

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**REDUÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA
AUMENTA LESÃO ATEROSCLERÓTICA EM CAMUNDONGOS
LDL^{r/-}: PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E
APOPTOSE DE MACRÓFAGOS**

PLACIELLE FIOREZI FILETE

VILA VELHA-ES
JUNHO/2016

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**REDUÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA
AUMENTA LESÃO ATEROSCLERÓTICA EM CAMUNDONGOS
LDLr^{-/-}: PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E
APOPTOSE DE MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

PLACIELLE FIOREZI FILETE

VILA VELHA-ES
JUNHO/2016

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

F481r

Filete, Placielle Fiorezi

Redução dos níveis plasmáticos de testosterona aumenta lesão aterosclerótica em camundongos LDLr- participação de citocinas inflamatórias e apoptose de macrófagos / Placielle Fiorezi . – 2016.

37 f.: il.

Orientador: Tadeu Uggere de Andrade.

Co-orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2016.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Testosterona. 3. Colesterol. I.

Andrade, Tadeu Ugger. II. Pereira, Thiago de Melo Costa.

III.

Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

PLACIELLE FIOREZI FILETE

**REDUÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA
AUMENTA LESÃO ATEROSCLERÓTICA EM CAMUNDONGOS
LDLr^{-/-}: PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E
APOPTOSE DE MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 30 de junho de 2016,

Banca examinadora:



Profa. Dra. Bianca Prandi Campagnaro - UVV



Profa. Dra. Nazaré Souza Bissoli - UFES



Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira - UVV



Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade - UVV
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre esteve ao meu lado, me contemplando com sabedoria e força. Sua companhia foi o que fundamentou essa vitória. Ao meu Anjo da Guarda e Nossa Senhora, que, rogou ao Pai para conduzir cada passo da minha vida.

À minha família, sobretudo à minha mãe, Delfina, que participou de todos os momentos, transmitindo muito amor e segurança. Obrigada por tudo, você é meu maior exemplo de dignidade e respeito, minha melhor amiga. Ao meu pai, Plácido, que não se faz mais presente, mas que com certeza está olhando e torcendo por mim, tenho certeza que com muito orgulho de todas as minhas conquistas. Aos meus irmãos, Ronalth e Tielys, pelo apoio e suporte para que tudo se tornasse possível.

Ao meu orientador, professor Tadeu Uggere de Andrade, por tudo que fez por mim. Obrigada por ter me “recrutado” como aluna de iniciação científica, me apresentando ao mundo da pesquisa e fazendo despertar meu interesse pela carreira acadêmica. Obrigada pelo mestrado, por todos os ensinamentos e oportunidades. E que possamos escrever juntos mais páginas nesse livro chamado “vida”.

Ao meu co-orientador Thiago de Melo Costa Pereira, pelos construtivos momentos de muito aprendizado no laboratório. Obrigada pela grande ajuda na realização desse sonho. Espero que você continue sendo exemplo de inspiração para todos nós.

A professora Bianca Prandi por toda paciência e dedicação que foram essenciais para concretização deste trabalho.

A professora Iêda Kalil e ao professor Carlos Eduardo Tadokoro, pela ajuda desde as técnicas e desenvolvimento dos experimentos.

As amigas que tive a sorte de ganhar durante esse mestrado e que vou levar para a vida, Adriélly, Ewelyne e Paola. Obrigada meninas, pelos momentos de cumplicidade, paciência e descontração. Vocês fazem parte da minha história, serei

eternamente grata pelo apoio durante todas as fases desse mestrado e pelos maravilhosos momentos que compartilhamos juntas.

E a todos os meus companheiros do laboratório 29, Gabriela, Girlandia, Layla, Beatriz, Jean, Flávia, Larissa, Drielle e Mírian, agradeço por toda ajuda na concretização dessa etapa.

Aos amigos da vida, Oriel, Lucas, Renato, Raiana, Beatriz, Érica e Thaniaisis, por todo incentivo e por estarem ao meu lado, deixando meus dias mais coloridos. Obrigada por acreditarem na minha capacidade e por me lembrarem disso todos os dias.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de mestrado. E a todos os professores e funcionários da Universidade Vila Velha, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	6
2. MÉTODOS	8
3. RESULTADOS	13
4. DISCUSSÃO	19
REFERÊNCIAS	23
ANEXO	

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Gráficos de barras mostrando os parâmetros de colesterol total, colesterol não HDL-C (nHDL-C) e HDL colesterol (HDL-C) de camundongos *knockout* para receptor de LDL (LDLr^{-/-}) e C57BL/6 (*wild type* - WT) orquiectomizados (Orx) e não orquiectomizados.....13
- Figura 2** Gráficos de barras mostrando a concentração de testosterona de camundongos *knockout* para receptor de LDL (LDLr^{-/-}) e C57BL/6 (*wild type* – WT) orquiectomizados (Orx) e não orquiectomizados.....14
- Figura 3** Gráficos de barras mostrando a concentração de IL-6, TNF- α e IL-10 no plasma de camundongos *knockout* para receptor de LDL (LDLr^{-/-}) e C57BL/6 (*wild type* – WT) orquiectomizados (Orx) e não orquiectomizados.....15
- Figura 4** Gráfico de barras mostrando a relação TNF- α /IL-10 (A) e a relação IL-6/IL-10 (B) no plasma de camundongos *knockout* para receptor de LDL (LDLr^{-/-}) e C57BL/6 (*wild type* - WT) orquiectomizados (Orx) e não orquiectomizados.....16
- Figura 5** Gráficos de *dot plots* típicos de apoptose de macrófagos em camundongos *knockout* para receptor de LDL (LDLr^{-/-}) e C57BL/6 (*wild type* – WT) orquiectomizados (Orx) e não orquiectomizados utilizando anexina V (FITC) e iodeto de propídeo (PI).....16
- Figura 6** Cortes representativos de cada grupo experimental demonstrando a deposição lipídica avaliada pela coloração com Oil-Red e gráfico de barras mostrando a porcentagem da área de deposição lipídica em aortas de camundongos *knockout* para receptor de LDL (LDLr^{-/-}) e C57BL/6 (*wild type* – WT) orquiectomizados (Orx) e não orquiectomizados.....17

RESUMO

FILETE, Placielle Fiorezi, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, Junho de 2016. **Redução dos níveis plasmáticos de testosterona aumenta lesão aterosclerótica em camundongos LDLr^{-/-}: participação de citocinas inflamatórias e apoptose de macrófagos.** Orientador: Tadeu Uggere de Andrade. Co-orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.

A testosterona tem demonstrado exercer efeitos benéficos na aterosclerose. O presente estudo investigou os efeitos da redução de testosterona no desenvolvimento da aterosclerose sobre o perfil lipídico, inflamatório e apoptose de macrófagos. Foram utilizados camundongos machos LDLr^{-/-} e C57BL/6 (*wild type*– WT), separados em quatro grupos (n=8 para cada grupo): WT e LDLr^{-/-} (controles submetidos a cirurgia fictícia); WT Orx (WT orquiectomizado); LDLr^{-/-}Orx (LDLr^{-/-}orquiectomizado). Após quatro semanas da orquiectomia, o sangue foi recolhido para análise do perfil lipídico, testosterona e citocinas. As células peritoneais foram coletadas para análise de apoptose com anexina V (FITC) e iodeto de propídeo (PI) em citômetro de fluxo. A extração da aorta foi realizada para quantificação de deposição lipídica por “*en face*”. Animais com redução de testosterona apresentaram menor percentagem de apoptose em macrófagos comparado com os grupos controles (WT=6 ± 0,15; LDLr^{-/-}=4,3±0,3; WT Orx=0,98 ± 0,17; LDLr^{-/-}Orx=1,4±0,7%), concomitante com o aumento de deposição lipídica observado nesses animais (WT= 4,25±0,2; WT Orx= 8,4±0,4; LDLr^{-/-} =9,6±1,1; LDLr^{-/-}Orx= 15,8±2%). A análise de citocinas mostrou uma diminuição nos níveis de IL-10 nos grupos orquiectomizados (WT=387±26; WT Orx= 174±6; LDLr^{-/-}= 433±56; LDLr^{-/-} Orx= 145±7 pg/mL) e aumento nas razões TNF-α/IL-10 (WT= 1,3±0,09; WT Orx= 2,4±0,09; LDLr^{-/-} = 1,6±0,2; LDLr^{-/-} Orx= 2,93±0,14 pg/mL) e IL6/IL-10 (WT= 0,4±0,04; WT Orx= 0,7±0,03; LDLr^{-/-} = 0,5±0,06; LDLr^{-/-} Orx= 0,8±0,04 pg/mL) em comparação aos grupos controles. A redução de testosterona não alterou o perfil lipídico dos grupos experimentais. Conclui-se que a redução nos níveis de testosterona pode promover aumento de placa aterogênica por meio da regulação da resposta inflamatória via apoptose de macrófagos, sem alteração do perfil lipídico.

Palavras-chave: Aterosclerose, Apoptose, Interleucina10, Interleucina6, Fator de necrose tumoral alfa, Colesterol.

ABSTRACT

FILETE, Placielle Fiorezi, M.Sc., University Vila Velha – ES, June, 2016. **Reduction of plasma testosterone levels increase in atherosclerotic lesion LDLr^{-/-} mice: involvement of inflammatory cytokines and apoptosis of macrophages.** Advisor: Tadeu Uggere de Andrade. Co-advisor: Thiago de Melo Costa Pereira.

