

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

**KEFIR REDUZ O DESENVOLVIMENTO DE LESÕES
ATEROSCLERÓTICAS EM CAMUNDONGOS CASTRADOS
KNOCKOUT PARA RECEPTORES DE LDL (LDLr^{-/-}) TRATADOS OU
NÃO COM TESTOSTERONA**

DIONISIO GONZAGA DUBOIS FILHO

VILA VELHA-ES
FEVEREIRO/2021

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

**KEFIR REDUZ O DESENVOLVIMENTO DE LESÕES
ATEROSCLERÓTICAS EM CAMUNDONGOS CASTRADOS
KNOCKOUT PARA RECEPTORES DE LDL (LDLr^{-/-}) TRATADOS OU
NÃO COM TESTOSTERONA**

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

DIONISIO GONZAGA DUBOIS FILHO

VILA VELHA-ES
FEVEREIRO/2021

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

D816k

Dubois Filho, Dionisio Gonzaga.

kefir reduz o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em camundongos castrados knockout para receptores de ldl (ldlr-/-) tratados ou não com testosterona / Dionisio Gonzaga Dubois Filho. - 2021.
51 f.: il.

Orientador: Tadeu Uggere de Andrade.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2021.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Aterosclerose. 3. Kefir.
4. Testosterona. I. Andrade, Tadeu Uggere de. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

DIONISIO GONZAGA DUBOIS FILHO

**KEFIR REDUZ O DESENVOLVIMENTO DE LESÕES
ATEROSCLERÓTICAS EM CAMUNDONGOS CASTRADOS
KNOCKOUT PARA RECEPTORES DE LDL (LDLr^{-/-}) TRATADOS OU
NÃO COM TESTOSTERONA**

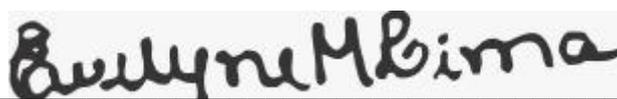
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2021.

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br SIMONE ALVES DE ALMEIDA SIMÕES
Data: 22/03/2022 09:23:38-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof^a. Dr^a. Simone Alves de Almeida Simões (MULTIVIX)



Prof^a. Dr^a. Ewelyne Miranda de Lima (UVV)



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

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado oportunidade de cursar o mestrado, e me guiado até a conclusão. Em especial, agradeço eternamente a minha família pelo apoio e incentivo e amor incondicional. Amo vocês! A minha namorada Thays pelo companheirismo, motivação, amor, paciência e por poder contar com ela em todos momentos. Obrigado por tudo, te amo! A minhas eternas professoras Mirian, Flavia, Karla, Girlandia, Andrews e Ewelyne que estiveram presentes sempre como força incentivadora e foram um suporte durante todo esse processo. Aos meus amigos de laboratório: Avila, Cristiane, Raiana, Leonardo, Manuela, Lauro, Atyla, Silvio, Maressa, Raylton, Karynna, Mikaella, Thayná, Camila, Kamila, Larissa, Leticia, Wedson e Rafael pelo apoio e motivação, e que nunca mediram esforços pra me ajudar. Ao meu orientador, Prof. Tadeu, sou muito grato por todos os ensinamentos transmitidos, orientação, amizade, pelo voto de confiança na execução deste trabalho, pela paciência desde a iniciação científica, e que mesmo com todas as dificuldades e obstáculos que tive durante o mestrado sempre estendeu as mãos para me ajudar. Não tenho palavras para descrever como foi importante nesta reta final. Obrigado! Aos meus amigos do Laboratório de Cultura de Células pela ajuda, companhia e todo auxílio prestado. Vou sentir saudade dos nossos cafés da tarde! À UVV e todos os professores e funcionários do PPGCF e biopráticas; à CAPES. E, por fim, a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

