTGAAGGTGTTG
Lumican	FW	AAGAGTGTGCCAATGGTTCC
	RV	CACTGCAGGTCTGTGACGTT
PDGFa	FW	TGCCTTGGAGACAAGTCTGA
	RV	TCTTGCAAACCTGCAGGAATG
PDGFb	FW	CGGCCTGTGACTAGAAGTCC
	RV	CCTTGTCATGGGTGTGCTTA
Sulfotransferase	FW	GAGGCAGATTCAGACCTTCG
	RV	TGAATCCATGTTGTCCCTGA
Syndecan	FW	CTCAGAGCCTTTTGGACAGG
	RV	TACAGCATGAAAGCCACCAG
TBP	FW	CAGCCTTCCACCTTATGCTC
	FW	TTGCTGCTGTCGTCTTTGTT
TGF β 1	FW	GACTCTCCACCTGCAAGACC
	RV	CGAGCCTTAGTTTGGACAGG
TGF β 2	FW	TGGCTTACCACAAAGACAG
	RV	CCTCGAGCTCTTCGCTTTTA
TGF β 3	FW	GATGAGCACATAGCCAAGCA
	RV	CATCGAAAGACAGCCATTCA
VEGF	FW	ATCTTCAAGCCGTCCTGTGT
	RV	TATGTGCTGGCTTTGGTGAG
Versican	FW	TTCAGGCAGCTTGGAGAAAT
	RV	CAGGGTTCTCACCCCAAGTA
Catalase	FW	TTGACAGAGAGCGGATTCTT
	RV	TCTGGTGATATCGTGGGTGA
IL6	FW	AGTTGCCTTCTTGGGAGTGA

SOD2	RV	ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT
	FW	CAGGACCCATTGCAAGGAA
TNF α	RV	GTGCTCCCACACGTCAATCC
	FW	TCAGCCGATTTGCTATCTCA
GPX1	RV	TGGAAGACTCCTCCCAGGTA
	FW	CCCGTGCGCAGGTACAG
GR	RV	CAGCAGGGTTTCTATGTCAGGTT
	FW	GGGATTGGCTGTGATGAGAT
	RV	GGTGACCAGCTCCTCTGAAG

Legenda:PDGFa – Fator de crescimento derivado de plaquetas subunidade A;PDGFb Fator de crescimento derivado de plaquetas subunidade B; VEGF – Fator de crescimento vascular endothelial; TGF β 1 - Fator de transformação do crescimento beta isoforma 1; TGF β 2 - Fator de transformação do crescimento beta isoforma 2 ; TGF β 3 - Fator de transformação do crescimento beta isoforma 3; IL6 – Interleucina 6; SOD – Superóxido dismutase; TNF α – Fator de necrose tumoral alfa; GPX1 – Glutaciona peroxidase 1; GR – Glutaciona redutase;

2.9 Western blot pênis

Foi utilizado para análise de western blot 50 mg do tecido peniano, sendo adicionado ao tampão de lise RIPA com inibidor de protease, homogeneizado e centrifugado (10.000 rpm por 30 min a 4° C) para posterior quantificação das concentrações proteicas. Após desnaturação (5 min a 100° C), quantidades iguais de proteínas (50 μ g) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de PVDF (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) por eletrotransferência. A membrana foi então bloqueada por incubação em 5 % (p/v) de leite em pó desnatado, diluído em tampão salina com Tris (TBS-T [20 mmol/L de Tris/HCL (pH 7,4) e 500 mmol/L de NaCl]) em temperatura ambiente por uma hora, evitando assim ligações inespecíficas. Após, a membrana foi incubada com anticorpo primário overnight, a 4° C. As seguintes proteínas foram avaliadas: α -actina (43 kDa; SC-32251; Santa Cruz Biotechnology), Elastina (70 kDa; SC-17580; Santa Cruz Biotechnology), Colágeno I (70 kDa; SC-17580; Santa Cruz Biotechnology) e Colágeno III (70 kDa; SC-17580; Santa Cruz Biotechnology).

No dia seguinte, a membrana foi incubada com anticorpo secundário específico para a sua origem. A membrana foi revelada por quimioluminescência e as imagens foram obtidas através do sistema ChemiDoc (BioRad, Hercules, CA, EUA). As bandas foram quantificadas de acordo com suas intensidades usando o software ImageJ (NIH,

imagej.nih.gov/ij, EUA). A β -actina (SC-81178, Santa Cruz Biotechnology) foi utilizada como fator de correção

2.10 Análise estatística

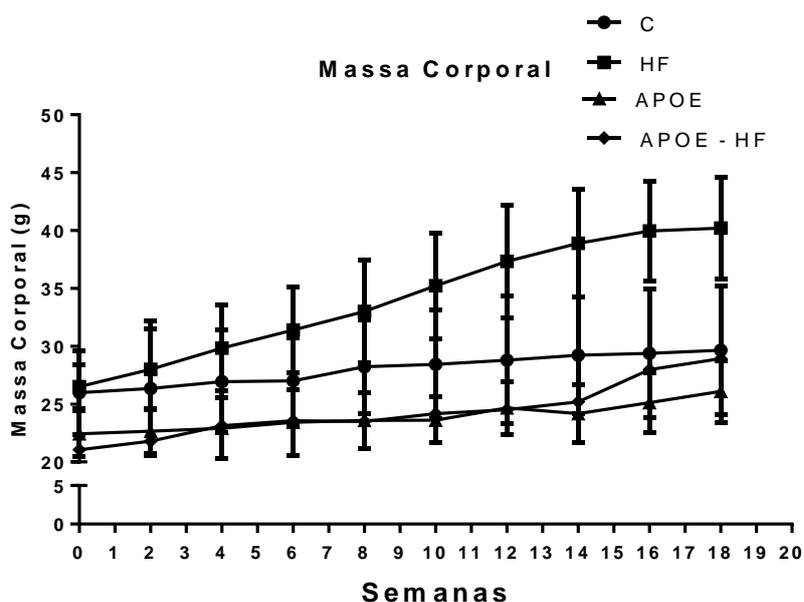
Os resultados são expressos por média \pm desvio padrão. As médias de grupo para cada variável foram primeiramente analisadas utilizando *one-way ANOVA*, quando foi encontrada significância estatística, foram feitas comparações planejadas por pares usando o método de Holm-Sidak: (I) entre os grupos C e HF para avaliar os efeitos da dieta *high-fat* nos camundongos(C57CL/ B6); (II) entre os grupos C e ApoE para avaliar os efeitos da deficiência de apolipoproteína E em camundongos alimentador por dieta controle ; E (III) entre os grupos ApoE e ApoE-HF para avaliar os efeitos dieta *high-fat* em camundongos deficientes em apolipoproteína E. As massas corporais foram comparadas utilizando teste t pareado. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism (San Diego, CA, EUA) versão 7.02, e significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Massa corporal

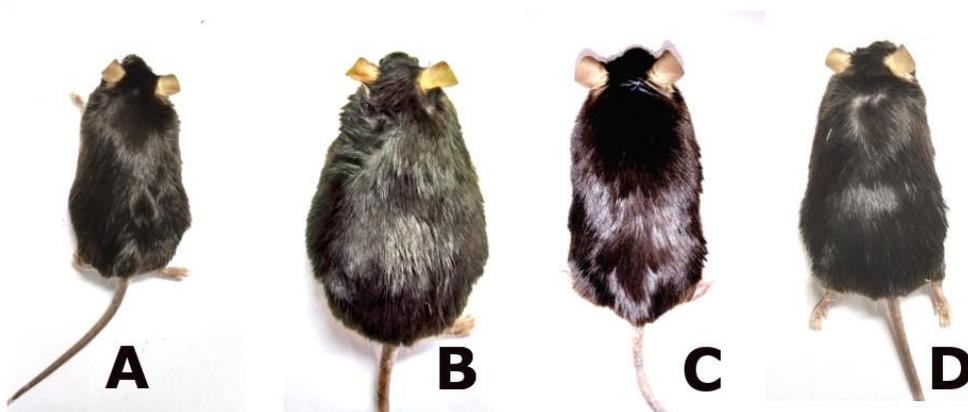
Os animais C57CL / B6 e ApoE (- / -), quando alimentados com uma dieta *high-fat*, houve aumento significativo de massa corporal (51,1%, $p < 0,001$ e 39,3%, $p < 0,001$, respectivamente) em comparação com os grupos que receberam uma dieta normal.

Figura 9 - Resultado massa corporal



Legenda: Gráfico representa a massa corporal dos animais dos grupos experimentais em semanas.

Figura 10. Imagens dos camundongos demonstrando a diferença da massa corporal.

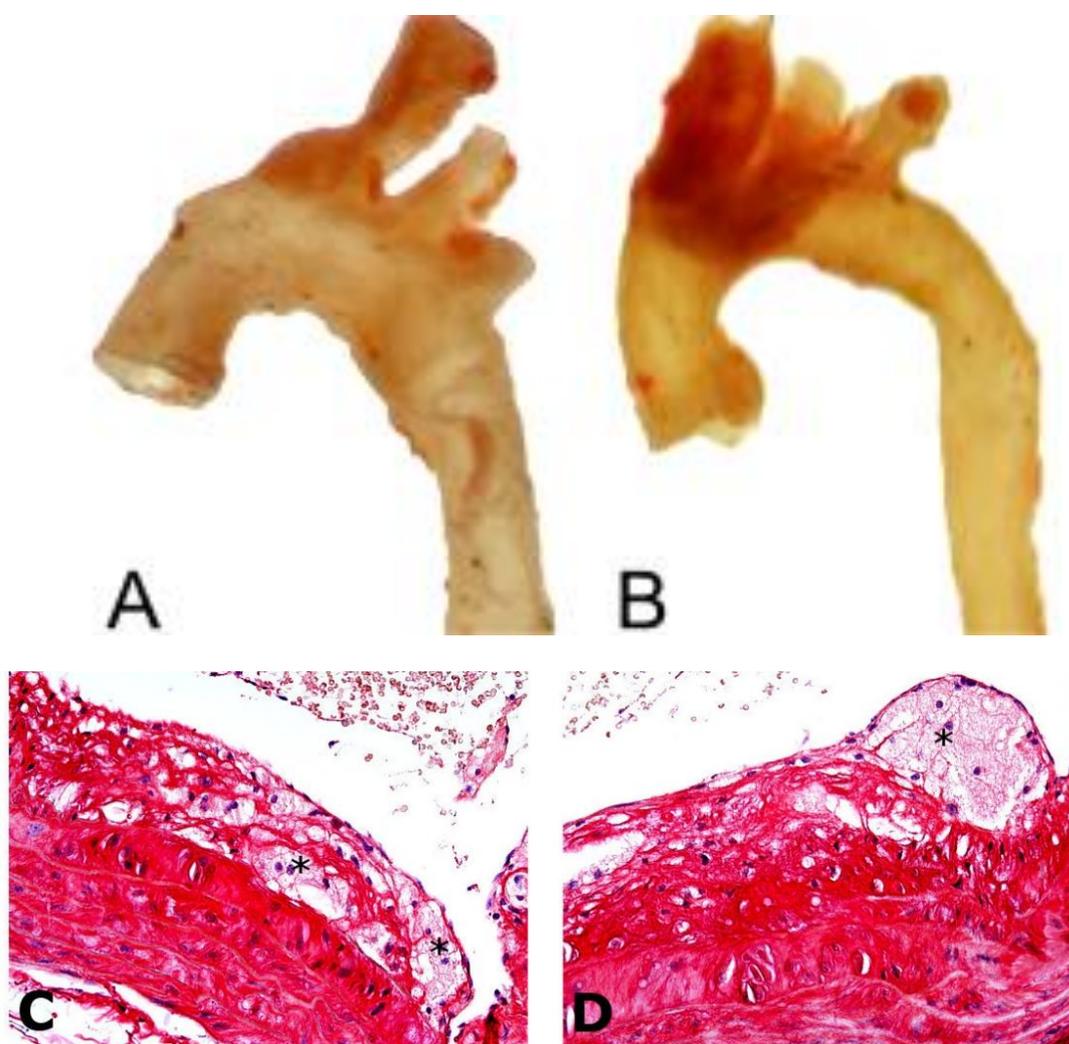


Legenda: A – Grupo C, B – grupo HF, C – Grupo ApoE, D – Grupo ApoE-HF.