Testosterone has been shown to exert beneficial effects in atherosclerosis. The present study investigated the effects of testosterone reduction in the development of atherosclerosis on the lipid profile, inflammatory and apoptosis of macrophages. Male mice were used LDLr^{-/-} and C57BL / 6 (*wild type* - WT), were divided into four groups (n = 8 for each group): WT and LDLr^{-/-} (controls undergoing sham surgery); Orx WT (WT orchiectomized); LDLr^{-/-} Orx (LDLr^{-/-} orchiectomized). After four weeks of orchiectomy, blood was collected for analysis of lipid profile, testosterone and cytokines. Peritoneal cells were collected for apoptosis analysis with Annexin V (FITC) and propidium iodide (PI) in flow cytometer. The extraction was carried out to quantify aortic lipid deposition "*en face*". Animals with testosterone reduction showed a lower percentage of apoptosis in macrophages compared to control groups (WT=6 ± 0.15; LDLr^{-/-}= 4.3 ± 0.3; WT Orx= 0.98 ± 0.17; LDLr^{-/-}Orx= 1.4 ± 0.7%), concomitant with increased lipid deposition observed in these mice (WT = 4.25 ± 0.2; WT Orx = 8.4 ± 0.4; LDLr^{-/-} = 9,6 ± 1.1; LDLr^{-/-}Orx = 15.8 ± 2%). Cytokine analysis showed a decrease in IL-10 levels in castrated groups (WT= 387 ± 26; WT Orx = 174 ± 6; LDLr^{-/-} = 433 ± 56; LDLr^{-/-} Orx = 145 ± 7 pg/mL) and increase in TNF-α/ IL-10 ratio (WT = 1.3 ± 0.09, 2.4 ± WT = Orx 0.09; LDLr^{-/-}= 1.6 ± 0.2; LDLr^{-/-} Orx = 2.93 ± 0.14 pg/ml) and IL-6 / IL-10 ratio (WT = 0.4 ± 0.04, 0.7 ± WT = Orx 0.03; LDL^{-/-} = 0.5 ± 0.06; LDLr^{-/-}Orx = 0.8 ± 0.04 pg/mL) compared to control groups. The reduction of testosterone did not alter the lipid profile of groupsexperimentais. Therefore, the reduction in testosterone levels can promote increased atherogenic plaque by regulating the inflammatory response via apoptosis of macrophages, without altering the lipid profile.

Keywords: Atherosclerosis, Apoptosis, Interleukin 10, Interleukin 6, Tumor necrosis factor alpha, Cholesterol.

1. INTRODUÇÃO

As principais causas de mortalidade entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento estão relacionadas com as doenças cardiovasculares [1]. Nesse contexto, o papel protetor dos andrógenos com relação a essas doenças também tem sido relatado [2]. Estudo prospectivo revelou maior propensão de risco de morte por doenças cardiovasculares em homens cujos níveis totais de testosterona encontravam-se baixos independentes de múltiplos fatores de risco [3]. Outros estudos mostraram que a terapia de privação de andrógenos aumenta o risco de eventos cardiovasculares [4,5] em contrapartida, a terapia de reposição de andrógenos tem sido associada à diminuição da mortalidade [6, 7].

A aterosclerose se destaca como a principal etiologia que contribui para as doenças cardiovasculares [8]. Apesar de maior incidência de doenças cardiovasculares nos homens em comparação com as mulheres, estudos sugerem que os andrógenos, dos quais a testosterona é o principal, protegem contra aterosclerose em homens [9,10,11], influenciando na inflamação vascular e podendo reduzir o desenvolvimento da placa aterosclerótica [12], entretanto os mecanismos não estão totalmente elucidados.

A aterosclerose é uma doença inflamatória progressiva [13], caracterizada por disfunção endotelial, inflamação vascular e acúmulo de lipídios na camada íntima das artérias de médio e grande calibre [12, 14] que conduz a eventos cardíacos, como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, em resposta a ruptura da placa aterogênica [8].

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são mediadores da fase inicial da doença aterosclerótica. Em níveis elevados, estão envolvidas na organização do núcleo lipídico e na polarização de monócitos circulantes. No interior da placa, moléculas de LDL são especialmente susceptíveis a oxidação, formando a LDL oxidada (LDLox) [15], em resposta a essas moléculas, as células T são ativadas propiciando o recrutamento de monócitos circulantes que estão “patrulhando” o interior dos vasos sanguíneos para os tecidos, por meio das moléculas de adesão celular, onde se diferenciam em macrófagos [15, 16, 17, 18]. O resultado é a intensificação da inflamação por meio da ativação de células T helper-1 (Th1) que

promovem a produção de mediadores inflamatórios levando ao desenvolvimento da aterosclerose [16, 19,20].

Mediadores inflamatórios parecem desencadear uma modulação fenotípica de macrófagos na parede arterial durante a aterogênese [21]. Macrófagos ativados podem aumentar a vulnerabilidade da placa, enquanto um fenótipo alternativo pode contribuir para a estabilidade e regressão da mesma ao minimizar a inflamação [22]. Membros da família das citocinas têm mostrado envolvimento no processo inflamatório desde a iniciação até a progressão da lesão aterosclerótica [23]. Segundo Ait-Oufella *et al.* [24] todas as células envolvidas na aterosclerose são capazes de produzir e de responder às citocinas, as quais desempenham papel duplo na doença, podendo desempenhar papel anti ou pró inflamatório.

Moore *et al.* [25] reportam que macrófagos exercem um papel importante na resposta inflamatória por meio da sustentação de fatores pró-inflamatórios e de sua apoptose, que contribui para formação de um núcleo necrótico propenso à ruptura. A apoptose de macrófagos tem sido identificada como uma característica chave nas placas ateroscleróticas em todas as fases da lesão [26]. Ela pode ser desencadeada por uma combinação de fatores e condições, de acordo com o estágio da doença [27], podendo afetar a progressão da placa de formas diferentes [28]. Em lesões ateroscleróticas precoces, a apoptose de macrófagos está associada à redução da progressão da placa. Entretanto, nas lesões ateroscleróticas avançadas, a depuração diminuída de macrófagos apoptóticos resulta no aumento da lesão e em risco aumentado de ruptura da placa [29].

Visto que existem evidências da relação da inflamação com o processo aterosclerótico e do papel ateroprotetor da testosterona, hipotetiza-se que a orquiectomia de animais modelos experimentais de aterosclerose determina o aumento da deposição lipídica na placa aterosclerótica, envolvendo o desequilíbrio de citocinas inflamatórias e a apoptose de macrófagos. Tem sido proposto que camundongos *knockout* para os receptores de LDL (LDL^{r-/-}) são uma excelente opção para estudos sobre a patogênese da aterosclerose, dado que possuem o perfil de lipoproteína do plasma semelhante aos humanos hiperlipidêmicos, sendo o colesterol confinado principalmente a fração de LDL [30]. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o desenvolvimento da aterosclerose, o perfil lipídico, as citocinas anti e pró inflamatórias e a apoptose de macrófagos peritoneais em camundongos LDL^{r-/-} e seus respectivos controles, com e sem orquiectomia.

2. MÉTODOS

2.1. Animais e grupos experimentais

Foram utilizados camundongos machos LDLr^{-/-} e C57BL/6 (*wild type* – WT), com oito semanas de idade e massa corporal de 20-30g. Os animais foram separados em quatro grupos (n=12 para cada grupo): WT e LDLr^{-/-} (controles submetidos a cirurgia fictícia); WT Orx (WT orquiectomizado); LDLr^{-/-}Orx (LDLr^{-/-}orquiectomizado). Esses animais foram obtidos do Biotério de Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP/SP e mantido no Biotério da Universidade Vila Velha (UVV) com iluminação artificial (ciclo claro-escuro de 12h) e temperatura de 22°C. As gaiolas individuais permitiam o livre acesso dos animais à ingestão de água e ração (ração Probiotério, Moinho Primor, S.A). Os procedimentos experimentais ocorreram de acordo com as regras do guia para o cuidado e uso de animais de laboratório publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA (NHI Publication N 85-23, revised in 1996) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Vila Velha (CEUA-UVV, Protocolo nº 191/2011).

2.2. Orquiectomia

Os animais submetidos à orquiectomia, com idade de oito semanas, foram anestesiados (quetamina / xilazina: 8,7 e 1,3 mg/100g de peso corporal, intraperitonealmente) e depois da preparação asséptica do local do procedimento cirúrgico, uma pequena incisão foi efetuada na ponta do escroto. A túnica foi aberta e o testículo, cauda epididimal, ducto deferente e vasos sanguíneos foram exteriorizados. Os vasos sanguíneos e o ducto deferente foram cauterizados e os testículos e epidídimo removidos. O tecido remanescente foi retornado para o interior do saco escrotal e o procedimento foi repetido para o outro testículo. Em seguida a incisão foi suturada e um swabe de iodo-povidine foi passado no local. Cada camundongo recebeu injeção intramuscular de 60.000U de penicilina G benzatina e penicilina G procaína e foram colocados em gaiolas individuais com livre acesso à água e ração [31].

2.3. Protocolo experimental

Após quatro semanas do procedimento cirúrgico, os animais orquiectomizados e/ou submetidos à cirurgia fictícia foram eutanasiados e amostras de sangue foram retiradas por meio de punção cardíaca para análises bioquímicas, testosterona plasmática e citocinas. Em seguida, foi realizado o isolamento das células peritoneais para determinação da apoptose de macrófagos extração da aorta total para quantificação de deposição lipídica.