*Dedico esse trabalho à Deus, a minha
família e meus amigos.*

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução	3
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1. HIPOGONADISMO	5
2.2. TESTOSTERONA E RISCO CARDIOVASCULAR.....	7
2.3. ATEROSCLEROSE	10
2.4. PROBIÓTICO KEFIR	13
3. Objetivos	17
3.1. Objetivo Geral.....	17
3.2. Objetivos Específicos.....	17
4. Material e Métodos	18
4.1. Animais experimentais	18
4.2. Grupos experimentais	18
4.3. Orquiectomia	18
4.4. Preparação do kefir	19
4.5. Tratamento	19
4.6. Protocolo experimental	19
4.7. Coleta de sangue e perfusão.....	20
4.8. Dosagens bioquímicas.....	20
4.9. Detecção de LDL oxidada.....	20
4.10. Análise da deposição lipídica vascular	20
4.11. Ensaio de superóxido dismutase (SOD).....	21
4.12. Ensaio da Catalase (CAT).....	21
4.13. Análise Estatística.....	21
5. Resultados	22
6. Discussão	26
7. Conclusão	29
8. Referências	30
9. Anexo	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenvolvimento da lesão aterosclerótica.....	11
Figura 2	Grãos de kefir de leite.....	14
Figura 3	Dados da análise de deposição lipídica (<i>en face</i>) (mm ²) dos animais do grupo controle com cirurgia fictícia (SHAM), castrados (CAST), castrados que receberam Kefir (CAST+K), castrados que receberam reposição com testosterona (CAST+T) e castrados que receberam kefir e reposição com testosterona (CAST+K+T).....	22
Figura 4	Dados da análise da oxidação de LDL (LDLox) (ng/mL) dos animais do grupo controle com cirurgia fictícia (SHAM), castrados (CAST), castrados que receberam Kefir (CAST+K), castrados que receberam reposição com testosterona (CAST+T) e castrados que receberam kefir e reposição com testosterona (CAST+K+T).....	23
Figura 5	Dados da análise da enzima superóxido dismutase (SOD) (A) e catalase (CAT) (B) dos animais do grupo controle com cirurgia fictícia (SHAM), castrados (CAST), castrados que receberam Kefir (CAST+K), castrados que receberam reposição com testosterona (CAST+T) e castrados que receberam kefir e reposição com testosterona (CAST+K+T).....	24
Figura 6	Dados de ganho de peso (g) dos animais do grupo controle com cirurgia fictícia (SHAM), castrados (CAST), castrados que receberam Kefir (CAST+K), castrados que receberam reposição com testosterona (CAST+T) e castrados que receberam kefir e reposição com testosterona (CAST+K+T).....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores das avaliações bioquímicas dos animais controle com cirurgia fictícia (SHAM), castrados (CAST), castrados que receberam Kefir (CAST+K), castrados que receberam reposição com testosterona (CAST+T) e castrados que receberam kefir e reposição com testosterona (CAST+K+T).....	25
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ADP	Adenosina difosfato
ApoE	Apolipoproteína-E
CAT	Catalase
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais
CT	Colesterol total
DCV	Doenças Cardiovasculares
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina hipotalâmica
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
IL-6	Interleucina 6
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LDLox	Lipoproteínas de baixa densidade oxidado
LDLr ^{-/-}	Camundongos knockout para receptor LDL
LH	Hormônio Luteinizante
MDA	Malonaldeído
Mg	Miligramas
ml	Mililitros
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Nmol	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SOD	Superóxido dismutase
TNF- α	Fator de necrose tumoral
UVV	Universidade Vila Velha
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

RESUMO

DUBOIS FILHO, Dionisio Gonzaga, Universidade Vila Velha - ES, fevereiro de 2021.
KEFIR REDUZ O DESENVOLVIMENTO DE LESÕES ATEROSCLERÓTICAS EM CAMUNDONGOS CASTRADOS KNOCKOUT PARA RECEPTORES DE LDL (LDLr^{-/-}) TRATADOS OU NÃO COM TESTOSTERONA Orientador: Tadeu Uggere de Andrade