3.2 Placas aterosclerose.

A marcação com *oil red* vermelho de evidenciou as lesões ateroscleróticas desenvolvidas na parede do arco aórtico dos animais ApoE (Figura. 1A) e ApoE-HF (Figura. 1B), mas não em animais C ou HF (não encontrada). Além disso, as lesões foram macroscopicamente mais proeminentes em ApoE-HF em comparação com ApoE. Coloração de seções com vermelho de picro sirius revelaram que as lesões ateroscleróticas dos animais ApoE-HF (Figura. 1D) foram mais complexas e fibróticas do que aqueles em ApoE (Figura. 1C).

Figura 11 - Lesões ateroscleróticas.

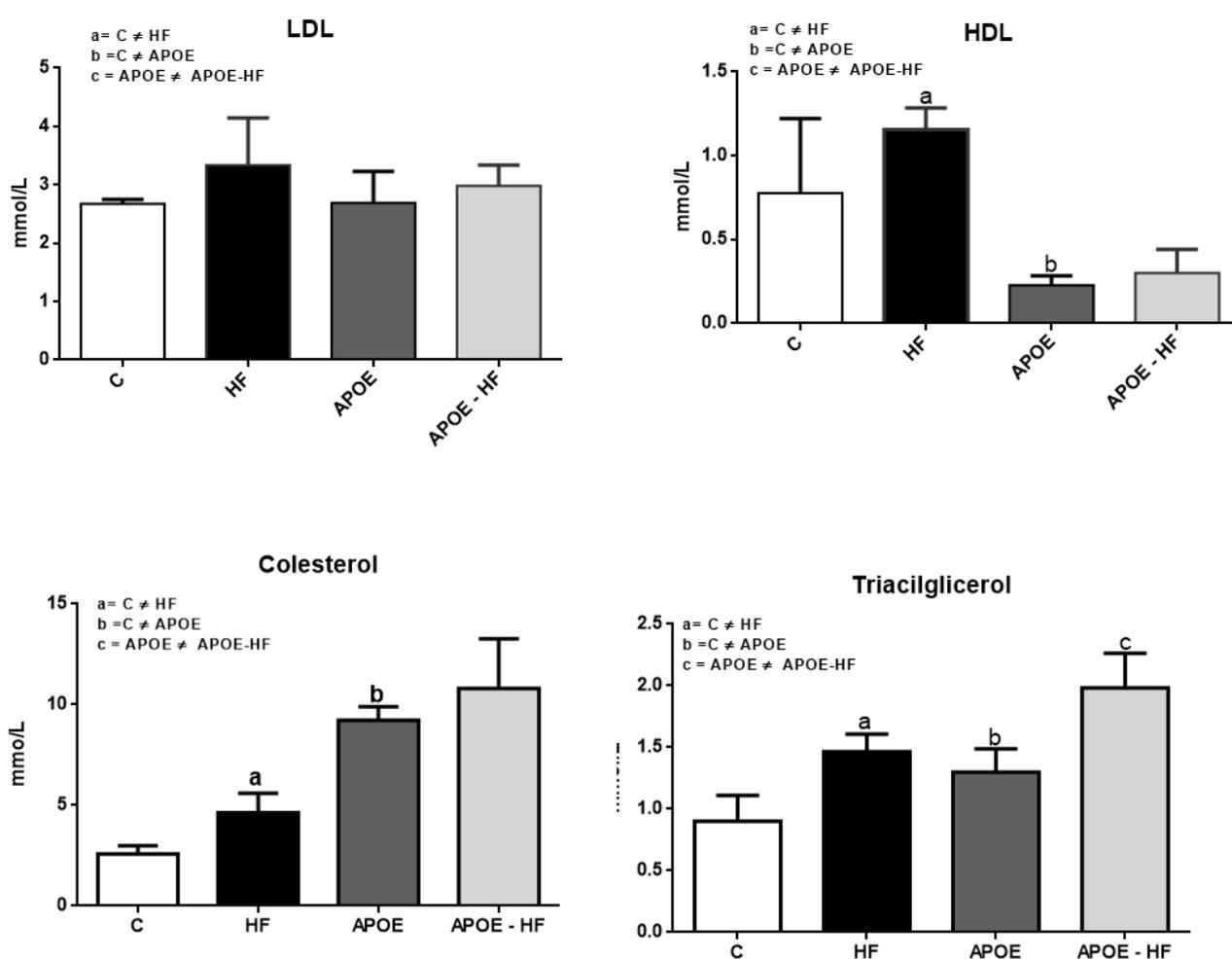


Legenda: Arco aórtico de camundongos ApoE (-/-) alimentados com uma dieta controle (A, C) ou uma dieta *high-fat* (B, D). As imagens macroscópicas (A, B) foram obtidas a partir de segmentos arteriais frescos corados com *Oil Red*, que mostra as lesões como áreas avermelhadas. As seções histológicas (C, D) das lesões ateroscleróticas (asteriscos) foram coradas com vermelho Picro-Sirius e capturadas com aumento final de x400. As imagens são representativas dos respectivos grupos.

3.3 Lipídeos plasmáticos

Em relação aos níveis plasmáticos de colesterol e o triacilglicerol houve aumento significativo no grupo HF e ApoE em relação ao grupo C e o no grupo ApoE que recebeu dieta High-Fat aumentou significativamente em relação ao grupo que recebeu apenas dieta padrão.

Figura 12 – Resultados da análise sérica, de colesterol, Triacilglicerol, HDL e LDL

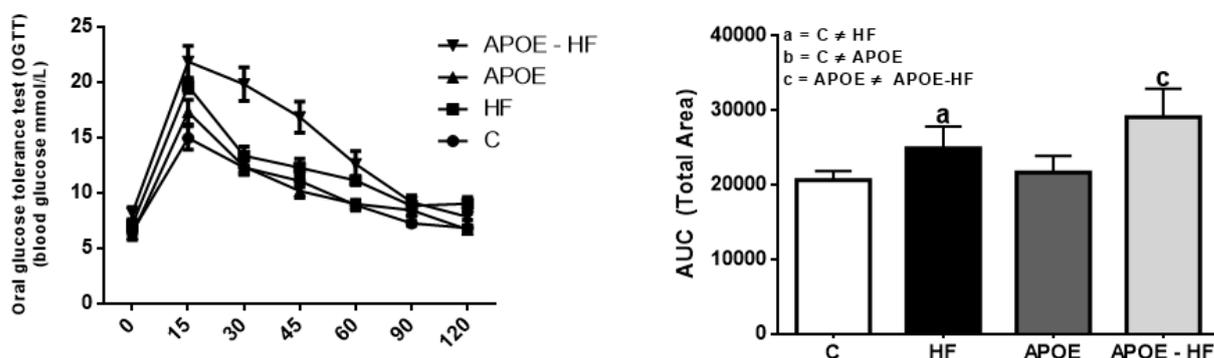


Legenda: Resultados da análise sérica, de colesterol, Triacilglicerol, HDL e LDL grupos C, HF, APOE, APOE-HF. A significância estatística foi considerada com $p < 0,05$.

3.4 Teste oral de tolerância à glicose

O TOTG indicou intolerância à glicose com maior área sobre a curva nos grupos HF e ApoE-HF em relação ao grupo C e ApoE ($p=0,0215$ e $p= 0,0001$ respectivamente).

Figura 13 - Resultados teste oral de tolerância a glicose e a o gráfico de área sobre a curva.

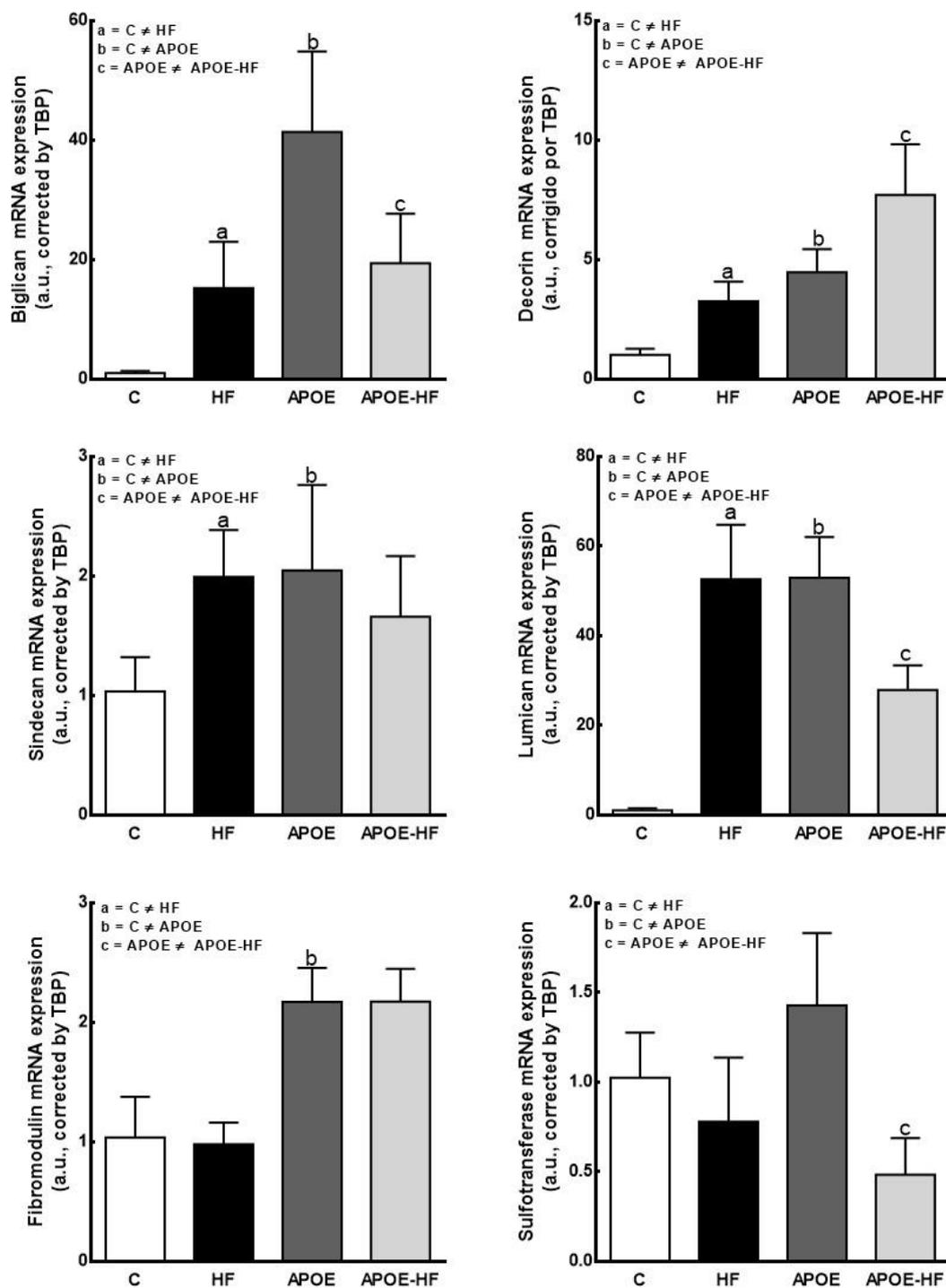


Legenda: grupos C, HF, APOE, APOE-HF. A significância estatística foi considerada com $p < 0,05$.