2.3.1. Análises bioquímicas

O sangue foi retirado por meio de punção cardíaca em tubos secos, e o plasma separado e mantido a -20°C para as análises bioquímicas. Colesterol total (CT), Colesterol HDL (HDL-C) foram determinados usando Kits comerciais (BIOCLIN, Minas Gerais, Brasil). Colesterol não-HDL (nHDL-C) foi calculado como a diferença entre CT e HDL-C. O nHDL-C representa um índice único de todas as lipoproteínas aterogênicas contendo apoB: LDL, VLDL (Lipoproteína de muito baixa densidade), IDL (Lipoproteína de densidade intermediária) e lipoproteína (a) [32].

2.3.2. Determinação da testosterona plasmática

A dosagem de testosterona foi realizada seguindo as determinações analíticas do método de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) por meio de kit comercial (*In vitro* diagnóstica, Minas Gerais, Brasil) em amostras de plasma dos animais. O procedimento do ELISA foi realizado em duplicatas das amostras e padrões, sendo realizada a média entre as absorbâncias a partir da leitura realizada por meio do analisador automático de ELISA, em comprimento de onda de 450nm.

2.3.3. Avaliação de citocinas pró e anti-inflamatórias

As citocinas interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 10 (IL-10) foram simultaneamente quantificadas com o auxílio do kit comercial *Cytometric Bead Array Mouse* (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) de acordo com Menezes *et al.* [33]. A análise foi realizada no plasma dos animais por citometria de fluxo. Brevemente, 50 μ L da suspensão de partículas de captura (*beads*) foram adicionados aos tubos e agitados e, em seguida, foram adicionados 50 μ L da amostra a ser analisada e também o reagente de detecção de PE. Os tubos foram incubados por 2 horas em temperatura ambiente e protegidos da luz. Decorrido este tempo, em cada tubo foi adicionado 1mL de tampão para lavar o excesso do

fluorocromo ficoeritrina, seguido de centrifugação a 300 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 300 µL de tampão para ser analisado em citômetro de fluxo. Os mesmos procedimentos foram realizados para os controles. As amostras foram analisadas no FACSCanto II com auxílio dos *softwares* FACS Diva e FCAP Array (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Curvas padrão foram realizadas para cada citocina supracitada, utilizando solução do kit. A concentração de cada citocina foi determinada pela interpolação com a curva padrão correspondente e as concentrações foram fornecidas em pg/mL.

As razões entre as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 e a citocina anti-inflamatória IL-10 foram obtidas pela divisão de cada amostra.

2.3.4. Determinação da apoptose em células peritoneais

Camundongos machos LDLr^{-/-} e seus respectivos controles C57BL/6 (*wild type* – WT), orquiectomizados e/ou submetidos a cirurgia fictícia receberam uma injeção intraperitoneal de 1mL de tioglicolato estéril (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 3%, quatro dias antes de sua utilização, posteriormente foram eutanasiados e as células peritoneais foram coletadas por lavagem da cavidade peritoneal, utilizando PBS estéril gelado e recolhido por centrifugação [34]. Para determinação das células apoptóticas foi utilizada marcação com anexina V (FITC) e iodeto de propídeo (PI), seguida de análise em citômetro de fluxo. Dez mil eventos foram registrados a partir de cada amostra e a população de macrófagos foi determinada utilizando parâmetros morfológicos como tamanho e granulosidade. Foram retiradas alíquotas de 200µL de células e estas, centrifugadas por 10 minutos a 300 g. Em seguida, ressuscitadas em 400µL de tampão *Binding Buffer* 10% (10mmol HEPES, NaOH, pH7,4, 140mmol NaCl, 2,5mmol CaCl₂) na concentração de 1x10⁶ células/mL. A seguir, 100µL desta solução (1x10⁵ células) foram transferidos para um novo tubo, onde receberam 2µL de anexina V-FITC e 2µL de PI. As células foram incubadas por 15 minutos, a temperatura ambiente (25°C), na ausência de luz. Para controle positivo foi utilizado H₂O₂. Posteriormente às marcações, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 300 g e por fim, 400µL de PBS com 10% Soro Fetal Bovino foram adicionados a cada tubo e as amostras analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson) equipado com laser de 488nm. Os sinais foram obtidos utilizando filtros de 585nm para PI e 530nm para FITC. Este ensaio determina a proporção de células vivas (anexina V-/PI-); células em estágio inicial de apoptose onde ocorre apenas a exposição da fosfatidilserina (FS) na face externa da membrana plasmática com

consequente marcação com a anexina V (anexina V+/PI-); células em estágio tardio de apoptose ou em necrose onde além da exposição da FS, a membrana plasmática sofre colapso e se torna permeável ao PI fazendo com que a célula possua dupla marcação (anexina V+/PI+); e células danificadas, em necrose (anexina V-/PI+). O resultado é um gráfico de *dot plot* com quadrantes Q1, Q2, Q3, Q4 sendo, Q1: positiva apenas para PI – células com dano (necrose); Q2: Apoptose tardia/necrose (positiva para Anexina e PI); Q3: células viáveis; Q4: apoptose precoce (Positiva para Anexina e negativa para PI). Para cálculo da taxa de apoptose total foram somados quadrantes Q2+Q4. A análise dos dados foi realizada com auxílio do software DIVA e FCS Express Flow Research Edition [35].

2.3.5.Preparação “*en face*”

A aorta foi dissecada livremente desde o ponto inicial da aorta ascendente até a bifurcação ilíaca e armazenada em solução de PBS-formol 10% à 15°C. A completa retirada da camada adventícia foi cuidadosamente realizada no dia seguinte. Em seguida, o corte inicial foi realizado da curvatura aórtica menor e estendido até a bifurcação ilíaca. O segundo corte foi feito simetricamente ao longo da curvatura maior até o nível da artéria subclávia. Durante todo o processo tomou-se o cuidado para não deslocar lesões ateroscleróticas da superfície intimal. A padronização da dissecação é importante para manter intactas as regiões com lesão conforme descrito previamente [36, 37]. Após o corte, as aortas foram presas em superfície de Etil Vinil Acetato (EVA) com pinos de aço para manter sempre o tecido na sua posição plana e horizontal.

2.3.6.Deposição lipídica vascular

As amostras previamente submetidas à preparação “*en face*” foram coradas com *Oil-Red* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para visualização de acúmulos de lipídeos (coloração vermelha). Todas as amostras foram submersas em solução alcoólica com o *Oil-Red* a 0,3% por 10 minutos e em seguida lavadas em uma cuba com água até retirar todo o excesso do corante vermelho. A análise da deposição lipídica foi realizada por meio da intensidade e extensão da coloração vermelha cujas imagens foram adquiridas usando uma câmera digital de alta resolução Canon T5 18-55 (Canon, USA) e posteriormente digitalizadas para análise morfométrica pelo software “Image J” (domínio público-National Institute of Health, USA). Essa análise foi realizada por pesquisador cego para os grupos experimentais.

2.4. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Para análise estatística das variáveis do experimento, as mesmas foram submetidas à análise de variância de uma via (ANOVA). A significância da diferença entre as médias foi determinada por um teste *post hoc* pelo método de *Tukey*, ajustado para múltiplas comparações, com significância aceita acima de 5% ($p < 0,05$). Para análise estatística e apresentação gráfica dos resultados foi empregado o *Prism software* (Prism6, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

3. RESULTADOS

3.1. Análises bioquímicas

A Figura 1 mostra os resultados das análises bioquímicas de CT, HDL-C e nHDL-C nos grupos experimentais. Os animais $LDLr^{-/-}$ apresentaram maior nível de colesterol total quando comparado com os grupos WT e WT Orx. A redução de testosterona não interferiu no perfil de colesterol total nos grupos estudados (WT=114±11; WT Orx=81±6; $LDLr^{-/-}$ =174±14; $LDLr^{-/-}$ Orx=203±15 mg/dL) (Figura 1A). De forma semelhante, o nível de nHDL-C apresentou-se maior nos grupos $LDLr^{-/-}$ e $LDLr^{-/-}$ Orx em comparação com os grupos WT e WT Orx e a redução de testosterona também não exerceu influência entre seus controles (WT= 86±12; WT Orx= 60±7; $LDLr^{-/-}$ = 148±13; $LDLr^{-/-}$ Orx= 156±6 mg/dL) (Figura 1B). A concentração sérica de HDL-C não apresentou diferença entre todos os grupos estudados (WT=28±2; WT Orx=23±1; $LDLr^{-/-}$ = 26±0,8; $LDLr^{-/-}$ Orx= 29±2 mg/dL) (Figura 1C).