O Tratamento com reposição hormonal é o principal tratamento para homens acometidos por deficiência androgênica, afim de restabelecer os níveis séricos normais de testosterona, a deficiência de testosterona pode ser considerada um fator de risco para aterosclerose que é um importante mecanismo fisiopatológico envolvido na origem das doenças cardiovasculares, principalmente nos eventos isquêmicos. Perante esse cenário verifica-se que o uso do kefir associado ao tratamento convencional com hormônio possam ampliar os benefícios do tratamento. O kefir tem sido bastante estudado, pois pode auxiliar no tratamento de doenças cardiovasculares em especial a aterosclerose, com efeitos hipolipidêmico, anti-inflamatório e antioxidante. Neste trabalho avaliamos os efeitos do tratamento de reposição hormonal associado ou não ao kefir em 40 camundongos machos Knockout para receptor de LDL divididos em 5 grupos: submetidos a cirurgia fictícia (SHAM), Castrados e tratados com veículo (CAST), Castrados e tratados com Kefir (CAST+K), Castrados e tratados com Testosterona (CAST+T) e Castrados e tratados com kefir e testosterona(CAST+K+T), As amostras de sangue foram coletadas para análises bioquímicas e, em seguida, foi realizada a extração da aorta total e dividida entre aorta torácica para quantificação de deposição lipídica por “en face”, e a aorta abdominal para determinação de LDL oxidada, atividade das enzimas de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Nossos resultados sugerem que o tratamento de reposição hormonal associado ao kefir demonstram uma diminuição significativa no desenvolvimento da aterosclerose quando comparado aos demais grupos, houve também uma diminuição da LDLox no grupo CAST+K+T quando comparado aos que fizeram apenas o tratamento de reposição hormonal e foram observadas o aumento atividade da SOD no grupo CAST+K+T em relação aos demais grupos. Concluímos que nossos resultados mostram que camundongos castrados tratados com reposição hormonal obtiveram menor acúmulo de deposição lipídica na aorta e seus resultados são expressivamente melhorados quando associado ao uso do kefir. No entanto, mais estudos são necessários para aprofundar e investigar esses mecanismos.

PALAVRAS-CHAVE: kefir; testosterona; reposição hormonal; aterosclerose.

ABSTRACT

DUBOIS FILHO, Dionisio Gonzaga, Universidade Vila Velha - ES, February 2021.
KEFIR REDUCES THE DEVELOPMENT OF ATHEROSCLEROTIC LESIONS IN CASTRATED MICE KNOCKOUT FOR LDL RECEPTORS (LDLr - / -) TREATED OR NOT WITH TESTOSTERONE. Advisor: Tadeu Uggere

Hormone replacement treatment is the main treatment for men affected by androgen deficiency, in order to restore normal serum testosterone levels, testosterone deficiency can be considered a risk factor for atherosclerosis, which is an important pathophysiological mechanism involved in the origin of diseases. cardiovascular disease, especially in ischemic events. Given this scenario, it appears that the use of kefir associated with conventional hormone treatment can increase the benefits of treatment. Kefir has been extensively studied because it can help in the treatment of cardiovascular diseases, especially atherosclerosis, with hypolipidemic, anti-inflammatory and antioxidant effects. In this work, we evaluated the effects of hormone replacement treatment associated or not with kefir in 40 male ldl receptor Knockout mice divided into 5 groups: submitted to sham surgery (SHAM), Castrated and treated with vehicle (CAST), Castrated and treated with Kefir (CAST+K), Castrated and treated with Testosterone (CAST+T) and Castrated and treated with kefir and testosterone (CAST+K+T), Blood samples were collected for biochemical analysis and then the extraction of the total aorta and divided between the thoracic aorta for quantification of lipid deposition by "en face", and the abdominal aorta for determination of oxidized LDL, activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes. Our results suggest that hormone replacement treatment associated with kefir shows a significant decrease in the development of atherosclerosis when compared to the other groups, there was also a decrease in LDLox in the CAST+K+T group when compared to those who underwent hormone replacement treatment alone. and an increase in SOD activity was observed in the CAST+K+T group in relation to the other groups. We conclude that our results show that castrated mice treated with hormone replacement had less accumulation of lipid deposition in the aorta and their results are significantly improved when associated with the use of kefir. However, more studies are needed to deepen and investigate these mechanisms.

KEYWORDS: kefir; testosterone; hormone replacement; atherosclerosis.

1. Introdução

Com o envelhecimento populacional tem-se observado aumento nos casos de homens acometidos por deficiência androgênica (BASARIA, 2014). Estudos apontam que por volta dos 45 anos ocorre uma redução de cerca de 1% ao ano nos níveis de testosterona (ARAUJO et al., 2007; MULLIGAN et al., 2006; WU et al., 2010). O Hipogonadismo é caracterizado pela diminuição da atividade funcional das gônadas resultando na produção diminuída da testosterona (WU et al., 2010), afetando as funções dos testículos tanto sobre a síntese de testosterona como na espermatogênese (BASARIA, 2014).