3.5 Expressão gênica de proteoglicanos arteriais no arco aórtico

A expressão de Versican não foi detectada nos grupos (não ilustrados). No entanto, a expressão gênica dos outros proteoglicanos intersticiais foi visivelmente afetada. Assim, em animais HF, houve aumento da expressão de biglycan, lumican, e syndecan-1 em relação a C (Figura 14), Enquanto que a fibromodulina permaneceu inalterada. Deficiência de Apolipoproteína E (ApoE vs C) resultou em efeitos semelhantes sobre estes proteoglicanos, e também aumentou a expressão da fibromodulina. Expressão foi aumenta na maioria dos proteoglicanos no grupo ApoE-HF quando comparado com o grupo ApoE, houve diferenças, notadamente na maior expressão de decorin e na diminuição da expressão lumican.

Figura 14 – Resultados da expressão dos diferentes proteoglicanos no arco aórtico

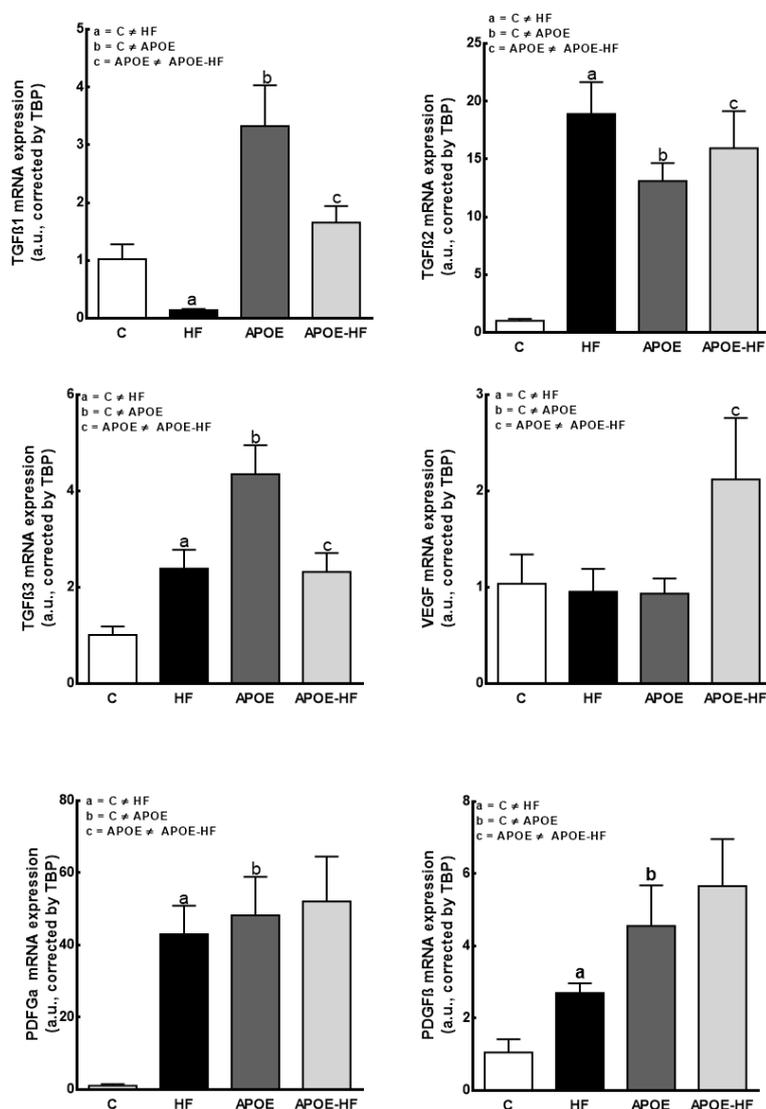


Legenda: grupos C, HF, APOE, APOE-HF. A significância estatística foi considerada com $p < 0,05$.

3.6 Expressão gênica de fatores de crescimento no arco aórtico

Na expressão de TGF β 1 e TGF β 3 houve aumento significativo nos grupos ApoE em relação aos grupos ApoE-HF. Entretanto na expressão gênica de TGF β 2 houve aumento significativo nos grupos HF e ApoE-HF quando comparado o grupo ApoE. Na expressão de VEGF houve aumento significativo do grupo ApoE quando comparado com os outros grupos experimentais. O PDGFa e PDGFb se mostrou aumentado no grupo HF em relação controle. Entretanto houve uma redução no PDGFa e aumento no PDGFb quando comparado com grupo ApoE com ApoE- HF.

Figura 15 – Resultados da expressão dos fatores de crescimento no arco aórtico,

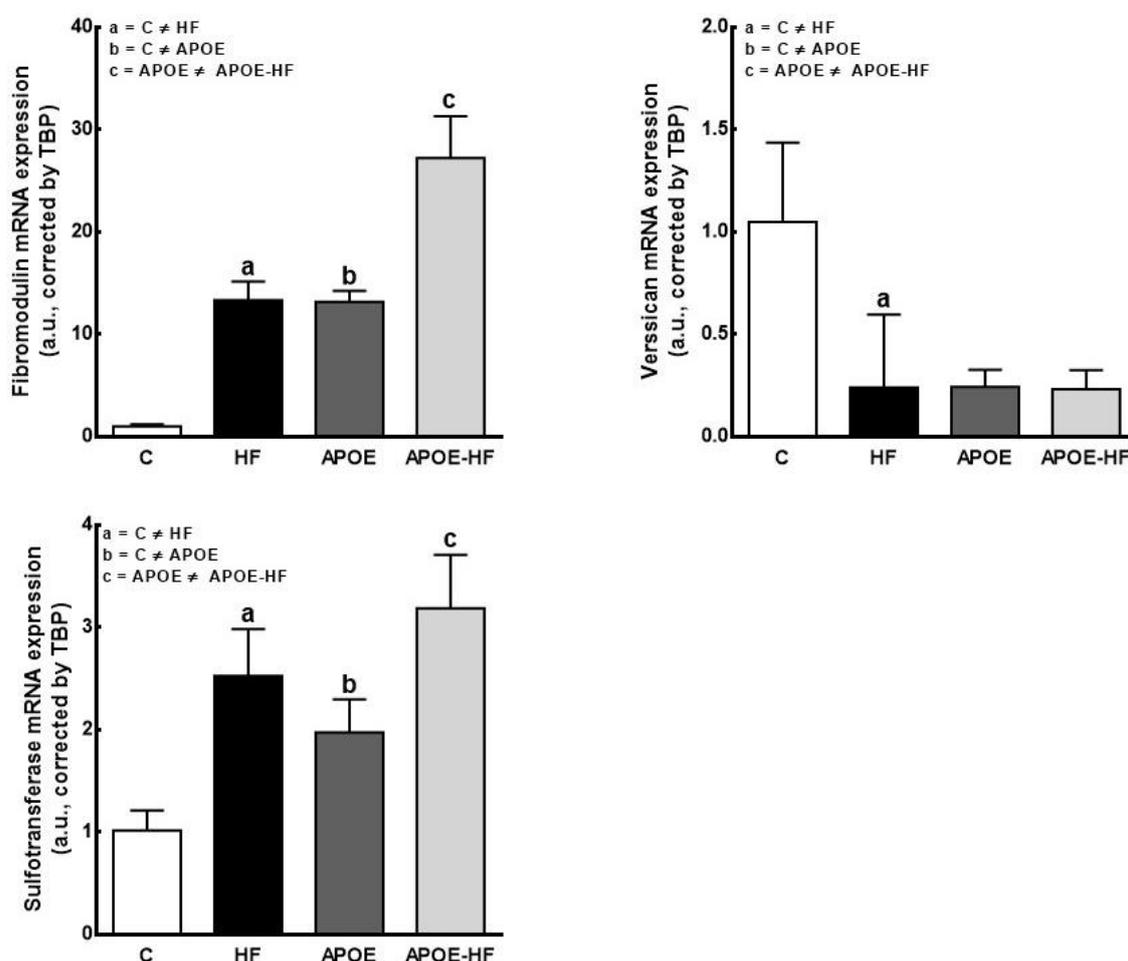


Legenda: grupos C, HF, APOE, APOE-HF. A significância estatística foi considerada com $p < 0,05$.

3.7 Expressão gênica proteglicanos arteriais no pênis

No que se refere a expressão gênica do biglican, decorin, lumican, sindecan, fibromodulina, houve um aumento significativo do grupo ApoE-HF em relação ao grupo ApoE. E o mesmo ocorrendo entre grupos HF e ApoE em relação ao controle. Na expressão de versican houve uma diminuição significativa nos grupos HF, ApoE em relação ao controle.