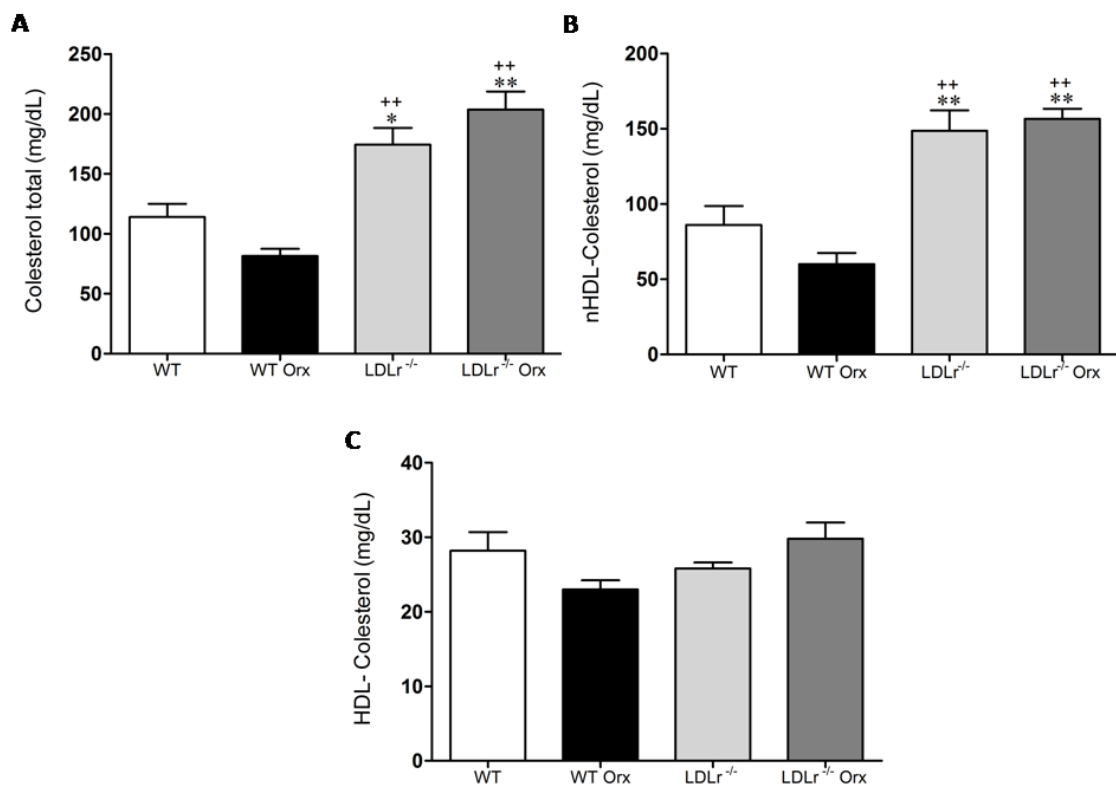


Figura 1. Análises bioquímicas. Gráficos de barras mostrando o parâmetro de colesterol total (A), nHDL-C (B) e HDL-C (C) de camundongos *knockout* para receptor

de LDL ($LDLr^{-/-}$) e C57BL/6 (*wild type*– WT) orquiectomizados (Orx) e não orquiectomizados. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo WT; ++ $p < 0,01$ em relação ao grupo WT Orx.

3.2. Testosterona plasmática

Houve diminuição nos níveis de testosterona em ambos os grupos orquiectomizados em comparação com os controles, confirmando a efetividade do procedimento cirúrgico, como pode ser observado na Figura 2 (WT= $5,9 \pm 0,9$; WT Orx= $0,4 \pm 0,05$; $LDLr^{-/-}$ = $5,7 \pm 1,4$; $LDLr^{-/-}$ Orx= $0,5 \pm 0,04$ ng/mL).

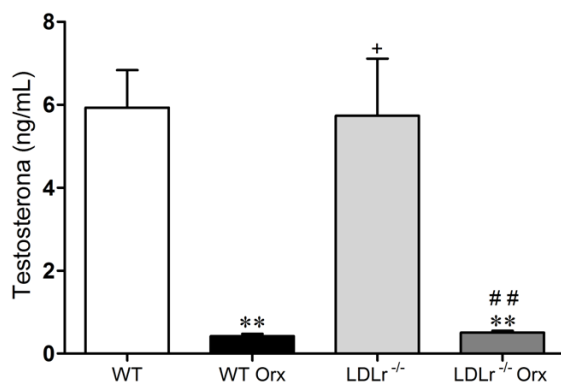


Figura 2. Concentração de testosterona. Gráficos de barras mostrando a concentração de testosterona de camundongos *knockout* para receptor de LDL ($LDLr^{-/-}$) e C57BL/6 (*wild type*– WT) orquiectomizados (Orx) e não orquiectomizados. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo WT; + $p < 0,05$ em relação ao grupo WT Orx e ## $p < 0,01$ em relação ao grupo $LDLr^{-/-}$.

3.3. Análises de citocinas pró e anti-inflamatórias

O perfil das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e citocina anti-inflamatória IL-10 é mostrado na Figura 3. Não houve diferença nos níveis de IL-6 nos grupos estudados (WT= 152 ± 13 ; WT Orx= 119 ± 12 ; $LDLr^{-/-}$ = 158 ± 18 ; $LDLr^{-/-}$ Orx= 127 ± 5 pg/mL) (Figura 3A), assim como nos níveis de TNF- α (WT= 466 ± 18 ; WT Orx= 415 ± 7 ; $LDLr^{-/-}$ = 480 ± 23 ; $LDLr^{-/-}$ Orx= 411 ± 10 pg/mL) (Figura 3B). Em relação a IL-10, houve diminuição nos níveis dessa citocina anti-inflamatória nos animais

orquiectomizados em comparação com os controles (WT= 387±26; WT Orx= 174±6; LDLr^{-/-}= 433±56; LDLr^{-/-} Orx= 145±7 pg/mL) (Figura 3C).

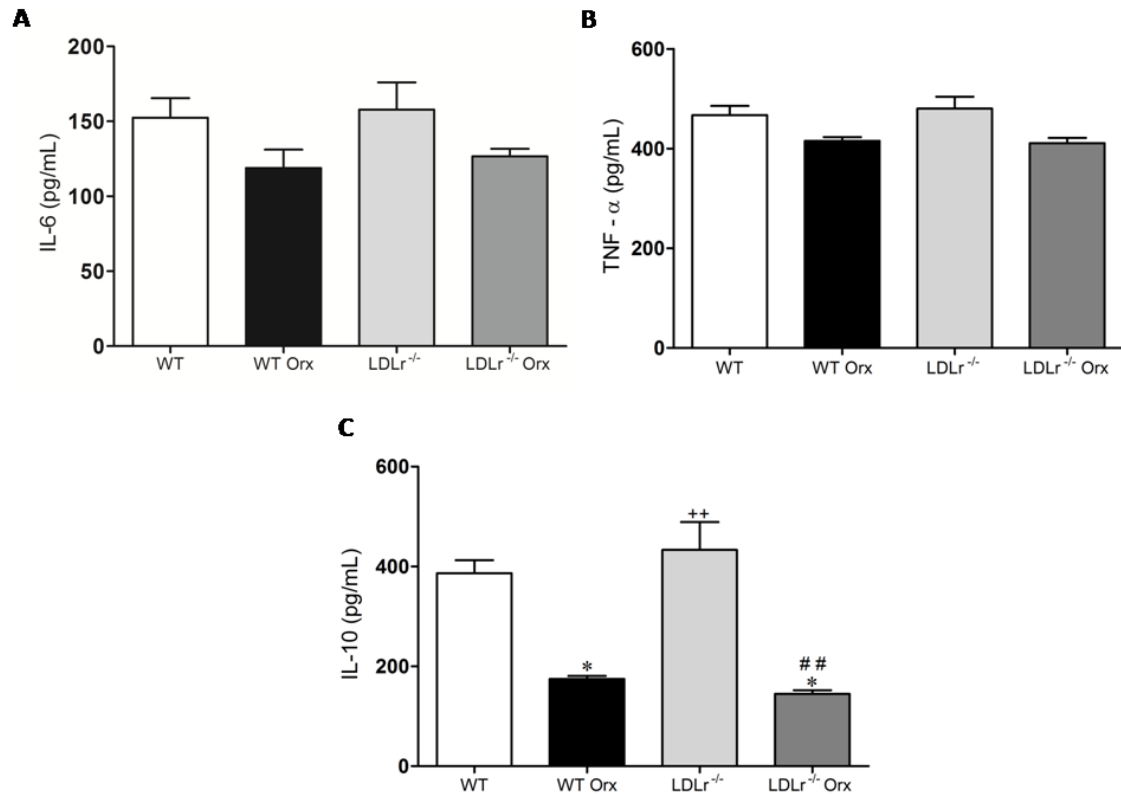


Figura 3. Concentração de IL-6, TNF- α e IL-10. Gráficos de barras mostrando a concentração de IL-6 (A), TNF- α (B) e IL-10 (C) no plasma de camundongos *knockout* para receptor de LDL (LDLr^{-/-}) e controles C57BL/6 (*wild type*– WT) orquiectomizados (Orx) e não orquiectomizados. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. **p<0,01 em relação ao grupo WT; ++p<0,01 em relação ao grupo WT Orx e ###p<0,01 em relação ao grupo LDLr^{-/-}.

A Figura 4 mostra as razões entre as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 e a citocina anti-inflamatória IL-10, ambas envolvidas na patogênese da aterosclerose. Podemos observar aumento significativo da razão TNF- α /IL-10 em ambos os grupos com redução de testosterona quando comparados aos seus controles (WT= 1,3±0,09; WT Orx= 2,4±0,09; LDLr^{-/-}= 1,6±0,2; LDLr^{-/-} Orx= 2,93±0,14 pg/mL) (Figura 4A). De maneira semelhante, a razão IL-6/IL-10, também apresentou aumento nos grupos orquiectomizados como pode ser observado na Figura 4B (WT= 0,4±0,04; WT Orx= 0,7±0,03; LDLr^{-/-}= 0,5±0,06; LDLr^{-/-} Orx= 0,8±0,04 pg/mL).