O Tratamento mais indicado para esse tipo de alteração e a reposição hormonal com testosterona, com objetivo de restabelecer seus níveis séricos normais. (PASTUSZAK et al., 2015; MCBRIDE et al., 2015) A testosterona tem efeitos benéficos sobre diversos fatores de risco cardiovascular, que incluem o colesterol, a disfunção endotelial e a inflamação: os principais mediadores da aterosclerose (LIU et al., 2016; GAGLIANO-JUCÁ et al., 2019; AUERBACH et al., 2020). É um hormônio que modula a reatividade vascular o que gera impacto sobre a função endotelial (BHASIN et al., 2007), a produção de citocinas pró-inflamatórias e perfil lipídico (SPITZER et al., 2013 BIANCHI, 2019; MOHAMAD et al., 2019) e atua como um dos principais determinantes do metabolismo da gordura e da composição corporal, uma vez que inibe a absorção de triglicérides e aumenta a mobilização de lipídios da gordura visceral, fator associado ao aumento do risco de doenças cardiovasculares, doença arterial coronariana, hipertensão, e diabetes mellitus tipo 2 e dislipidemia aterogênica (GO et al, 2013; GAGLIANO-JUCÁ et al., 2019; BARNOUIN et al., 2020).

Estudos recentes estabelecem uma relação entre os baixos níveis de testosterona e o desenvolvimento da aterosclerose em homens (REZANEZHAD et al., 2019; AUERBACH et al., 2020; BARNOUIN et al., 2020; DENG et al., 2020). Budoff et al., (2016) avaliou durante um ano homens idosos, com níveis séricos de testosterona baixos, submetidos ou não ao tratamento de reposição hormonal, seus achados demonstraram que os homens que foram submetidos ao tratamento hormonal obtiveram um maior volume da placa não calcificada da artéria coronária, já em outro estudo de 2015 conduzido por Basaria et al., avaliaram homens idosos com níveis baixos ou normais de testosterona por 3 anos, que realizaram o tratamento de

reposição hormonal, entretanto o tratamento não se mostrou eficiente quanto na redução das taxas de alteração na espessura da íntima-média da artéria carótida.

Estudos em animais modelos experimentais o tratamento com testosterona em níveis fisiológicos se mostra inefetivo ou até mesmo neutro no desenvolvimento da aterosclerose (ECKARDSTEIN e WU, 2003; BOURGHARDT et al. 2010; ALSIRAJ et al., 2019). Em seu trabalho Alzira et al., (2019) realizaram o procedimento de orquiectomia em camundongos Knockout para receptor de LDL (LDLr -/-), afim de mostrar a influencia do procedimento sobre o aumento na placa de aterosclerose, os grupos que receberam o tratamento com reposição hormonal não apresentaram nenhuma redução significativa no desenvolvimento da placa de aterosclerose em comparação com o grupo que recebeu apenas veiculo. Em outro estudo Bourghardt et al. (2010) avaliou camundongos castrados ApoE, tratados com doses fisiológicas de testosterona, e também não observou nenhuma redução significativa sobre a deposição lipídica no arco aórtico dos animais.

Diversos autores afirmam que esse é um tema muito controverso, e que o tratamento com reposição hormonal pode não ser o mais indicada para indivíduos com predisposição a doenças cardiovasculares (DCV) (FERNÁNDEZ-BALSELLS et al., 2010; SPITZER et al., 2013; VIGEN et al., 2013, BUDOFF et al., 2016) , com isso vê-se a importância de associar terapias alternativas juntamente com as convencionas afim de melhorar ou até mesmos observar benefícios sobre a aterosclerose que não obtidos com a terapia convencionas (REZANEZHAD et al., 2019; AUERBACH et al., 2020), dentre as terapias alternativas o kefir pode ser considerado uma excelente estratégia para a prevenção da aterosclerose. Tendo em vista suas atividades antibacteriana e antioxidante (CHEN et al., 2020), antitumoral (LIU et al., 2002), anti-inflamatória (YILMAZ et al., 2019) e a anti-hipertensiva (FRIQUES et al., 2015; BRASIL et al., 2018), e que a bebida fermentada é capaz de prevenir o desenvolvimento de aterosclerose em modelo animal (SANTANNA et al. 2017), pela diminuição da deposição lipídica, possivelmente por mecanismo antioxidante envolvendo as enzimas do sistema redox. (EL GOLLI-BENNOUR., et al 2019;)

2. Revisão Bibliográfica

2.1. HIPOGONADISMO

A deficiência androgênica ou hipogonadismo é caracterizado pela diminuição da atividade funcional das gônadas resultando na produção diminuída da testosterona (WU et al., 2010; AGRETTI et al., 2021), afetando as funções dos testículos tanto sobre a síntese de testosterona como na espermatogênese (BASARIA, 2014). Com o passar dos anos e o avançar da idade os níveis de testosterona diminuem como um processo natural de envelhecimento, causando redução da fertilidade, disfunção sexual, declínio da força muscular, menor mineralização óssea, distúrbio do metabolismo lipídico e disfunção cognitiva (DOHLE et al., 2015; SALONIA et al., 2020).