Figura 16 - Resultados da expressão dos diferentes proteglicanos no pênis

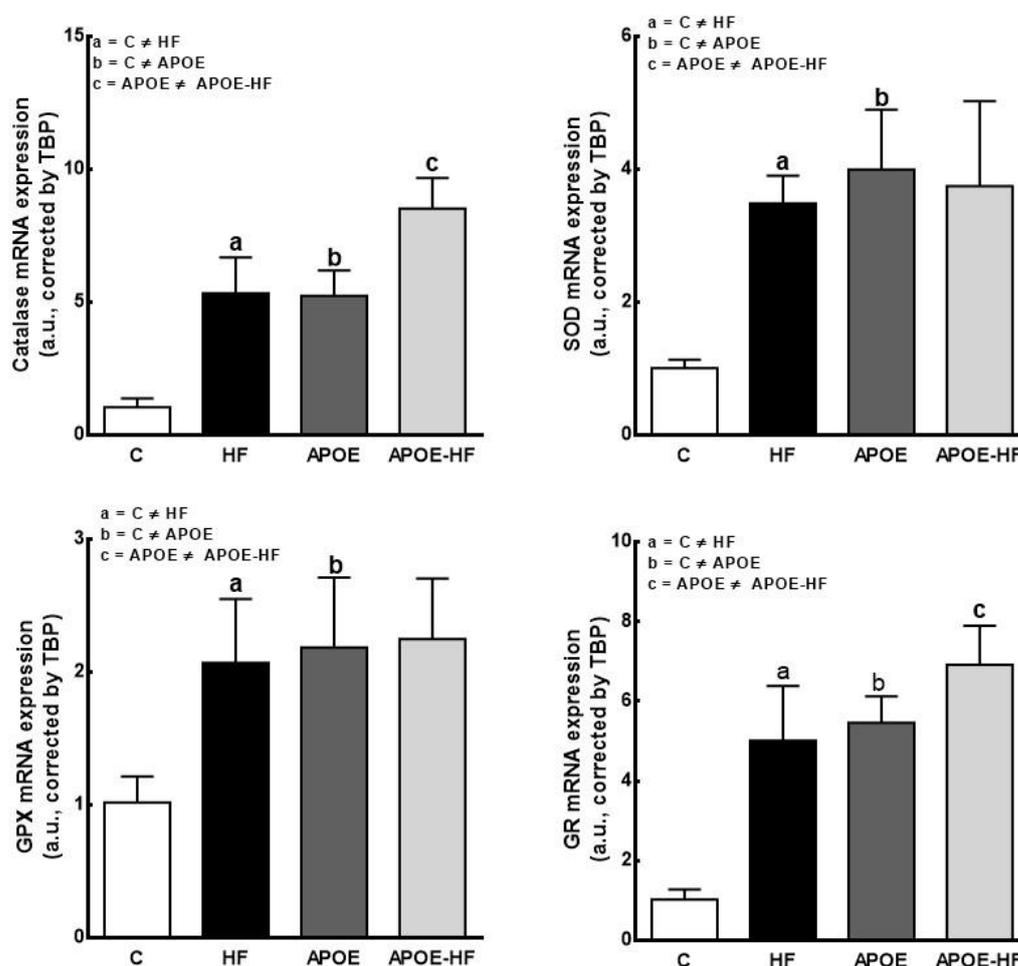


Legenda: grupos C, HF, APOE, APOE-HF. A significância estatística foi considerada com $p < 0,05$

3.8 Expressão gênica marcadores de estresse oxidativo no pênis

Na expressão dos diferentes marcadores de estresse oxidativo houve aumento na expressão catalase, SOD, GPX, GR nos grupos HF, mostrando que a dieta *High-fat* possui influência nos animais C57-BL6 e o mesmo ocorrendo nos grupos ApoE em relação ao grupo C. Em relação aos grupos ApoE e ApoE-HF houve apenas aumento na expressão GR e catalase nos animais que receberam a dieta hiperlipídica.

Figura 17 – Gráfico dos resultados marcadores de estresse oxidativo da expressão dos diferentes marcadores de estresse oxidativo no pênis

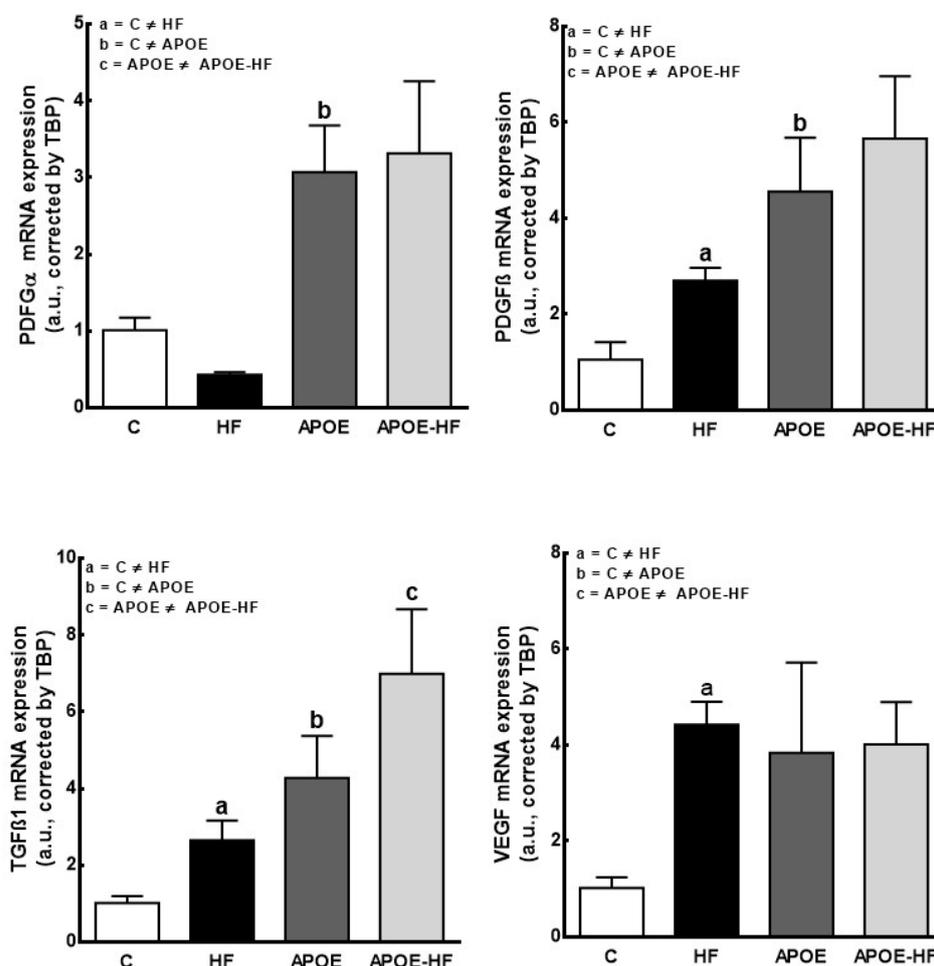


Legenda: grupos C, HF, APOE, APOE-HF. A significância estatística foi considerada com $p < 0,05$.

3.9 Expressão gênica fatores de crescimento no pênis

No pênis a expressão dos diferentes fatores de crescimento reagiram diferentes a ao efeito da dieta high-fat e ao modelo experimental. O PDGF α , houve uma redução nos grupos HF em relação ao controle, aumentando significativamente no grupo ApoE em relação ao controle e a dieta high-fat não alterou o efeito nos animais knockout. O PDGF β e TGF β 1, houve aumento significativo no grupo HF em relação ao grupo C, e o mesmo ocorrendo entre ApoE e o grupo controle em ambos os fatores. O ApoE-HF teve aumento significativo em relação ao TGF β 1 comparado com ApoE. O VEGF houve diferença significativa entre os grupos HF e o grupo controle.

Figura 18 - Resultados da expressão dos fatores de crescimento no pênis.

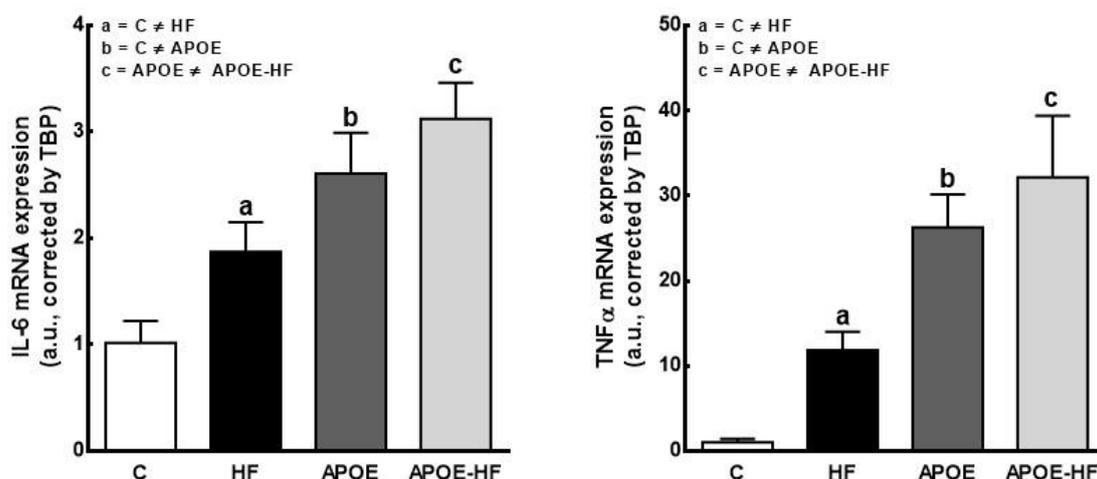


Legenda: grupos C, HF, APOE, APOE-HF. A significância estatística foi considerada com $p < 0,05$.

3.10 Expressão gênica do perfil inflamatório no pênis

Na expressão gênica de IL 6 e TNF α houve um aumento significativo no grupo HF, ApoE em relação ao grupo controle. Nos animais ApoE-HF ambas citocinas se encontram aumentadas, corroborando que a administração da dieta high-fat acentua as respostas inflamatórias.

Figura 19 - Gráficos dos resultados de perfil inflamatório no pênis



Legenda: grupos C, HF, APOE, APOE-HF. A significância estatística foi considerada com $p < 0,05$.

3.11 Morfometria do corpo cavernoso (CC) peniano.

Houve aumento significativo da Vv do tecido conjuntivo, nos Grupos HF (31,15%), ApoE (25,60%) em relação ao grupo C. Quando comparado o grupo ApoE e ApoE-HF não houve diferença entre os grupos analisados. Na densidade volumétrica de músculo liso houve aumento significativo entre os grupos HF (42,90%) e ApoE (59,15%) em relação ao grupo C. O mesmo ocorrendo entre o grupo ApoE-HF (17,72%) em relação ao grupo ApoE.