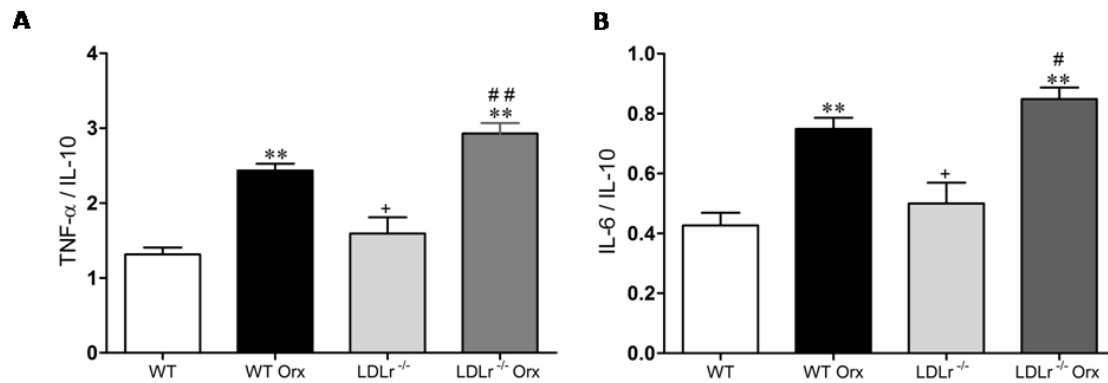


Figura 4. Razão TNF- α /IL-10 e IL-6/IL-10. Gráfico de barras mostrando a relação TNF- α /IL-10 (A) e a relação IL-6/IL-10 (B) no plasma de camundongos *knockout* para receptor de LDL (LDLr^{-/-}) e C57BL/6 (*wild type*– WT) orquiectomizados (Orx) e não orquiectomizados. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. **p<0,01 em relação ao grupo WT; ++p<0,01 em relação ao grupo WT Orx e ##p<0,01 em relação ao grupo LDLr^{-/-}.

3.4. Determinação de apoptose em células peritoneais

A análise por citometria de fluxo para determinação das células apoptóticas com marcação de anexina V (FITC) e iodeto de propídeo (PI), mostra que a redução de testosterona promoveu diminuição no número (percentual) de células apoptóticas nos grupos WT Orx (0,98 \pm 0,17%) e LDLr^{-/-} Orx (1,4 \pm 0,7%), comparados com os grupos WT e LDLr^{-/-} (6 \pm 0,15 e 4,3 \pm 0,3%, respectivamente) (Figura 5).

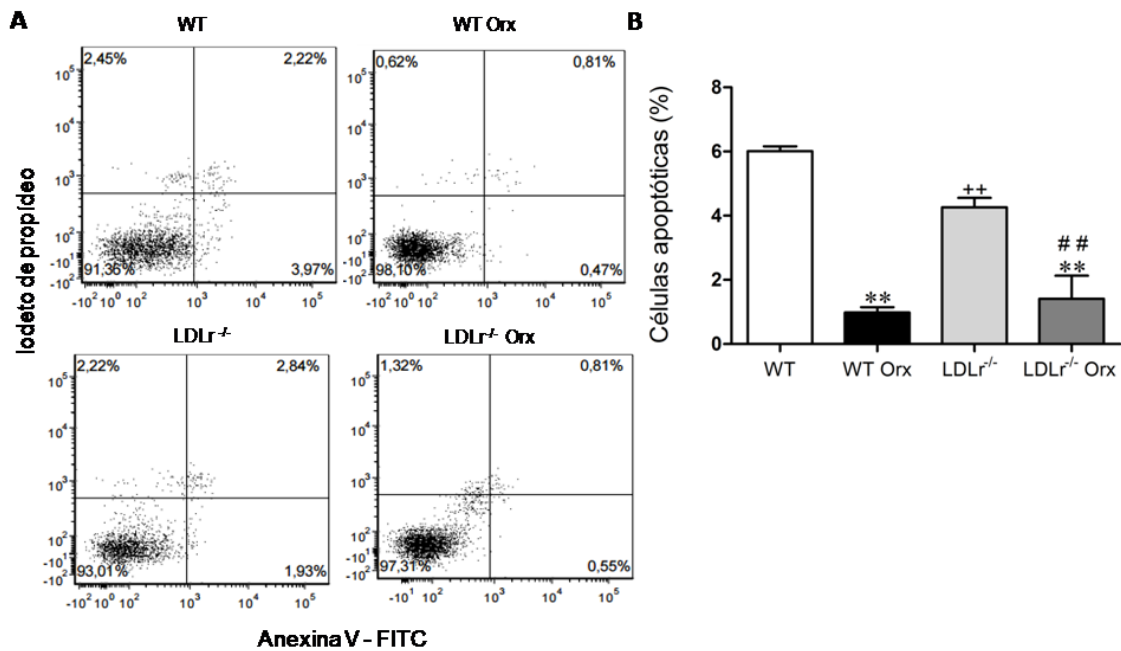


Figura 5. Análise de apoptose por citometria de fluxo. Gráficos de *dot plots* típicos comparando a apoptose em camundongos WT e WT Orx (A) e (B) entre LDLr^{-/-} e LDLr^{-/-} Orx utilizando anexina V (FITC) e iodeto de propídeo (PI). Q1 representa células com dano-necrose (positiva apenas para PI); Q2: Apoptose tardia/necrose (positiva para Anexina e PI); Q3: células viáveis; Q4: apoptose precoce (Positiva para Anexina e negativa para PI). (C) Gráfico de barras mostrando a percentagem média de células apoptóticas (Q2 + Q4). Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. **p<0,01 em relação ao grupo WT; ++p<0,01 em relação ao grupo WT Orx e ##p<0,01 em relação ao grupo LDLr^{-/-}.

3.5. Análise de deposição lipídica vascular

A Figura 6 mostra que a redução de testosterona promoveu maior deposição lipídica em comparação com os grupos controles (WT= 4,25±0,2; WT Orx= 8,4±0,4; LDLr^{-/-} = 9,6±1,1;LDLr^{-/-}Orx= 15,8±2 %). Adicionalmente, maior deposição lipídica em animais LDLr^{-/-} quando comparado ao grupo WT.

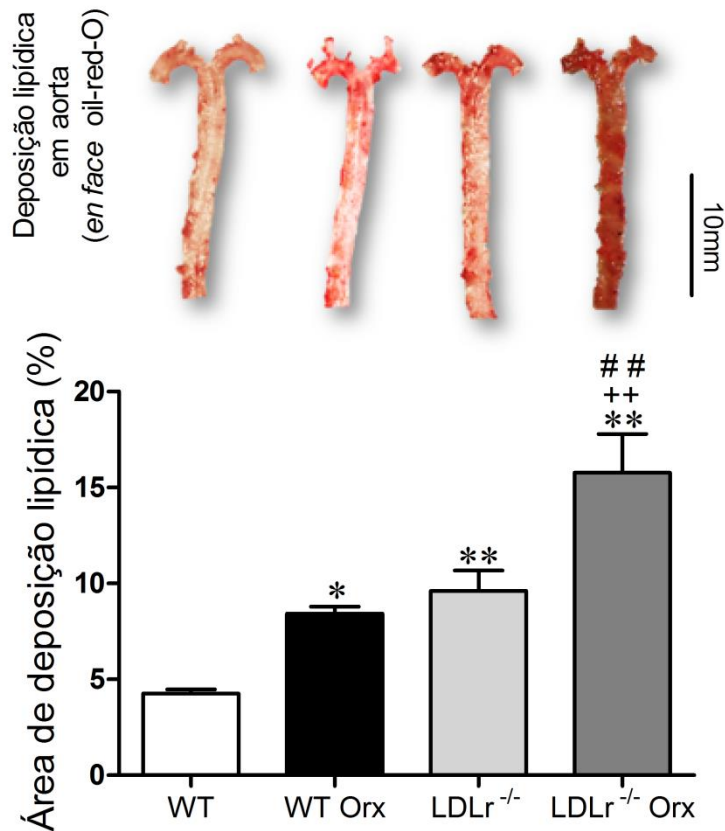


Figura 6. Análise da deposição lipídica. Painel superior: corte representativo de cada grupo experimental demonstrando a deposição lipídica avaliada pela coloração com *Oil-Red-O*. Painel inferior: gráficos de barras mostrando a porcentagem da área de deposição lipídica em aortas de camundongos *knockout* para receptor de LDL (LDLr^{-/-}) e C57BL/6 (*wild type*– WT) orquiectomizados (Orx) e não orquiectomizados. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. *p<0,05 e **p<0,01 em relação ao grupo WT; ++p<0,01 em relação ao grupo WT Orx e ##p<0,01 em relação ao grupo LDLr^{-/-}.

4. DISCUSSÃO

Os dados do presente estudo demonstram pela primeira vez a influência da redução de testosterona na aterosclerose precoce em camundongos machos LDLr^{-/-} jovens e sem dieta aterogênica. Foi observado desequilíbrio de citocinas pró e anti-inflamatórias com redução nos níveis de IL-10 e diminuição na apoptose de macrófagos peritoneais concomitantemente com o aumento de deposição lipídica, sem alteração no perfil lipídico dos animais.

Embora a influência dos andrógenos com a patogênese da aterosclerose tenha sido alvo de diversas investigações clínicas [38, 39, 40] e experimentais [11, 41,42], os resultados apresentam-se ainda controversos no que diz respeito à participação dos andrógenos no desenvolvimento da aterosclerose [43, 44, 45, 46]. Além disso, Traish *et al.* [47] revelam a ligação entre deficiência de andrógenos e alterações no perfil lipídico, que favorecem o estresse oxidativo, disfunção endotelial e aumento da produção de fatores pró-inflamatórios, culminando no processo aterosclerótico.