O hipogonadismo pode ser diagnosticado nas seguintes formas: causadas por insuficiência testicular; causadas por disfunções hipotalâmicas-hipofisárias (abuso de esteroides anabolizantes); hipogonadismo de início tardio; e hipogonadismo devido a insensibilidade dos receptores androgênicos (RASTRELLI et al., 2016; LEVY et al., 2019; GROSSMANN et al., 2020). Quando classificado como primário, a testosterona sérica encontra-se baixa e não consegue inibir a produção de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) que são secretados pela hipófise em resposta ao hormônio liberador de gonadotrofina hipotalâmica (GnRH). O FSH regula a espermatogênese nos túbulos seminíferos do testículo e o LH controla a secreção de testosterona pelas células de Leydig. Por sua vez, o controle de GnRH, FSH e LH depende da produção de inibina pelas células de Sertoli e testosterona pelas células de Leydig. A inibina diminui a secreção de FSH e a testosterona controla a produção de LH (SAMIPOOR et al., 2018).

O hipogonadismo secundário está relacionado aos níveis baixos de testosterona, com níveis baixos ou até normais de FSH e LH (CORONA et al., 2012; LEVY et al., 2019). Essas duas condições podem acometer homens em todas as faixas etárias (WU et al., 2010). Quando em idade elevada, a ocorrência do hipogonadismo está diretamente ligada a diversas alterações como diminuição da massa e força muscular (FINKELSTEIN et al., 2013), diminuição da libido (BHASIN et

al., 2010), aumento de gordura abdominal visceral e perfil lipídico aterogênico entre outros (WU et al., 2010; ATLANTIS et al., 2009).

O tratamento mais indicado para esse tipo de alteração é a reposição hormonal com testosterona por meio de injeções intramusculares, adesivos e géis transdérmicos afim de restabelecer os níveis normais de testosterona (PASTUSZAK et al., 2015; MCBRIDE et al., 2015). O hipogonadismo é uma condição comum especialmente entre homens idosos, que geralmente se desenvolve sem um diagnóstico ou tratamento adequados (BASARIA, 2014). Diversos sintomas poder ser associados ao hipogonadismo, que afetam a saúde e a qualidade de vida masculina, incluindo sentimentos de pouca energia e fadiga (REY et al., 2013), redução do desejo sexual (RASTRELLI et al., 2018), diminuição da massa e da força muscular e da densidade mineral óssea (MARCELLI et al., 2019), aumento da gordura corporal, principalmente na região abdominal (RASTRELLI et al., 2018), obesidade (CARRAGETA et al., 2019), resistência à insulina (ZHENG et al., 2016), dislipidemia e mortalidade em homens idosos (IGLESIAS et al., 2015). Estudos têm mostrado uma alta prevalência de hipotestosteronemia em homens com doença cardiovascular e associam baixos níveis séricos de testosterona com aumento de eventos cardiovasculares e mortalidade (LIU et al., 2016; AUERBACH et al., 2020).

Baixos níveis de testosterona, atribuídos ao hipogonadismo ou à privação da terapia com andrógenos, produzem efeitos adversos à saúde cardiovascular com implicações na função endotelial, hipertensão, resposta inflamatória e principalmente no perfil lipídico. (CHRYSANT et al., 2018) A deficiência androgênica é associada a níveis aumentados de colesterol total, LDL, fatores pró-inflamatórios e maior espessura da parede arterial que contribui para a disfunção endotelial (BUDOFF et al., 2016; VELHO et al., 2017; MOHAMAD et al., 2019).

Homens que optam por usar terapia de reposição hormonal em doses fisiológicas de testosterona, apresentam uma taxa significativamente menor de doenças cardiovasculares (SURAMPUDI et al., 2012). Terapias alternativas também são bem indicadas em associação ao tratamento convencional, como o uso do *tribulus terrestris* e maca peruana. Estudos em humanos e animais demonstram diversos benefícios destas substâncias como: melhora na espermatogênese, aumento da libido e ganho de massa muscular. Contudo, o aumento da testosterona só foi observado

em pesquisas com animais, em humanos este benefício ainda não foi constatado (KOVAC et al., 2016; ROAIAH et al., 2017; YOSHIDA et al., 2018).