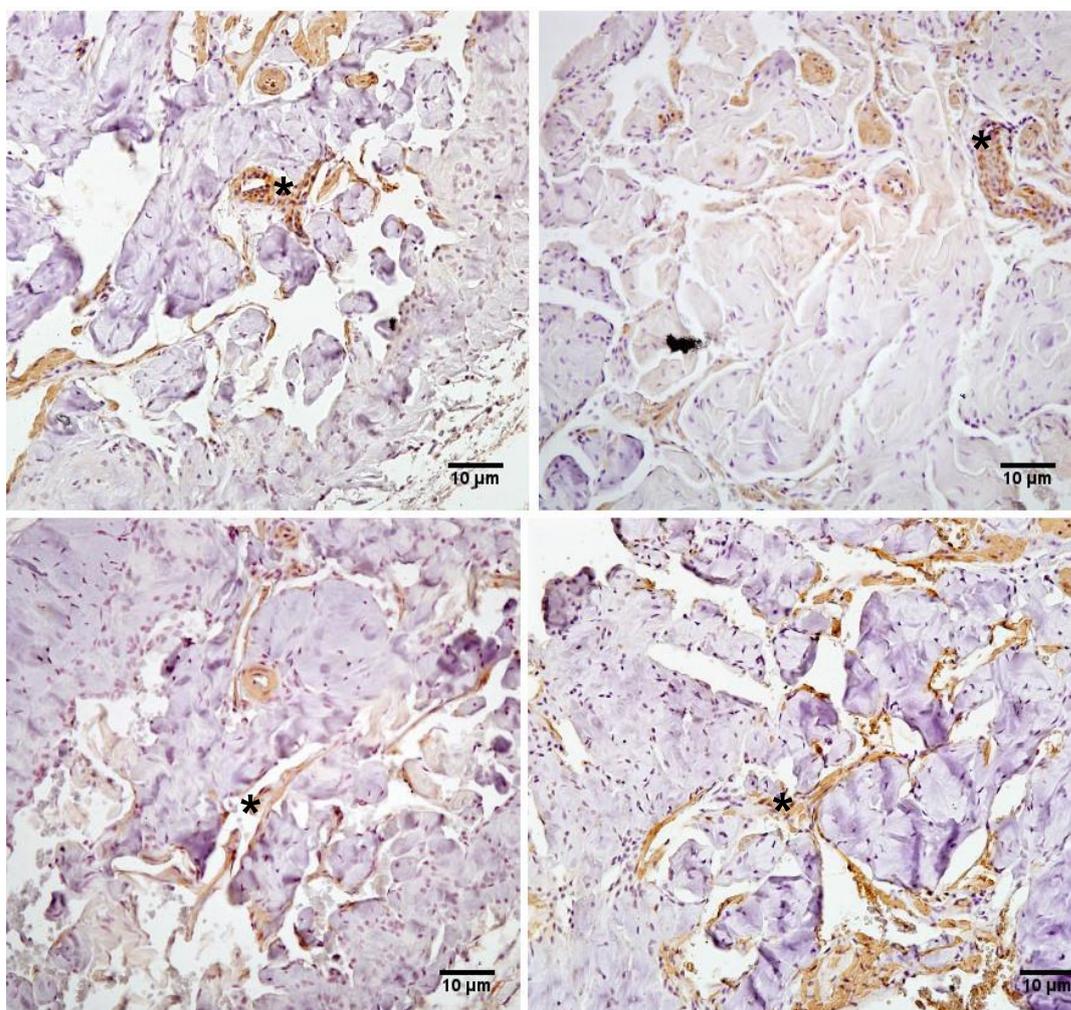
Em relação ao espaço sinusoidal do corpo cavernoso houve redução na densidade volumétrica em relação ao grupo HF (50,90%) e ApoE (45,17%) quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença estatística entre grupo ApoE e ApoE-HF em relação aos sinusóide do CC.

Tabela 5 – Resultados da morfometria do corpo cavernoso.

Dados	C		HF		ApoE		ApoE-HF	
	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD
Tecido conjuntivo	37,84	2,639	49,53	3,454	47,53	2,542	46,46	3,45
Músculo liso	11,63	1,149	16,62	2,824	18,51	2,276	21,79	3,487
Sinusóides	23,75	5,621	11,66	1,41	10,73	2,865	11,44	2,209

Legenda: – Resultados da morfometria do corpo cavernoso. os resultados foram expressos em Média e Desvio padrão (SD) .

Figura 20 – Fotomicrografias de imunohistoquímica de alfa actina de músculo liso (*) no corpo cavernoso

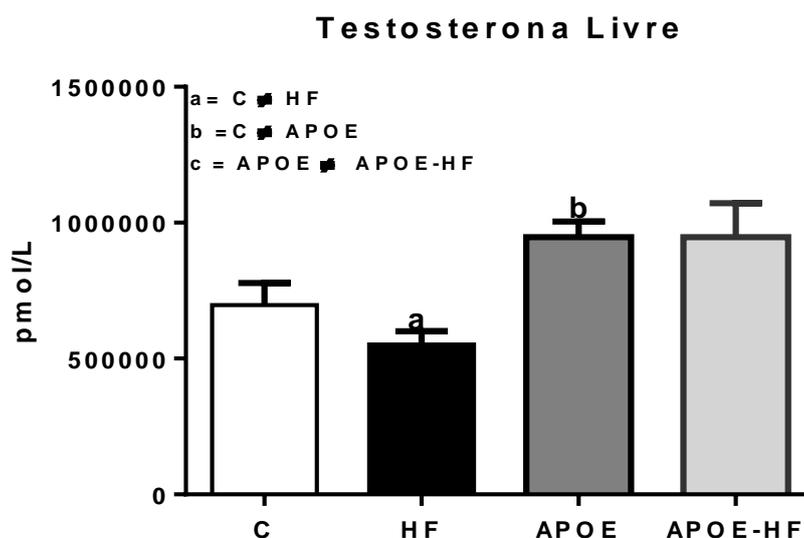


Legenda: Fotomicrografias de imunohistoquímica de alfa actina de músculo liso (*) no corpo cavernoso, nos grupos C, HF, ApoE, ApoE-HF.

3.12 Testosterona Livre

A testosterona livre foi reduzida significativamente em relação ao grupo C, e foi observado aumento significativo em relação ao grupo ApoE em comparação ao grupo C.

Figura 21 – Resultados da testosterona livre sérica

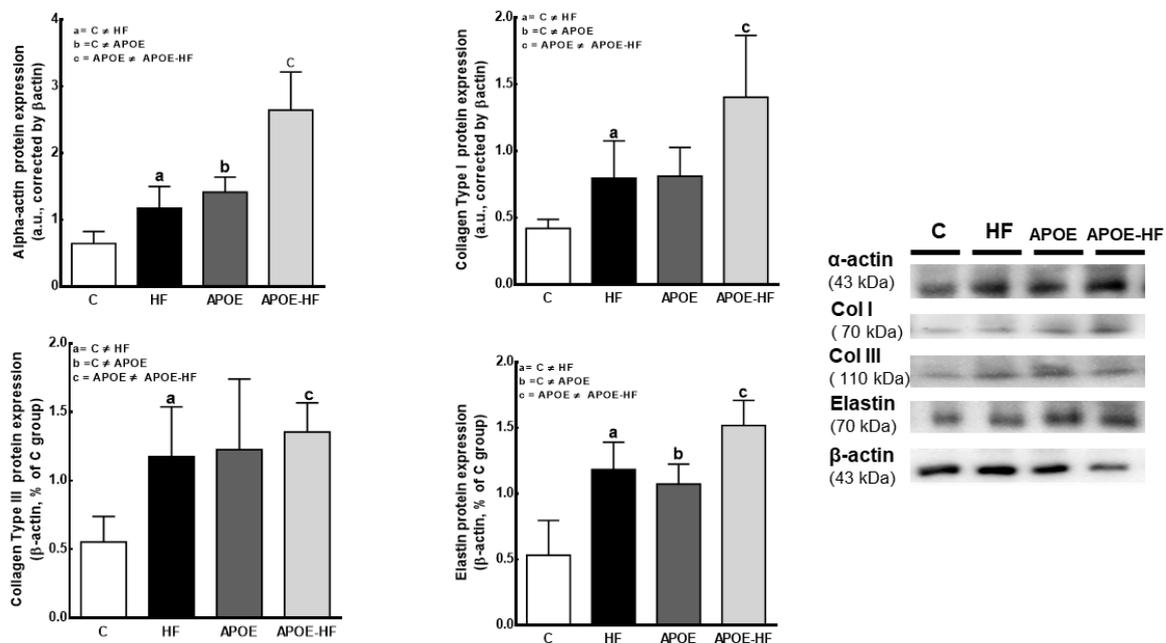


Legenda: Resultados da testosterona livre sérica dos grupos C, HF, APOE, APOE-HF. A significância estatística foi considerada com $p < 0,05$.

3.13 Western Blot

Foi observado aumento significativo na expressão protéica da α -actina de músculo liso, Colágeno do tipo I, Colágeno do tipo III, Elastina, nos animais HF e ApoE-HF, mostrando que a dieta hiperlipídica possui influência sobre os elementos fibrosos da matriz extracelular e na musculatura lisa no pênis de camundongos C57BL6 e ApoE.

Figura 22 – Resultados da expressão proteica de α actina, colágeno tipo I, colágeno tipo III e Elastina.



Legenda: Resultados da expressão proteica de α actina, colágeno tipo I, colágeno tipo III e Elastina nos diferentes grupos experimentais, os dados foram expressos em Média e SD.

4 DISCUSSÃO

Os animais ApoE ^{-/-} são uma cepa amplamente utilizada para estudo do mecanismo de aterogênese, porém, estudos que avaliam a interação e a expressão gênica dos diferentes proteoglicanos no desenvolvimento das placas ateroscleróticas no mesmo experimento ainda não tinha sido realizado.

Os resultados são de extrema importância para o conhecimento da fisiopatologia da aterosclerose neste modelo. Os resultados dos lipídeos plasmáticos em camundongos C57BL6 e ApoE com ou sem dieta high fat são consistente com dados descritos na literatura, e com aumento de triacilglicerol e colesterol total no grupos ApoE em relação ao controle respectivamente ($0,9008 \pm 0,2094$ e $1,299 \pm 0,1877$; $2,577 \pm 0,4056$ e $9,226 \pm 0,6680$).

A Dieta *High Fat* influenciou o metabolismo lipídico de HDL, triacilglicerol e colesterol, aumentando seus níveis plasmático no grupo HF em relação ao grupo C, o que corrobora os dados encontrados em animais C57BL6 alimentados por este tipo de dieta (Borges *et al.*, 2018).

Artigos descrevem que os valores de colesterol total e triacilglicerol podem ser variáveis nos animais ApoE (Jawien, Csanyi, *et al.*, 2007; Jawien, Gajda, *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2017). Os valores nos ApoE e C57BL6 são semelhantes aos apresentados em outros trabalhos (Fang *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014; Cavallera *et al.*, 2017; Perez-Tenero *et al.*, 2017)

A expressão gênica dos diferentes proteoglicanos se mostrou diferente nos animais ApoE quando comparado com controle, fato observado na aterogênese humana, porém, um dos proteoglicanos importantes neste mecanismo, o versican não foi expresso em nenhum dos grupos experimentais no arco aórtico. Estudos com estas linhagens já demonstraram a ausência da expressão proteica do versican na aorta de animais ApoE com dieta padrão (Kunjathoor *et al.*, 2002).

A expressão do versican foi observado em camundongos LDL ^{-/-} e ausente na parede da aorta em animais C57BL6(Seidelmann *et al.*, 2008).

Os resultados encontrados nestes projetos estão de acordo com os dados encontrados na literatura. Na análise dos dados dos arcos aórticos dos animais ApoE e ApoE-HF não foi observado a presença deste proteoglicano, porém, no tecido peniano dos mesmos animais, utilizando o mesmo primer foi verificado a presença deste gene.

Os camundongos possuem uma camada subendotelial de matriz frouxa e

células (Lee *et al.*, 2017). Em humanos o versican é encontrado em abundância, especialmente em espessamento pré aterosclerótico da túnica íntima (Gutierrez *et al.*, 1997; Evanko *et al.*, 1998; Otsuka *et al.*, 2015), e a degradação de versican se encontra aumentada no plasma de paciente de vários graus de aterosclerose (Barascuk *et al.*, 2013).

O versican especificamente possui uma interação com hialuronan, formando grande agregado molecular. Na túnica média das artérias, este agregado é envolvido na estrutura e nas propriedades de mecanossensibilização da parede das artérias e mudanças na sua composição alteram a integridade das artérias (Roccabianca *et al.*, 2014).