Bourghardt *et al.* [11] sugerem que os efeitos sobre o perfil lipídico não são pré-requisito para a ação antiaterogênica da testosterona em camundongos LDLr^{-/-}. Nathan *et al.* [48] demonstraram que animais LDLr^{-/-} submetidos a orquiectomia não apresentaram diferença nos níveis de colesterol total, nem nos triglicerídeos, entretanto, os níveis de HDL foram diminuídos. Em nosso estudo não foi observado alteração no perfil lipídico entre os grupos orquiectomizados e seus controles, desse modo a dieta ocidental utilizada por oito semanas por Nathan *et al.* [48] pode ser responsável pela redução nos níveis de HDL. Além disso, vale ressaltar que a redução da testosterona no aumento do desenvolvimento da placa parece ser mais importante que a alteração no perfil lipídico, visto que o padrão de lesão após a orquiectomia foi semelhante tanto nos animais WT quanto nos LDLr^{-/-}.

Apesar do perfil lipídico não ter alterado, nossos dados mostram que a redução nos níveis de testosterona pode ser capaz de aumentar a deposição lipídica, contribuindo assim, para formação da placa aterosclerótica e conseqüentemente para o desenvolvimento da doença. Nossos dados corroboram os de Hatch *et al.* [49] que mostram aumento de placa em animais LDLr^{-/-} com redução de testosterona, no entanto, expostos a dieta rica em gordura, diferentemente do presente trabalho. O modelo LDLr^{-/-} apresenta nível de colesterol plasmático ligeiramente aumentado

quando comparado com animais de tipo selvagem e desenvolvem aterosclerose lentamente sob dieta normal [50], assim demonstramos pela primeira vez, que em um período de um mês a retirada desse hormônio é tão significativo no desenvolvimento da placa quanto a dieta rica em colesterol.

Ainda que alguns pesquisadores associem a aterosclerose apenas a desordens metabólicas, no decorrer dos últimos anos ela tem sido associada a distúrbios inflamatórios em função de sua complexidade [51, 52].

As citocinas denominadas pró-inflamatórias promovem o desenvolvimento da lesão, entre elas estão o TNF- α e a IL-6 [53], ambos são produzidos principalmente por macrófagos [54]. O TNF- α está relacionado na promoção da transmigração de leucócitos [24], de forma a contribuir com a progressão da lesão. A IL-6 por sua vez, tem sido apontada por alguns autores como uma citocina de caráter dual [24, 54], estando envolvida na disfunção endotelial, na transição de macrófagos para células espumosas e também na resposta de fase aguda da inflamação [23, 53, 55].

Em contraste, algumas citocinas suprimem a resposta inflamatória, como a IL-10 que também é secretada pelos macrófagos e considerada ateroprotetora [13, 54]. Adicionalmente, dados da literatura mostram que as vias de sinalização pró-inflamatórias têm a capacidade de induzir em paralelo à expressão de mediadores anti-inflamatórios, tais como a IL-10, e que o equilíbrio entre elas é crucial para determinar o desenvolvimento da lesão [54, 56].

Assim, foi investigado se marcadores clássicos como citocinas IL-6 e TNF- α e IL-10 envolvidas no processo aterosclerótico podem ser moduladas pela testosterona, visto que, estudos *in vitro* atribuem à testosterona efeito imunomodulador e destacam potenciais benefícios de sua terapia, sugerindo que ela pode suprimir a expressão de citocinas pró-inflamatórias e estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias, especialmente a IL-10 [57, 58]. Liva *et al.* [59] observaram que a testosterona pode atuar diretamente em linfócitos TCD4+ para aumentar a produção de IL-10 e verificaram que macrófagos expressam receptor androgênico, não excluindo a possibilidade da ação direta da testosterona nessas células. Além disso, tem sido proposto que o desequilíbrio entre IL-10 e TNF- α desempenha um papel importante em lesões ateroscleróticas [60, 61, 62].

Em nosso trabalho, as citocinas pró-inflamatórias não apresentaram diferenças entre os grupos, entretanto, a redução da testosterona mostrou relação negativa sobre os níveis de IL-10. Adicionalmente, observamos aumento entre as razões TNF- α /IL-10 e IL-6/IL-10. Nossos resultados sugerem, por meio do

desequilíbrio observado entre as citocinas próe anti inflamatórias, que a redução de testosterona pode promover aumento de resposta Th1 e favorecer o desenvolvimento de placa aterosclerótica. E diante da resposta inflamatória observada, nos propusemos a investigar a viabilidade de macrófagos, células cruciais para o desenvolvimento das placas.

A apoptose de macrófagos em nosso estudo foi avaliada por meio do isolamento de células peritoneais de camundongos. Zhang *et al.* [63] demonstraram que dentre as células no peritônio de animais estimulados com tioglicolato, cerca de 70% são macrófagos. Muitos estudos utilizam células peritoneais para avaliação das modulações moleculares envolvidas com o desenvolvimento da lesão aterosclerótica [64, 65, 66].

Nossos dados revelam que animais com redução de testosterona, apresentaram menor porcentagem de apoptose de macrófagos, simultaneamente, com maior deposição lipídica. O desenvolvimento da placa parece ter relação paradoxal com a apoptose dependendo da fase da lesão [29]. Na fase inicial a progressão da lesão parece estar intimamente ligada aos macrófagos vivos, visto que muitos macrófagos, responsáveis pela fagocitose de lipídios oxidados e restos celulares, sofrem apoptose na fase inicial da lesão, por isso o aumento da apoptose nesse estágio tem consequências antiaterogênicas [21, 27]. Isso pode explicar nossos dados, visto que segundo Gautier *et al.* [28] a lesão em 5 semanas é considerada precoce e a de 15 semanas avançada, assim, a lesão observada no presente estudo é dita precoce, uma vez que foi avaliada em um período de quatro semanas e sem dieta aterogênica.

Adicionalmente, Jin *et al.* [67], verificaram que a testosterona é capaz de induzir apoptose em macrófagos derivados da medula óssea. Nossos resultados confirmam dados reportados previamente por Lammers *et al.* [29], onde observaram que a redução na formação da lesão aterosclerótica coincidiu com aumento da apoptose em camundongos LDLr^{-/-}, entretanto, esses animais foram submetidos a dieta ocidental por 9 semanas sem avaliação hormonal, diferentemente desse estudo.

Diversos mecanismos são atribuídos ao efeito ateroprotetor da testosterona, por exemplo, alguns autores sugerem modificações no perfil lipídico [57] e inflamatório [68], participação da enzima aromatase [69] e receptor de andrógeno [70] dentre outros. Em revisão, Vasconsuelo *et al.* [71] evidenciam que hormônios esteroides sexuais promovem suas ações por meio da apoptose, que é um evento celular importante. Além disso, mostram o efeito dual da testosterona, que pode

induzir tanto efeitos apoptóticos como anti apoptóticos, dependendo do tipo celular, concentração hormonal e ambiente celular, isso por diferentes vias de sinalização.

Assim, podemos sugerir que após a indução com tioglicolato, macrófagos foram mobilizados da circulação para meio intraperitoneal, os quais possivelmente refletem a quantidade de monócitos em estado de patrulha nos animais orquiectomizados. Portanto, tais macrófagos peritoneais podem estar em plena atividade inflamatória, mantendo assim, a resposta Th1 e podendo contribuir para a progressão da placa, independente de alterações lipídicas.

Diante do exposto, nossos resultados fornecem evidências do papel ateroprotetor e imunomodulador da testosterona em lesão aterosclerótica precoce em camundongos LDLr^{-/-}, por meio da regulação da resposta inflamatória e da participação da apoptose de macrófagos, suportando um possível mecanismo para o aumento da incidência de doenças cardiovasculares em homens com baixos níveis desse hormônio, entretanto mais investigações são necessárias para melhor elucidar estes mecanismos.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradecemos o apoio recebido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

REFERÊNCIAS

- [1] World Health Organization (WHO) Global status report on noncommunicable diseases 2014. 2014. pp. 1–302. Available at: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>. ISBN: 978 92 4 156485 4 (accessed 05.06.2016).
- [2] Ohlsson C, Barrett-Connor E, Bhasin S, Orwoll E, Labrie F, Karlsson MK, Ljunggren O, Vandenput L, Mellström D, Tivesten A. High serum testosterone is associated with reduced risk of cardiovascular events in elderly men. The MrOS (Osteoporotic Fractures in Men) study in Sweden. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(16):1674-81.
- [3] Haring R, Völzke H, Steveling A, Krebs A, Felix SB, Schöfl C, Dörr M, Nauck M, Wallaschofski H. Low serum testosterone levels are associated with increased risk of mortality in a population-based cohort of men aged 20-79. *Eur Heart J*. 2010;31(12):1494-501
- [4] Hu JC, Williams SB, O'Malley AJ, Smith MR, Nguyen PL, Keating NL. Androgen-deprivation therapy for nonmetastatic prostate cancer is associated with an increased risk of peripheral arterial disease and venous thromboembolism. *Eur Urol*. 2012; 61(6):1119-28.
- [5] Gandaglia G, Sun M, Popa I, Schiffmann J, Abdollah F, Trinh QD, Saad F, Graefen M, Briganti A, Montorsi F, Karakiewicz PI. The impact of androgen-deprivation therapy (ADT) on the risk of cardiovascular (CV) events in patients with non-metastatic prostate cancer: a population-based study. *BJU Int*. 2014; 114(6b):E82-9.
- [6] Shores MM, Smith NL, Forsberg CW, Anawalt BD, Matsumoto AM. Testosterone treatment and mortality in men with low testosterone levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(6):2050-8.
- [7] Wallis CJ, Lo K, Lee Y, Krakowsky Y, Garbens A, Satkunasivam R, Herschorn S, Kodama RT, Cheung P, Narod SA, Nam RK. Survival and cardiovascular events in

men treated with testosterone replacement therapy: an intention-to-treat observational cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4(6):498-506.