2.2. TESTOSTERONA E RISCO CARDIOVASCULAR

A testosterona é um hormônio pertencente a classe dos androgênicos (hormônios sexuais masculinos), ela é encontrada em maior concentração nos homens e, basicamente, suas funções são associadas ao desenvolvimento das características sexuais masculinas, como o aumento de massa muscular e a regulação de funções sexuais (NIESCHLAG et al., 2019; KWONG et al., 2019). O hipotálamo secreta o GnRH que estimula a hipófise anterior a produzir e liberar o FSH e o LH. (KOSKENNIEMI et al., 2017; FÀBREGUES et al., 2019) Nas gônadas, o FSH estimula as células de Sertoli na produção de espermatozoide, enquanto o LH estimula as células de *Leydig* responsáveis pela produção de testosterona. (KOSKENNIEMI et al., 2017). Nos testículos a produção de testosterona gira em torno de 3 a 10 mg diariamente, que correspondem a uma concentração plasmática de 10,4 - 34,7 nmol/L, obtendo seu pico no período matutino (KEEVIL et al., 2019; AGRETTI et al., 2021).

Por meio da ação das enzimas 5- α -redutase e aromatase, a testosterona pode ser convertida em dihidrotestosterona e estradiol, respectivamente, podendo ter ação tanto direta como indireta em tecido cardíaco e esquelético. (GAGLIANO-JUCÁ et al., 2019). A Testosterona é um hormônio esteroide derivado das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e seu transporte depende das proteínas carreadoras, onde grande parte estão ligadas à albumina e globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) e uma pequena parte de forma livre, a qual está relacionada com a resposta biológica direta nos tecidos alvos (KWONG et al., 2019).

Segundo a Organização mundial de saúde (OMS) os homens são mais propensos as DCV, e têm níveis mais elevados de testosterona do que as mulheres. No entanto, estudos recentes indicam que os andrógenos podem ter efeito benéfico no sistema cardiovascular masculino (LIU et al., 2016; AUERBACH et al., 2020), os baixos níveis de testosterona endógena têm estado envolvidos na presença de alguns componentes da síndrome metabólica (GO et al, 2013), incluindo dislipidemia

(BARNOUIN et al., 2020), obesidade visceral (Kelly, 2015), hipertensão (DALMASSO et al., 2017).

Adicionalmente, tem sido observado que tanto os baixos níveis endógenos de testosterona, quanto a síndrome de deficiência de testosterona nos homens estão associados a um maior risco cardiovascular (LIU et al., 2016; AUERBACH et al., 2020) e que o tratamento de reposição hormonal parece diminuir esse risco, provavelmente por meio de modificação e melhoria dos fatores de risco cardiovasculares (SPITZER et al., 2013). Artigos sugerem também uma relação entre a deficiência de testosterona e o desenvolvimento da aterosclerose em homens mais velhos (KLONER et al., 2016; REZANEZHAD et al., 2019).

Neste contexto os mecanismos anti-inflamatórios da testosterona poderão ser benéficos para impedir a progressão da aterosclerose (BIANCHI, 2019; MOHAMAD et al., 2019), Maggio et al., (2005) avaliaram 473 homens idosos mostrando uma relação inversa significativa entre os níveis de Testosterona e do receptor solúvel de IL-6 (sIL-6r) (uma porção solúvel do receptor de IL-6 que pode aumentar a atividade biológica de IL-6), sugere que existe uma relação estreita entre o desenvolvimento de um estado pró-inflamatório e o declínio nos níveis de Testosterona. Outro estudo também apontou evidências de que a testosterona tem capacidade de inibir a expressão de *Vascular Cell Adhesion Protein 1* (VCAM-1 - molécula de adesão que promove a migração de leucócitos para a placa aterosclerótica) no endotélio aórtico (USMAN et al., 2019; LANNANTUONI et al., 2020).

Deng et al., (2020) demonstraram que a deficiência de testosterona acelera a formação precoce da placa de aterosclerose em suínos, e que a deficiência de testosterona envolveu vários metabólitos predominantemente relacionados ao metabolismo lipídico, inflamação, estresse oxidativo e distúrbios endoteliais. Em um estudo de Dalmasso et al., (2017) foi observada a diminuição da pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) castrados tratados com reposição de testosterona.