A ausência do versican na aorta de camundongos ApoE - / - é um dos aspectos que diferem o modelo do que é observado nos humanos.

Na expressão gênica do decorin, nos grupos experimentais houve um aumento nos grupos HF e ApoE em relação ao controle e a dieta hiperlipídica aumentou a expressão do decorin no grupo ApoE-HF em relação ao grupo ApoE , (Grupo C $1,025 \pm 0,2539$; Grupo HF $3,267 \pm 0,8158$; Grupo ApoE $4,476 \pm 0,9730$; Grupo ApoE- HF $7,713 \pm 2,121$). O aumento na expressão de decorin foi observado em animais ApoE, o mesmo ocorrendo em trabalhos em humanos (Gutierrez *et al.*, 1997; Yang, Y. *et al.*, 2018). Este aumento foi encontrado com maior frequência ao redor das placas fibrosas, mostrando que a superexpressão de decorin ocorre em placas ateroscleróticas complexas, o que confirma os nossos achados tendo em vista que nos animais ApoE-HF a expressão é de 72,48% em relação ao ApoE, mostrando que a oferta da dieta *high-fat* pode contribuir em alterações semelhantes à expressão de decorin.

A expressão de biglican, se mostrou aumentado animais C57BL6 que receberam dieta hiperlipídica, o mesmo sendo observado nos animais ApoE que receberam dieta controle. De acordo com a “hipótese de resposta à retenção”, o biglican é reconhecido como um iniciador do mecanismo de aterosclerose devido à sua capacidade de reter lipoproteínas na parede do vaso. Este evento acontece inicialmente na aterosclerose e precede o recrutamento de monócitos / macrófagos e células inflamatórias. O biglican é uma proteína lipoproteica complexa, é altamente suscetível a modificações, induzindo a absorção pelos macrófagos para formar células espumosas, com oxidação, lipólise e proteólise (Mandraffino *et al.*, 2017). Em contrapartida Grandoch *et al.*, (2016), descreve que o biglican desempenha papel

ateroprotetor, devido a sua ação contra progressão da aterosclerose através da diminuição do acúmulo de macrófagos, inibição da atividade da trombina e diminuição da ativação plaquetária. Em humanos a expressão proteica de biglican diminui com a progressão aterosclerótica, com aparecimento das placas fibrosas (Otsuka *et al.*, 2015). Os nossos resultados demonstram que houve aumento na expressão gênica no grupo ApoE, que possui uma lesão menor aterosclerótica. O oposto foi observado nos grupos ApoE-HF, tendo uma menor expressão gênica de biglican quando as placas são mais complexas e com acúmulo de colágeno, confirmando que administração de dieta high-fat proporciona uma expressão gênica de biglican similar a encontrada na aterosclerose humana.

A fibromodulin compartilha homologia próxima (~ 50%) com lumican, outro membro da família SLRP. Como fibromodulina, lumican liga-se ao colágeno tipo I e contribui para a síntese de colágeno. A ausência de fibromodulina reduz a formação de placa e isso está associado com uma formação anormal de fibras de colágeno em placas ateroscleróticas, bem como diminuição da retenção lipídica na MEC vascular. A captação lipídica reduzida foi também observada em macrófagos cultivados em MEC deficiente em fibromodulina (Shami *et al.*, 2013).

As interações entre o lumican e a superfície celular influenciam a migração celular, a proliferação e a apoptose, que são importantes para a cicatrização de feridas e respostas imunes e devem ser consideradas na biologia da placa da aterosclerose. O papel específico do lumican e da fibromodulina no interior das placas aterogênicas ainda não foram completamente esclarecidas (Hultgardh-Nilsson *et al.*, 2015).

O TGF- β estimula a expressão do biglican, que é um proteoglicano que está intimamente associado com a interação de lipídios na aterosclerose humana. Nossos resultados demonstram uma diminuição na expressão TGF β 1 e TGF β 3 nos grupos ApoE-HF em ApoE, e estão associados a diminuição da expressão gênica de biglican, demonstrando novamente que a administração da dieta *high-fat* resulta em efeitos aterogênicos semelhantes aos que são encontrados em humanos (Yang *et al.*, 2010; Otsuka *et al.*, 2015).

Foi demonstrado em humanos que PDGF e PDGFRs têm uma expressão maior em vasos ateroscleróticos em comparação com o normal (Papadopoulos e Lennartsson, 2018). Estudo com o modelo em camundongos ApoE demonstraram que células do músculo liso vascular expressam ativamente PDGF, resultando no aumento da

secreção de citocinas e recrutamento de leucócitos para adventícia, promovendo a formação de placas (He *et al.*, 2015).

Nossos resultados mostram aumento na expressão PDGF nos animais ApoE, porém a dieta High-fat não altera a expressão gênica quando comparado os animais ApoE que receberam dieta padrão. A expressão da isoforma PDGFa e PDGFb são semelhantes aos dados encontrados em humanos.

A ereção peniana ocorre através da vasodilatação dos vasos sanguíneos acompanhado do aumento do fluxo sanguíneo no pênis. A DE ocorre comumente devido à inadequada vasodilatação e redução do fluxo sanguíneo nos vasos sanguíneos penianos (Kloner *et al.*, 2018). Fatores de risco são freqüentes alterações associadas ao pênis, como insuficiência arterial, incluindo aterosclerose, hipertensão, hiperlipidemia, tabagismo, diabetes mellitus, irradiação pélvica e outras alterações cardiovasculares (Thompson *et al.*, 2005; Shamloul e Ghanem, 2013). Durante décadas, foi pensado que a DE era resultado primariamente de uma isquemia, mas o uso altamente bem sucedido de inibidores da fosfodiesterase 5 na DE levou à reconhecimento de que a causa da DE na grande maioria dos pacientes é uma lesão vascular. A aterosclerose induz a lesão vascular pode alterar a comunicação célula-a-célula dentro do pênis e resultar em anormalidades na vasorreatividade no corpo cavernoso (Xie *et al.*, 2007). A disfunção endotelial é o denominador comum de muitos fatores de riscos vasculares que podem levar à disfunção erétil arteriogênica. Thompson *et al.*, (2005) relata que pacientes com doença cardiovasculares são freqüentemente descritos com disfunção erétil preexistente.

Os estudos com modelos animais de disfunção erétil vasculagênico (DEV) ainda são escassos, e a utilização dos animais ApoE com modelo para este tipo de disfunção erétil foi descrito literatura (Behr-Roussel *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2007). Com o aumento dos estudos na DEV, a caracterização nos camundongos ApoE da expressão gênica dos proteoglicanos arteriais, fatores de crescimento, e marcadores de estresse oxidativo deveriam ser descritos, auxiliando e corroborando os achados prévios, o que justifica a importância do presente trabalho.

A importância da expressão gênica dos proteoglicanos arteriais foi descrito previamente no arco aórtico e no pênis a expressão de biglican, decorin, versican, lumican, sindecan, sulfotransferase aumentaram significativamente nos animais ApoE em relação ao grupo controle e sua expressão se mostrou aumentada quando os animais eram alimentados com dieta High-fat. O aumento da expressão de

proteoglicanos pode contribuir no remodelamento do tecido peniano e esta associado ao mecanismo aterogênico, aumentando a probabilidade da formação de placas ateromatosas, sendo fator de risco para eventos de DEV.

Estudo realizado em camundongos ApoE demonstram que com o aumento da idade do camundongo existe maior desenvolvimento progressivos de placas, estreitamento vascular e maior deficiência na resposta erétil (Behr-Roussel *et al.*, 2006).

O estreitamento vascular pode ocorrer devido ao aumento da musculatura lisa vascular. Esse tipo de alteração foi descrita em ratos *Wistar* que receberam dieta high-fat (Medeiros Junior *et al.*, 2014). Com isso foi investigado a expressão proteica e a densidade volumétrica (VV) de α actina de músculo liso através de western blot e análise morfométrica por imunohistoquímica no pênis de camundongos ApoE e C57BL6, sendo observado maior expressão proteica de α actina nos animais ApoE que receberam dieta normolipídea quando comparado com o controle, porém o efeito da dieta hiperlipídica aumentaram a expressão proteica e a VV do musculo liso vascular nos grupos HF e ApoE-HF em relação aos seus respectivos controles.

O espaço vascular peniano também sofre influencia da matriz extracelular, e frequentemente lesões penianas causam remodelamento da matriz extracelular, como observado em pênis de animais irradiados que sofreram estresse causados pela irradiação e demonstraram aumento na expressão da elastina, colagênio do tipo I e III no corpo cavernoso (Medeiros *et al.*, 2014). Nos nossos resultados demonstramos que houve aumento na expressão dos elementos fibrosos da matriz extracelular nos animais ApoE e nos animais C57BL6 que receberam dieta high-fat. Estas alterações podem propor um possível *turnover* da MEC do penis dos camundongos, demonstrando uma influencia das placas de aterosclerose sobre o tecido peniano.

O acúmulo de lipídios oxidados na parede arterial tem sido descrito como uma possível causa da aterosclerose. Esta teoria é apoiada pelas descobertas de que o desenvolvimento da aterosclerose é acompanhado por uma acumulo de lipídios / lipoproteínas oxidadas na parede arterial que induzem uma série de eventos envolvidos na aterogênese, como aumento da adesão de células inflamatórias para células endoteliais, induzindo morte celular vascular e proliferação (Yang *et al.*, 2004). A produção de espécies reativas de oxigenio endogeno estão assosciada a diminuição da atividade de celulas vasculares mediadoras de oxidação de LDL. A expressão gênica de catalase, SOD, GPX e GR estão aumentadas nos grupos que receberam

dieta hiperlipídica HF e ApoE- HF e o mesmo foi observado nos animais nos animais ApoE que receberam dieta normolipídica. O aumento da expressão das espécies reativas podem estar associada e pode ser um fator que confirma o possível efeito da aterosclerose no tecido peniano, sendo um fator importante para para confirmação do modelo experimental.

Os modelos animais possuem limitações e os camundongos possuem a presença de osso peniano e na morfologia dos corpos cavernosos possuem uma característica fibroelástica no tecido cavernoso, que diferem do CC humano por ser um pênis fibromuscular como descrito por Pinheiro *et al.*(2000).

Na maior parte das variáveis estudadas os pênis dos camundongos ApoE se comportaram de forma semelhante com o observado na espécie humana, sendo uma característica importante para caracterização dos camundongos ApoE, como modelo experimental para DEV.

CONCLUSÃO

Na aorta de camundongos ApoE (- / -), a expressão gênica de proteoglicanos e fatores de crescimento associados à aterosclerose se replicam em certos parâmetros nos eventos fisiopatológicos que ocorrem em humanos. No entanto, existem diferenças importantes que devem ser levadas em conta quando se utiliza este tipo como nocaute para modelo de aterosclerose. Em relação ao metabolismo de proteoglicano vascular, a semelhança com seres humanos pode ser evidenciada quando os animais são alimentados com dieta rica em lipídeos.

Em relação ao pênis as condições que levam à aterosclerose na ApoE são acompanhadas por alterações no metabolismo dos proteoglicanos penianos. Embora existam algumas diferenças em relação ao que ocorre nas artérias humanas, essas alterações devem também favorecer a doença vascular e suas repercussões hemodinâmicas. Os resultados também mostram que a ApoE, especialmente sob uma dieta rica em lipídeos, é um modelo adequado para investigar a DE vasculogênica e suas associações com doenças cardiovasculares.