[8] Usman A, Ribatti D, Sadat U, Gillard JH. From Lipid Retention to Immune-Mediated Inflammation and Associated Angiogenesis in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2015; 22(8):739-49.

[9] Liu PY, Death AK, Handelsman DJ. Androgens and cardiovascular disease. *Endocr Rev.* 2003; 24(3):313-40.

[10] Wu FC, von Eckardstein A. Androgens and coronary artery disease. *Endocr Rev.* 2003; 24(2):183-217.

[11] Bourghardt J, Wilhelmson AS, Alexanderson C, De Gendt K, Verhoeven G, Krettek A, Ohlsson C, Tivesten A. Androgen receptor-dependent and independent atheroprotection by testosterone in male mice. *Endocrinology.* 2010; 151(11):5428-37.

[12] Kelly DM, Jones TH. Testosterone: a vascular hormone in health and disease. *J Endocrinol.* 2013; 217(3):R47-71.

[13] Zuo P, Zhou Q, Zuo Z, Wang X, Chen L, Ma G. Effects of the factor X inhibitor, fondaparinux, on the stability of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circ J.* 2015;79(11):2499-508.

[14] Taghavi-Moghadam PL, Butcher MJ, Galkina EV. The dynamic lives of macrophage and dendritic cell subsets in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1319(1):19-37.

[15] Rojas J, Salazar J, Martínez MS, Palmar J, Bautista J, Chávez-Castillo M, Gómez A, Bermúdez V. Macrophage Heterogeneity and Plasticity: Impact of Macrophage Biomarkers on Atherosclerosis. *Scientifica.* 2015; (2015):851252-17.

[16] Frostegård J, Ulfgrén AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques:

dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. 1999; 145(1):33-43.

[17] Muraille E, Leo O, Moser M. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Front Immunol*. 2014; 603 (5):1.

[18] Ilhan F, Kalkanli ST. Atherosclerosis and the role of immune cells. *World J Clin Cases*. 2015; 3(4):345-52.

[19] Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol*. 2009; (27):165-97.

[20] Libby P, Lichtman AH, Hansson GK. Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans. *Immunity*. 2013; 38(6):1092-104.

[21] Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *ArteriosclerThrombVasc Biol*. 2011; 31(7):1506-16.

[22] Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis - A matter of unresolved inflammation. *Semin Immunol*. 2015; 27(3):184-93.

[23] Khan R, Spagnoli V, Tardif JC, L'Allier PL. Novel anti-inflammatory therapies for the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2015; 240(2):497-509.

[24] Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *ArteriosclerThrombVasc Biol*. 2011; 31(5):969-79.

[25] Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13(10):709-21.

[26] Tabas I. Apoptosis and efferocytosis in mouse models of atherosclerosis. *Curr Drug Targets*. 2007;8(12):1288-96.

- [27] Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *ArteriosclerThrombVasc Biol.* 2005;25(11):2255-64.
- [28] Gautier EL, Huby T, Witztum JL, Ouzilleau B, Miller ER, Saint-Charles F, Aucouturier P, Chapman MJ, Lesnik P. Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage. *Circulation.* 2009;119(13):1795-804.
- [29] Lammers B, Chandak PG, Aflaki E, Van Puijvelde GH, Radovic B, Hildebrand RB, Meurs I, Out R, Kuiper J, Van Berkel TJ, Kolb D, Haemmerle G, Zechner R, Levak-Frank S, Van Eck M, Kratky D. Macrophage adipose triglyceride lipase deficiency attenuates atherosclerotic lesion development in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *ArteriosclerThrombVasc Biol.* 2011;31(1):67-73.
- [30] Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, de Vries-Van der Weij J, van der Hoorn J, Princen HM, Kooistra T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *ArteriosclerThrombVasc Biol.* 2007; 27(8):1706-1721.
- [31] Zhang J, Pugh TD, Stebler B, Ershler WB, Keller ET. Orchiectomy increases bone marrow interleukin-6 levels in mice. *Calcif Tissue Int.* 1998; 62(3):219-26.
- [32] Daleprane JB, Freitas Vda S, Pacheco A, Rudnicki M, Faine LA, Dörr FA, Ikegaki M, Salazar LA, Ong TP, Abdalla DS. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. *J Nutr Biochem.* 2012; 23(6):557-66.
- [33] Menezes TN, Carnielli JB, Gomes HL, Pereira FE, Lemos, EM, Bissoli, NS, Lopes-Ferreira M, Andrich F, Figueiredo SG. Local inflammatory response induced by scorpionfish *Scorpaenaplumieri* venom in mice. *Toxicon.* 2012; 60 (1):4-11.
- [34] Pedrosa AM, Faine LA, Grosso DM, de Las Heras B, Boscá L, Abdalla DS. Electronegative LDL induction of apoptosis in macrophages: involvement of Nrf2. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1801(4):430-7.

[35] Tonini CL, Campagnaro BP, Louro LP, Pereira TM, Vasquez EC, Meyrelles SS. Effects of Aging and Hypercholesterolemia on Oxidative Stress and DNA Damage in Bone Marrow Mononuclear Cells in Apolipoprotein E-deficient Mice. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(2):3325-42.

[36] Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*. 1987; 68(3):231-40.

[37] Xu Q. *A Handbook of Mouse Models of Cardiovascular Disease*. 2006. 5:53-66, ISBN: 978-0-470-01610-7.

[38] Svartberg J, von Mühlen D, Mathiesen E, Joakimsen O, Børnaa KH, Stensland-Bugge E. Low testosterone levels are associated with carotid atherosclerosis in men. *J Intern Med*. 2006; 259(6):576-82.

[39] Mäkinen JI, Perheentupa A, Irjala K, Pöllänen P, Mäkinen J, Huhtaniemi I, Raitakari OT. Endogenous testosterone and serum lipids in middle-aged men. *Atherosclerosis*. 2008; 197(2):688-93.

[40] Khazai B, Golden SH, Colangelo LA, Swerdloff R, Wang C, Honoris L, Gapstur SM, Ouyang P, Cushman M, Li D, Kopp P, Vaidya D, Liu K, Dobs A, Budoff M. Association of endogenous testosterone with subclinical atherosclerosis in men: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016; 84(5):700-7.

[41] Barud W, Palusiński R, Bełtowski J, Wójcicka G. Inverse relationship between total testosterone and anti-oxidized low density lipoprotein antibody levels in ageing males. *Atherosclerosis*. 2002; 164(2):283-8.

[42] Huang CK, Pang H, Wang L, Niu Y, Luo J, Chang E, Sparks JD, Lee SO, Chang C. New therapy via targeting androgen receptor in monocytes/macrophages to battle atherosclerosis. *Hypertension*. 2014; 63(6):1345-53.

[43] von Dehn G, von Dehn O, Völker W, Langer C, Weinbauer GF, Behre HM, Nieschlag E, Assmann G, von Eckardstein A. Atherosclerosis in apolipoprotein E-

deficient mice is decreased by the suppression of endogenous sex hormones. *HormMetab Res.* 2001; 33(2):110-4.

[44] Ng MK, Quinn CM, McCrohon JA, Nakhla S, Jessup W, Handelsman DJ, Celermajer DS, Death AK. Androgens up-regulate atherosclerosis-related genes in macrophages from males but not females: molecular insights into gender differences in atherosclerosis. *J Am CollCardiol.* 2003; 42(7):1306-13.

[45] Kalyani RR, Dobs AS. Androgen deficiency, diabetes, and the metabolic syndrome in men. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2007; 14(3):226-34.

[46] Kapoor D, Jones TH. Androgen deficiency as a predictor of metabolic syndrome in aging men: an opportunity for intervention? *Drugs Aging.* 2008; 25(5):357-69.

[47] Traish AM, Abdou R, Kypreos KE. Androgen deficiency and atherosclerosis: The lipid link. *Vascul Pharmacol.* 2009; 51(5-6):303-13.

[48] Nathan L, Shi W, Dinh H, Mukherjee TK, Wang X, Lusis AJ, Chaudhuri G. Testosterone inhibits early atherogenesis by conversion to estradiol: critical role of aromatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(6):3589-93.

[49] Hatch NW, Srodulski SJ, Chan HW, Zhang X, Tannock LR, King VL. Endogenous androgen deficiency enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Gend Med.* 2012; 9(5):319-28.

[50] Merat S, Fruebis J, Sutphin M, Silvestre M, Reaven PD. Effect of aging on aortic expression of the vascular cell adhesion molecule-1 and atherosclerosis in murine models of atherosclerosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2000; 55(2):B85-94.

[51] Bogachev O, Majdalawieh A, Pan X, Zhang L, Ro HS. Adipocyte enhancer-binding protein 1 (AEBP1) (a novel macrophage proinflammatory mediator) overexpression promotes and ablation attenuates atherosclerosis in ApoE^(-/-) and LDLR^(-/-) mice. *Mol Med.* 2011; 17(9-10):1056-64.

[52] Randolph GJ. Mechanisms that regulate macrophage burden in atherosclerosis. *Circ Res.* 2014; 114(11):1757-71.