Em contrapartida, estudos estabelecem uma controvérsia sobre o tema, afirmando que nem sempre a reposição hormonal pode ser o tratamento mais indicado para homens idosos (VIGEN et al., 2013, FERNÁNDEZ-BALSELLS et al., 2010). Um estudo de Basaria et al., (2015) avaliaram a progressão da aterosclerose em 308

homens mais velhos, com níveis de testosterona baixos ou normais, tratados com testosterona ou placebo durante 3 anos, a administração de testosterona não resultou em uma diferença significativa nas taxas de alteração na espessura da íntima-média da artéria carótida comum. Budoff et al., (2016) também avaliaram homens com 65 anos ou mais, com uma média de 2 níveis de testosterona sérica abaixo de 275 ng / dL (82 homens atribuídos a placebo, 88 a testosterona), com dose de testosterona em gel ajustadas para manter os níveis de testosterona nas faixas normais para homens jovens, ou gel placebo por 12 meses. Entre os homens mais velhos com hipogonadismo sintomático, o tratamento com gel de testosterona por 1 ano em comparação com o placebo foi associado a um aumento significativamente maior no volume da placa não calcificada da artéria coronária, medido por angiografia por tomografia computadorizada coronariana.

Na maioria dos experimentos com animais, a testosterona exógena em níveis fisiológicos exerceu efeitos neutros no desenvolvimento da aterosclerose (ECKARDSTEIN e WU, 2003; BOURGHARDT et al. 2010; ALSIRAJ et al., 2019). Alsiraj et al., (2019) avaliou os efeitos da orquiectomia em camundongos Knockout para receptor de LDL (LDLr -/-) mostrando a influencia dos baixos níveis de testosterona sobre a dislipidemia e um aumento na placa de aterosclerose nos grupos experimentais, e que o tratamento com reposição hormonal não foi capaz de diminuir sua progressão. Bourghardt et al. (2010), por sua vez, tratou camundongos ApoE com doses fisiológicas de testosterona durante 8 semanas e não observou diferença significativa sobre a deposição lipídica no arco aórtico dos animais Sham ou castrados.

Entretanto, apesar de toda controvérsia envolvendo os benefícios da reposição hormonal, estudos na literatura vem associando o hipogonadismo a doenças cardiovasculares, tais como hipertensão arterial, infarto agudo do miocárdio e diabetes mellitus (WANG et al., 2011; GO et al, 2013; BARNOUIN et al., 2020). Também têm sido reportadas correlações que sugerem que a hipotestosteronemia pode ser considerada um fator de risco para aterosclerose que é um importante mecanismo fisiopatológico envolvido na origem das doenças cardiovasculares, principalmente nos eventos isquêmicos (ALSIRAJ et al., 2019, GO et al, 2013; HERRINGTON et al., 2016; BODEN et al., 2020).

2.3. ATEROSCLEROSE

A aterosclerose é um estado inflamatório crônico e progressivo, caracterizado pelo acúmulo de placas de lipídios e tecido fibroso na parede da artéria, conhecidas como placas de ateroma, sendo formadas preferencialmente em ramos arteriais, múltiplas áreas do arco aórtico e contendo pontos de segmentação da artéria aorta (KWON et al., 2008; TAGHAVIE-MOGHADAM et al., 2014). A progressão da aterosclerose é determinada por meio da influência de diversos fatores e tipos de células, incluindo células T, células B, células natural *killer*, monócitos/macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e células do músculo liso vascular (KASSI et al., 2013; WOLF et al., 2019).

Inicialmente a doença está situada na região íntima arterial, restrita a uma pequena área entre o endotélio e as células do músculo liso subjacente, e envolve a retenção de lipídios celulares e matriz extracelular (MOORE e TABAS, 2011; XU et al., 2019). Diversos aspectos influenciam na alteração das células endoteliais, aumentando a ação de moléculas adesão celular e quimioatrativas (WANG et al., 2011; LIBBY et al., 2019). Os monócitos circulantes são atraídos por moléculas de adesão para a camada íntima, em seguida os mesmos diferenciam-se em macrófagos mediante a ação do fator estimulante da colônia de macrófagos, expressão induzida pelo LDL oxidada (LDL_{ox}), que por sua vez induz a ativação endotelial, caracterizada pelo aumento na expressão de moléculas de adesão e da proteína quimioatratante de monócitos favorecendo a infiltração dessa célula no espaço subendotelial. Além disso, a LDL_{ox} também é capaz de ativar a diferenciação de monócitos a macrófagos via fator estimulante da colônia de macrófagos, o que é um passo importante, uma vez que o macrófago possui receptores capazes de captar a LDL modificada, dando origem às células espumosas (MIMURA e ITOH, 2015; YANG et al., 2020).