REFERÊNCIAS

- ADEFEGHA, S. A.; OYELEYE, S. I.; OBOH, G. African crocus (*Curculigo pilosa*) and wonderful kola (*Buchholzia coriacea*) seeds modulate critical enzymes relevant to erectile dysfunction and oxidative stress. **J Complement Integr Med**, May 23 2018. ISSN 1553-3840 (Electronic) 1553-3840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29791312> >.
- ANDRES-MANZANO, M. J.; ANDRES, V.; DORADO, B. Oil Red O and Hematoxylin and Eosin Staining for Quantification of Atherosclerosis Burden in Mouse Aorta and Aortic Root. **Methods Mol Biol**, v. 1339, p. 85-99, 2015. ISSN 1940-6029 (Electronic) 1064-3745. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26445782> >.
- BARASCUK, N. et al. A MMP derived versican neo-epitope is elevated in plasma from patients with atherosclerotic heart disease. **Int J Clin Exp Med**, v. 6, n. 3, p. 174-84, 2013. ISSN 1940-5901 (Print) 1940-5901. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23573348> >.
- BAUMANN, F. et al. Erectile dysfunction - overview from a cardiovascular perspective. **Vasa**, v. 46, n. 5, p. 347-353, Aug 2017. ISSN 0301-1526 (Print) 0301-1526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28486869> >.
- BEHR-ROUSSEL, D. et al. Erectile dysfunction in hypercholesterolemic atherosclerotic apolipoprotein E knockout mice. **J Sex Med**, v. 3, n. 4, p. 596-603, Jul 2006. ISSN 1743-6095 (Print) 1743-6095. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16839315> >.
- BERTASSONI, L. E.; SWAIN, M. V. The contribution of proteoglycans to the mechanical behavior of mineralized tissues. **J Mech Behav Biomed Mater**, v. 38, p. 91-104, Oct 2014. ISSN 1878-0180 (Electronic) 1878-0180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043659> >.
- BOREN, J.; WILLIAMS, K. J. The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity. **Curr Opin Lipidol**, v. 27, n. 5, p. 473-83, Oct 2016. ISSN 1473-6535 (Electronic) 0957-9672. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27472409> >.
- BORGES, C. C. et al. Vitamin D Deficiency Increases Lipogenesis and Reduces Beta-Oxidation in the Liver of Diet-Induced Obese Mice. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v. 64, n. 2, p. 106-115, 2018. ISSN 1881-7742 (Electronic) 0301-4800. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29710028> >.
- BOZKURT, A. et al. Low serum melatonin levels are associated with erectile dysfunction. **Int Braz J Urol**, v. 44, Apr 30 2018. ISSN 1677-6119 (Electronic) 1677-5538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29757573> >.

CARDOSO, L. E. et al. Platelet-derived growth factor differentially regulates the expression and post-translational modification of versican by arterial smooth muscle cells through distinct protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase pathways. **J Biol Chem**, v. 285, n. 10, p. 6987-95, Mar 5 2010. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042606> >.

CARDOSO, L. E.; MOURAO, P. A. Glycosaminoglycan fractions from human arteries presenting diverse susceptibilities to atherosclerosis have different binding affinities to plasma LDL. **Arterioscler Thromb**, v. 14, n. 1, p. 115-24, Jan 1994. ISSN 1049-8834 (Print)

1049-8834. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8274466> >.

CAVALERA, M. et al. Dietary rose hip exerts antiatherosclerotic effects and increases nitric oxide-mediated dilation in ApoE-null mice. **J Nutr Biochem**, v. 44, p. 52-59, Jun 2017. ISSN 1873-4847 (Electronic)

0955-2863. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28399420> >.

DALEN, J. E. et al. The epidemic of the 20(th) century: coronary heart disease. **Am J Med**, v. 127, n. 9, p. 807-12, Sep 2014. ISSN 1555-7162 (Electronic)

0002-9343. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24811552> >.

DURMUS, N. et al. Time-course changes of nLDL-induced erectile dysfunction. **Int J Impot Res**, v. 29, n. 3, p. 115-119, May 2017. ISSN 1476-5489 (Electronic)

0955-9930. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28298622> >.

ESCARCEGA, R. O. et al. Inflammation and atherosclerosis: Cardiovascular evaluation in patients with autoimmune diseases. **Autoimmun Rev**, May 3 2018. ISSN 1873-0183 (Electronic)

1568-9972. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29730525> >.

EVANKO, S. P. et al. Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. **Am J Pathol**, v. 152, n. 2, p. 533-46, Feb 1998. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466580> >.

FANG, Y. et al. Ethanolic extract of propolis inhibits atherosclerosis in ApoE-knockout mice. **Lipids Health Dis**, v. 12, p. 123, Aug 13 2013. ISSN 1476-511X (Electronic)

1476-511X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23941539> >.

FOGELSTRAND, P.; BOREN, J. Retention of atherogenic lipoproteins in the artery wall and its role in atherogenesis. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 22, n. 1, p. 1-7, Jan 2012. ISSN 1590-3729 (Electronic)

0939-4753. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22176921> >.

FRAGA-SILVA, R. A. et al. An increased arginase activity is associated with corpus cavernosum impairment induced by hypercholesterolemia. **J Sex Med**, v. 11, n. 5, p. 1173-81, May 2014. ISSN 1743-6109 (Electronic)

1743-6095. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24612630> >.

FUKUCHI, M. et al. Normal and oxidized low density lipoproteins accumulate deep in physiologically thickened intima of human coronary arteries. **Lab Invest**, v. 82, n. 10, p. 1437-47, Oct 2002. ISSN 0023-6837 (Print)

0023-6837. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12379778> >.

GALKINA, E.; LEY, K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 165-97, 2009. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302038> >.

GETZ, G. S. Murine atherosclerosis. Part III. **Curr Drug Targets**, v. 9, n. 3, p. 173, Mar 2008. ISSN 1873-5592 (Electronic)

1389-4501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336234> >.

GETZ, G. S.; REARDON, C. A. Diet and murine atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 2, p. 242-9, Feb 2006. ISSN 1524-4636 (Electronic)

1079-5642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16373607> >.

_____. Animal models of atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 5, p. 1104-15, May 2012. ISSN 1524-4636 (Electronic)

1079-5642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22383700> >.

GRANDOCH, M. et al. Loss of Biglycan Enhances Thrombin Generation in Apolipoprotein E-Deficient Mice: Implications for Inflammation and Atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 36, n. 5, p. e41-50, May 2016. ISSN 1524-4636 (Electronic)

1079-5642. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27034473> >.

GUTIERREZ, P. et al. Differences in the distribution of versican, decorin, and biglycan in atherosclerotic human coronary arteries. **Cardiovasc Pathol**, v. 6, n. 5, p. 271-8, Sep 1997. ISSN 1054-8807 (Print)

1054-8807. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25989722> >.

HE, C. et al. PDGFRbeta signalling regulates local inflammation and synergizes with hypercholesterolaemia to promote atherosclerosis. **Nat Commun**, v. 6, p. 7770, Jul 17 2015. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 . Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26183159> >.

HEISTAD, D. D.; MARCUS, M. L. Role of vasa vasorum in nourishment of the aorta. **Blood Vessels**, v. 16, n. 5, p. 225-38, 1979. ISSN 0303-6847 (Print)

0303-6847. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/41607> >.

HSU, S. et al. A clinician's guide to the ABCs of cardiovascular disease prevention: the Johns Hopkins Ciccarone Center for the Prevention of Heart Disease and American College of Cardiology Cardiosource Approach to the Million Hearts Initiative. **Clin Cardiol**, v. 36, n. 7, p. 383-93, Jul 2013. ISSN 1932-8737 (Electronic)

0160-9289. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23670948> >.

HULTGARDH-NILSSON, A.; BOREN, J.; CHAKRAVARTI, S. The small leucine-rich repeat proteoglycans in tissue repair and atherosclerosis. **J Intern Med**, v. 278, n. 5, p. 447-61, Nov 2015. ISSN 1365-2796 (Electronic) 0954-6820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26477596> >.

JAN, A. T.; LEE, E. J.; CHOI, I. Fibromodulin: A regulatory molecule maintaining cellular architecture for normal cellular function. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 80, p. 66-70, Nov 2016. ISSN 1878-5875 (Electronic) 1357-2725. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27693429> >.

JARROLD, B. B.; BACON, W. L.; VELLEMAN, S. G. Expression and localization of the proteoglycan decorin during the progression of cholesterol induced atherosclerosis in Japanese quail: implications for interaction with collagen type I and lipoproteins. **Atherosclerosis**, v. 146, n. 2, p. 299-308, Oct 1999. ISSN 0021-9150 (Print) 0021-9150. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10532686> >.

JARVINEN, T. A.; PRINCE, S. Decorin: A Growth Factor Antagonist for Tumor Growth Inhibition. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 654765, 2015. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26697491> >.

JAWIEN, J. et al. Ticlopidine attenuates progression of atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor double knockout mice. **Eur J Pharmacol**, v. 556, n. 1-3, p. 129-35, Feb 5 2007. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17174298> >.

JAWIEN, J. et al. BAY x 1005 attenuates atherosclerosis in apoE/LDLR - double knockout mice. **J Physiol Pharmacol**, v. 58, n. 3, p. 583-8, Sep 2007. ISSN 0867-5910 (Print) 0867-5910. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928652> >.

KARAMANOU, K. et al. Lumican as a multivalent effector in wound healing. **Adv Drug Deliv Rev**, Mar 1 2018. ISSN 1872-8294 (Electronic) 0169-409X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29501701> >.

KHALIL, M. F.; WAGNER, W. D.; GOLDBERG, I. J. Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 12, p. 2211-8, Dec 2004. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15472124> >.

KLONER, R. A. et al. Cardiovascular Safety of Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors After Nearly 2 Decades on the Market. **Sex Med Rev**, Jun 27 2018. ISSN 2050-0521 (Electronic) 2050-0521. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29960874> >.

KUNJATHOOR, V. V. et al. Accumulation of biglycan and perlecan, but not versican, in lesions of murine models of atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 22, n. 3, p. 462-8, Mar 1 2002. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884291> >.

LEE, Y. T. et al. Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances. **Lipids Health Dis**, v. 16, n. 1, p. 12, Jan 17 2017. ISSN 1476-511X (Electronic)
1476-511X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28095860> >.

LEONG, X. F.; NG, C. Y.; JAARIN, K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 528757, 2015. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26064920> >.

LEONOVA, E. I.; GALZITSKAYA, O. V. Role of Syndecans in Lipid Metabolism and Human Diseases. **Adv Exp Med Biol**, v. 855, p. 241-58, 2015. ISSN 0065-2598 (Print)
0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26149933> >.

LITTLE, P. J. et al. Biosynthesis of natural and hyperelongated chondroitin sulfate glycosaminoglycans: new insights into an elusive process. **Open Biochem J**, v. 2, p. 135-42, 2008. ISSN 1874-091X (Electronic)
1874-091X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19238187> >.