- [53] Harman SM. Menopausal hormone treatment cardiovascular disease: another look at an unresolved conundrum. *FertilSteril*. 2014;101(4):887-97.
- [54] Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res*. 2008;79(3):360-76.
- [55] Keidar S, Heinrich R, Kaplan M, Hayek T, Aviram M. Angiotensin II administration to atherosclerotic mice increases macrophage uptake of oxidized LDL: a possible role for interleukin-6. *ArteriosclerThrombVasc Biol*. 2001;21(9):1464-9.
- [56] Lawrence T, Gilroy DW. Chronic inflammation: a failure of resolution? *IntJExpPathol*. 2007;88(2):85-94.
- [57] Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, Kapoor D, Channer KS, Jones TH. The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men. *J ClinEndocrinol Metab*. 2004; 89(7):3313-8.
- [58] Jones TH, Saad F. The effects of testosterone on risk factors for, and the mediators of, the atherosclerotic process. *Atherosclerosis*. 2009; 207(2):318-27.
- [59] Liva SM, Voskuhl RR. Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production. *J Immunol*. 2001; 167(4):2060-7.
- [60] Mallat Z, Heymes C, Ohan J, Faggini E, Leseche G, and Tedgui A. Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *ArteriosclerThrombVasc Biol*. 1999; 19(3):611-6.
- [61] Mazzone A, De Servi S, Vezzoli M, Fossati G, Mazzucchelli I, Gritti D, Ottini E, Mussini A, and Specchia G. Plasma levels of interleukin 2, 6, 10 and phenotypic characterization of circulating T lymphocytes in ischemic heart disease. *Atherosclerosis*. 1999; 145 (2): 369–374.

[62] Waehre T, Halvorsen B, Damas JK, Yndestad A, Brosstad F, Gullestad L, Kjekshus J, Froland SS, and Aukrust P. Inflammatory imbalance between IL-10 and TNF α in unstable angina: potential plaque stabilizing effects of IL-10. *Eur J Clin Invest.* 2002; 32 (11): 803–810.

[63] Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol.* 2008; Chapter 14:Unit 14.1.

[64] Liu M, Zhang W, Li X, Han J, Chen Y, Duan Y. Impact of age and sex on the development of atherosclerosis and expression of the related genes in apoE deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016, 469(3):456-62.

[65] Hasegawa H, Watanabe T, Kato S, Toshima T, Yokoyama M, Aida Y, Nishiwaki M, Kadowaki S, Narumi T, Honda Y, Otaki Y, Honda S, Shunsuke N, Funayama A, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Shishido T, Miyamoto T, Abe S, Shibata Y, Kubota I. The role of macrophage transcription factor MafB in atherosclerotic plaque stability. *Atherosclerosis.* 2016; 250(2016):133-143.

[66] Machado RM, Nakandakare ER, Quintao EC, Cazita PM, Koike MK, Nunes VS, Ferreira FD, Afonso MS, Bombo RP, Machado-Lima A, Soriano FG, Catanozi S, Lottenberg AM. Omega-6 polyunsaturated fatty acids prevent atherosclerosis development in LDLr-KO mice, in spite of displaying a pro-inflammatory profile similar to trans fatty acids. *Atherosclerosis.* 2012; 224(1):66-74.

[67] Jin L, Ai X, Liu L, Wang Z, Cheng Y, Qiao Z. Testosterone induces apoptosis via Fas/FasL-dependent pathway in bone marrow-derived macrophages. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2006; 28(5):283-93.

[68] Li S, Li X, Li Y. Regulation of atherosclerotic plaque growth and stability by testosterone and its receptor via influence of inflammatory reaction. *Vascul Pharmacol.* 2008; 49(1):14-8.

[69] Nettleship JE, Jones TH, Channer KS, Jones RD. Physiological testosterone replacement therapy attenuates fatty streak formation and improves high-

densitylipoprotein cholesterol in the Tfm mouse: an effect that is independent of the classic androgen receptor. *Circulation*. 2007;116(21):2427-34.

[70] Qiu Y, Yanase T, Hu H, Tanaka T, Nishi Y, Liu M, Sueishi K, Sawamura T, Nawata H. Dihydrotestosterone suppresses foam cell formation and attenuates atherosclerosis development. *Endocrinology*. 2010;151(7):3307-16.

[71] Vasconsuelo A, Pronsato L, Ronda AC, Boland R, Milanesi L. Role of 17 β -estradiol and testosterone in apoptosis. *Steroids*. 2011;76(12):1223-31.

ANEXO

Ethical Guidelines to Publication of Steroids

Types of paper: Significant original research papers and pertinent reviews on all aspects of steroids will be considered for publication. Specifically, both experimental and theoretical studies dealing with the following areas of investigation are welcome: chemistry and physiochemistry; biosynthesis; metabolism; molecular biology; physiology; pharmacology; analytical techniques; comparative endocrinology; clinical research; mode of action (including that of related peptides); and the role of steroids on growth and differentiation. Relevant compounds also include non-steroidal analogs that are inhibitors or activators of steroid biosynthetic enzymes or ligands for steroid hormone receptors. Letters to the editor are welcome, for editing and publication at the discretion of the editor. Rapid Communications will be considered if material is of unusual interest and particularly timely.

Publication of Articles Describing the Isolation and Identification of New Steroids or the Synthesis of New Steroids or Steroid Derivatives: Articles reporting solely the isolation and identification of previously unknown steroids are not necessarily suitable for publication in *Steroids*. Among the considerations used by editors and reviewers in evaluating the significance of such manuscripts are the types of structural variations compared to known steroids, the isolation source, and the experimental methods used in structure determination. Similarly, for articles describing only the synthesis of new steroids or steroid derivatives, important considerations will be the novelty of the approach or reactions used for the preparation, and the structural novelty of the new synthetic products. With both isolated and newly synthesized compounds, additional consideration will be given to their biochemical and/or biological activities as well as the potential utility of the structural characterization and bioactivity data to other researchers. Authors should comment upon these matters in the Highlights, Abstract, Introduction, and/or Conclusions. All articles will be evaluated for appropriate English language usage, and the quality of the figures.

Ethics in Publishing: For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>. When experimental animals are used, the materials and methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort, and that the experiments were conducted in accordance with international standards on animal welfare as well as being compliant with local and national regulations. Studies are expected to be compliant with minimal standards as defined by the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) http://europa.eu.int/comm/food/fs/aw/aw_legislation/scientific/86-609-eeec_en.PDF and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of

Laboratory. Animals <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/> Full details of any anesthetic or analgesic dose and treatment must be given.

Declaration of interest: All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. More information.

Submission declaration and verification : Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

Authorship: All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship: Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service: This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

Copyright: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases. For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights: As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing: Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source: You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies: Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy: As a service to our authors, Elsevier will deposit to PubMed Central (PMC) author manuscripts on behalf of Elsevier authors reporting NIH funded research. This service is a continuation of Elsevier's 2005 agreement with the NIH when the NIH introduced their voluntary 'Public Access Policy.' The service will help authors comply with the National Institutes of Health (NIH) revised "Public Access Policy," effective April 7, 2008. The NIH's revised policy requires that NIH-funded authors submit to PubMed Central (PMC), or have submitted on their behalf, their peer-reviewed author manuscripts, to appear on PMC no later than 12 months after final publication. Elsevier will send to PMC the final peer-reviewed manuscript, which was accepted for publication and sent to Elsevier's production department, and that reflects any author-agreed changes made in response to peer-review comments. Elsevier will authorize

the author manuscript's public access posting 12 months after final publication. Following the deposit by Elsevier, authors will receive further communications from Elsevier and NIH with respect to the submission. Authors are also welcome to post their accepted author manuscript on their personal or institutional web site. Please note that consistent with Elsevier's author agreement, authors should not post manuscripts directly to PMC or other third party sites. Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and society publishing partners. As a leading publisher of scientific, technical and medical (STM) journals, Elsevier has led the industry in developing tools, programs and partnerships that provide greater access to, and understanding of, the vast global body of STM information. This service is an example of Elsevier willingness to work cooperatively to meet the needs of all participants in the STM publishing community.

Open access: This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access • Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.

• An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription • Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs. • No open access publication fee payable by authors. Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards. For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY) Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND) For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The open access publication fee for this journal is USD 3000, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for

publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services) Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission Submission to this journal proceeds totally online. Visit the submission site of the journal at <http://ees.elsevier.com/steroids> You will be guided through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail.

Referees Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 4 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Use of word processing software It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic

artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure Manuscripts Arrange the manuscript in the following order: title page, abstract, keywords, text, acknowledgments, references, footnotes, tables, figure legends, and figures. Number the pages in sequence, with the title page as page 1, the abstract as page 2, etc. **Text:** Arrange the body of the manuscript in the following order:

Introduction, Experimental, Results, Discussion. **Title Page** .Give the full title of paper. Do not use asterisks or other extraneous symbols in the title. Give the first name, middle initial, and last name of all authors. List each author's institutional affiliation(s). Show the address of each author at the time of the study as well as the present address if it differs.

Provide the name and address of the corresponding author to whom questions and reprint requests should be sent. Give the name and address of the institution from which the work originated.

Text Arrange the text in the following order:

- **Introduction:** The rationale for the study. Provide a brief account of the nature, approach and importance of the study to be presented.
- **Experimental:** A clear and precise description of the experimental procedures. Identify all drugs and chemicals used, dosages, and routes of administration. All methods must be referenced and/or described in sufficient detail to enable a reader to repeat the experiment. For animal and human studies, the experimental protocol must be humane and ethical. In all manuscripts reporting the results of human studies, a statement must appear in the Experimental section indicating that approval was obtained from the institutional review board and that all human subjects signed written informed consent.
- **Results:** A factual account of the study's findings. Present these as logically appropriate in text, tables, or figures; do not repeat in the text what is demonstrated in a table or figure.
- **Discussion:** Place the results of the study in present and historical context and denote its importance to the field. Ensure that all conclusions are justified by the results of the study.

Acknowledgements: Acknowledge grants, sponsors, funding sources, and individuals who provided significant assistance. Include the affiliations of individuals being thanked. It is the author's responsibility to obtain permission from all those mentioned by name, because readers may infer their endorsement.