MANDRAFFINO, G. et al. Biglycan expression, earlier vascular damage and pro-atherogenic profile improvement after smoke cessation in young people. **Atherosclerosis**, v. 257, p. 109-115, Feb 2017. ISSN 1879-1484 (Electronic)
0021-9150. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28131044> >.

MARTINEZ-CALATRAVA, M. J.; LARGO, R.; HERRERO-BEAUMONT, G. Improvement of experimental accelerated atherosclerosis by chondroitin sulphate. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 18 Suppl 1, p. S12-6, Jun 2010. ISSN 1522-9653 (Electronic)
1063-4584. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399896> >.

MATSUZAWA, Y.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction and coronary artery disease: assessment, prognosis, and treatment. **Coron Artery Dis**, v. 25, n. 8, p. 713-24, Dec 2014. ISSN 1473-5830 (Electronic)
0954-6928. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25365643> >.

MEDEIROS, J. L., JR. et al. Protective effects of nutritional supplementation with arginine and glutamine on the penis of rats submitted to pelvic radiation. **Andrology**, v. 2, n. 6, p. 943-50, Nov 2014. ISSN 2047-2927 (Electronic)
2047-2919. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25271133> >.

MEDEIROS JUNIOR, J. L. et al. Lard and/or canola oil-rich diets induce penile morphological alterations in a rat model. **Acta Cir Bras**, v. 29 Suppl 1, p. 39-44, 2014. ISSN 1678-2674 (Electronic)
0102-8650. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25185055> >.

MIKAMI, T.; KITAGAWA, H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 10, p. 4719-33, Oct 2013. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23774590> >.

NAKASHIMA, Y. et al. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 5, p. 1159-65, May 2007. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17303781> >.

NAKHLBAND, A. et al. Combating atherosclerosis with targeted nanomedicines: recent advances and future prospective. **Bioimpacts**, v. 8, n. 1, p. 59-75, 2018. ISSN 2228-5652 (Print) 2228-5652. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29713603> >.

OLIVEIRA, C. M. B. D. et al. Cytokines and Pain. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, p. 260-265, 2011. ISSN 0034-7094. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-70942011000200014&nrm=iso >.

OTSUKA, F. et al. Natural progression of atherosclerosis from pathologic intimal thickening to late fibroatheroma in human coronary arteries: A pathology study. **Atherosclerosis**, v. 241, n. 2, p. 772-82, Aug 2015. ISSN 1879-1484 (Electronic) 0021-9150. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26058741> >.

PAPADOPOULOS, N.; LENNARTSSON, J. The PDGF/PDGFR pathway as a drug target. **Mol Aspects Med**, v. 62, p. 75-88, Aug 2018. ISSN 1872-9452 (Electronic) 0098-2997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29137923> >.

PASTERKAMP, G.; DEN RUIJTER, H. M.; LIBBY, P. Temporal shifts in clinical presentation and underlying mechanisms of atherosclerotic disease. **Nat Rev Cardiol**, v. 14, n. 1, p. 21-29, Jan 2017. ISSN 1759-5010 (Electronic) 1759-5002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27762311> >.

PEREZ-TERNERO, C. et al. Food supplementation with rice bran enzymatic extract prevents vascular apoptosis and atherogenesis in ApoE^{-/-} mice. **Eur J Nutr**, v. 56, n. 1, p. 225-236, Feb 2017. ISSN 1436-6215 (Electronic) 1436-6207. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26476632> >.

PINHEIRO, A. C. et al. Organization and relative content of smooth muscle cells, collagen and elastic fibers in the corpus cavernosum of rat penis. **J Urol**, v. 164, n. 5, p. 1802-6, Nov 2000. ISSN 0022-5347 (Print) 0022-5347. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11025773> >.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229312> >.

ROCCABIANCA, S.; ATESHIAN, G. A.; HUMPHREY, J. D. Biomechanical roles of medial pooling of glycosaminoglycans in thoracic aortic dissection. **Biomech Model Mechanobiol**, v. 13, n. 1, p. 13-25, Jan 2014. ISSN 1617-7940 (Electronic) 1617-7940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23494585> >.

ROEDIG, H. et al. Biglycan is a new high-affinity ligand for CD14 in macrophages. **Matrix Biol**, May 17 2018. ISSN 1569-1802 (Electronic) 0945-053X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29777767> >.

ROSS, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **N Engl J Med**, v. 340, n. 2, p. 115-26, Jan 14 1999. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9887164> >.

RUDOLF, J.; LEWANDROWSKI, K. B. Cholesterol, lipoproteins, high-sensitivity c-reactive protein, and other risk factors for atherosclerosis. **Clin Lab Med**, v. 34, n. 1, p. 113-27, vii, Mar 2014. ISSN 1557-9832 (Electronic) 0272-2712. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24507791> >.

SAKAKURA, K. et al. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. **Heart Lung Circ**, v. 22, n. 6, p. 399-411, Jun 2013. ISSN 1444-2892 (Electronic) 1443-9506. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23541627> >.

SCHUMMER, A. The circulatory system, the skin and the cutaneous organs of the domestic mammals. . In: NICKEL, R. S., A; SEIFERLE, E. (Ed.). **The anatomy of the domestic animals**. . Berlin - Hamburg: : Verlag Paul Parey. , v.3, 1981. p.6-7.

SCHWARTZ, S. M.; VIRMANI, R.; ROSENFELD, M. E. The good smooth muscle cells in atherosclerosis. **Curr Atheroscler Rep**, v. 2, n. 5, p. 422-9, Sep 2000. ISSN 1523-3804 (Print) 1523-3804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11122774> >.

SEIDELMANN, S. B. et al. Aths1 is an atherosclerosis modifier locus with dramatic effects on lesion area and prominent accumulation of versican. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 12, p. 2180-6, Dec 2008. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18818413> >.

SHAMI, A. et al. Fibromodulin deficiency reduces low-density lipoprotein accumulation in atherosclerotic plaques in apolipoprotein E-null mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 33, n. 2, p. 354-61, Feb 2013. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23202368> >.

SHAMLOUL, R.; GHANEM, H. Erectile dysfunction. **Lancet**, v. 381, n. 9861, p. 153-65, Jan 12 2013. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23040455> >.

SHIM, J. et al. Large animal models of atherosclerosis--new tools for persistent problems in cardiovascular medicine. **J Pathol**, v. 238, n. 2, p. 257-66, Jan 2016. ISSN 1096-9896 (Electronic) 0022-3417. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26414760> >.

SIMS, F. H. A comparison of structural features of the walls of coronary arteries from 10 different species. **Pathology**, v. 21, n. 2, p. 115-24, Apr 1989. ISSN 0031-3025 (Print) 0031-3025. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2682490> >.

SINHA, N.; DABLA, P. K. Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review. **Curr Hypertens Rev**, v. 11, n. 2, p. 132-42, 2015. ISSN 1875-6506 (Electronic)

1573-4021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26022210> >.

TABAS, I.; WILLIAMS, K. J.; BOREN, J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications.

Circulation, v. 116, n. 16, p. 1832-44, Oct 16 2007. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17938300> >.

TALEB, S. Inflammation in atherosclerosis. **Arch Cardiovasc Dis**, v. 109, n. 12, p. 708-715, Dec 2016. ISSN 1875-2128 (Electronic)

1875-2128. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27595467> >.

TANG, T. et al. Prevention of TGFbeta induction attenuates angII-stimulated vascular biglycan and atherosclerosis in Ldlr-/- mice. **J Lipid Res**, v. 54, n. 8, p. 2255-64, Aug 2013. ISSN 1539-7262 (Electronic)

0022-2275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23749984> >.

TANNOCK, L. R. Vascular proteoglycans and atherosclerosis: not over yet.

Atherosclerosis, v. 237, n. 2, p. 435-6, Dec 2014. ISSN 1879-1484 (Electronic) 0021-9150. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25463070> >.

THOMPSON, I. M. et al. Erectile dysfunction and subsequent cardiovascular disease. **JAMA**, v. 294, n. 23, p. 2996-3002, Dec 21 2005. ISSN 1538-3598 (Electronic)

0098-7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16414947> >.

THOMPSON, J. C. et al. Increased atherosclerosis in mice with increased vascular biglycan content. **Atherosclerosis**, v. 235, n. 1, p. 71-5, Jul 2014. ISSN 1879-1484 (Electronic)

0021-9150. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24816040> >.

THOMPSON, J. C. et al. Elevated circulating TGF-beta is not the cause of increased atherosclerosis development in biglycan deficient mice. **Atherosclerosis**, v. 268, p. 68-75, Jan 2018. ISSN 1879-1484 (Electronic)

0021-9150. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29182988> >.

WIGHT, T. N. A role for proteoglycans in vascular disease. **Matrix Biol**, Feb 27 2018. ISSN 1569-1802 (Electronic)

0945-053X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29499356> >.

WIGHT, T. N.; MERRILEES, M. J. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. **Circ Res**, v. 94, n. 9, p. 1158-67, May 14 2004. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15142969> >.

WU, C. et al. Chlorogenic acid protects against atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice and promotes cholesterol efflux from RAW264.7 macrophages. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e95452, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25187964> >.

XIE, D. et al. A mouse model of hypercholesterolemia-induced erectile dysfunction. **J Sex Med**, v. 4, n. 4 Pt 1, p. 898-907, Jul 2007. ISSN 1743-6095 (Print) 1743-6095. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627737> >.

YANG, C. T. et al. Downregulation of lumican accelerates lung cancer cell invasion through p120 catenin. **Cell Death Dis**, v. 9, n. 4, p. 414, Mar 16 2018. ISSN 2041-4889 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29549325> >.

YANG, H. et al. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. **Circ Res**, v. 95, n. 11, p. 1075-81, Nov 26 2004. ISSN 1524-4571 (Electronic) 0009-7330. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15528470> >.

YANG, S. N. et al. Transforming growth factor-beta regulation of proteoglycan synthesis in vascular smooth muscle: contribution to lipid binding and accelerated atherosclerosis in diabetes. **J Diabetes**, v. 2, n. 4, p. 233-42, Dec 2010. ISSN 1753-0407 (Electronic) 1753-0407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20923499> >.

YANG, Y. et al. Association of SLRPs with carotid artery atherosclerosis in essential hypertensive patients. **Journal of Human Hypertension**, 2018/06/05 2018. ISSN 1476-5527. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s41371-018-0077-7> >.

YUSUF, S. et al. Cardiovascular risk and events in 17 low-, middle-, and high-income countries. **N Engl J Med**, v. 371, n. 9, p. 818-27, Aug 28 2014. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25162888> >.

ZHANG, B. et al. Interleukin-6 as a Predictor of the Risk of Cardiovascular Disease: A Meta-Analysis of Prospective Epidemiological Studies. **Immunol Invest**, p. 1-11, Jun 6 2018. ISSN 1532-4311 (Electronic) 0882-0139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29873573> >.

ZHANG, Z. et al. Improvement in erectile function in a rat model of high cholesterol diet-induced atherosclerosis by atorvastatin in a manner that is independent of its lipid-lowering property. **Andrologia**, v. 49, n. 9, Nov 2017. ISSN 1439-0272 (Electronic) 0303-4569. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28295458> >.