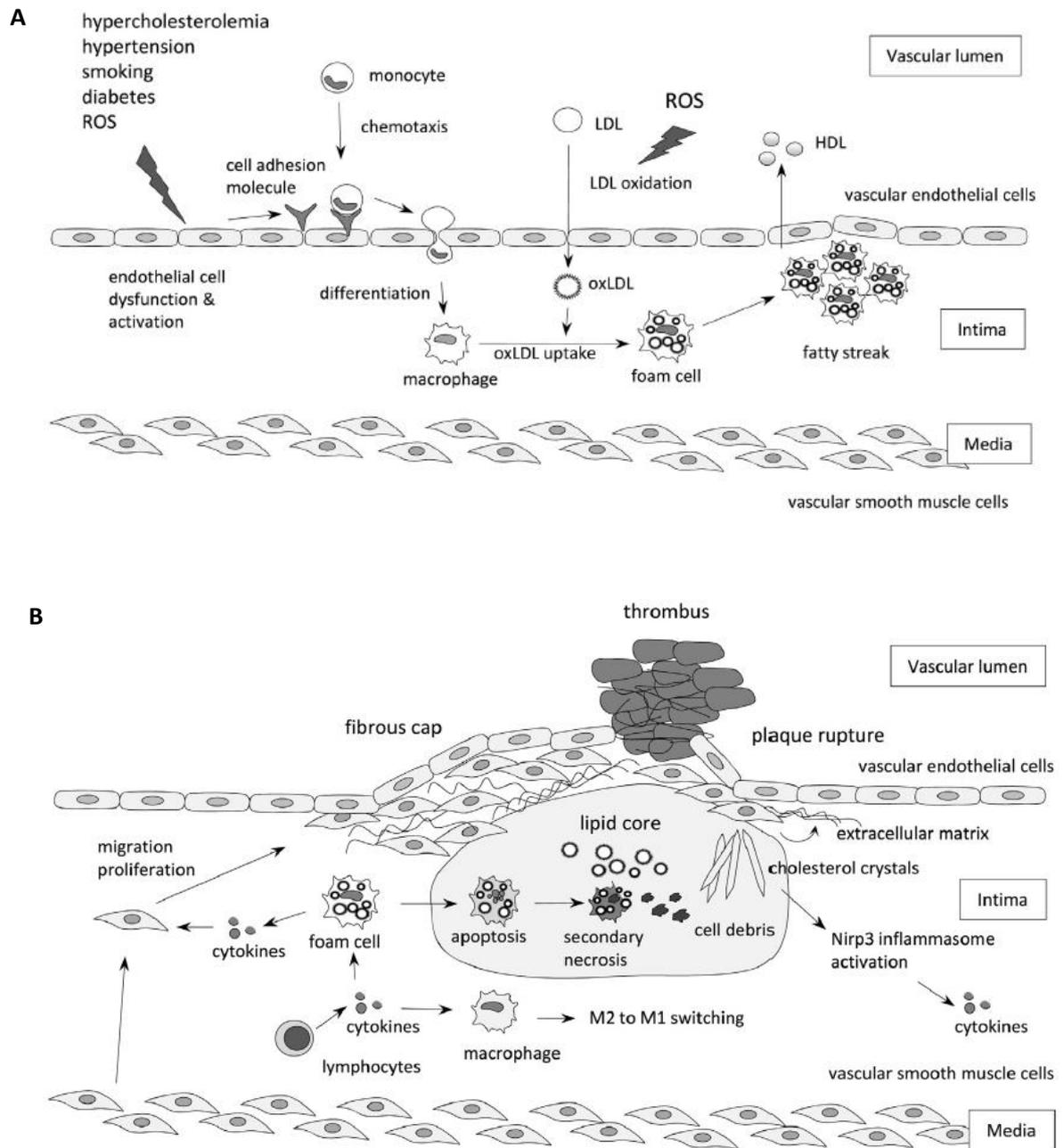


Figura 1 – Desenvolvimento da lesão aterosclerótica: Na fase inicial da aterosclerose, vários fatores induzem a disfunção das células endoteliais e a aumentar a expressão de moléculas quimioatrativas e de adesão celular. As moléculas de adesão celular recrutam monócitos circulantes para a área de íntima. Em seguida, os monócitos diferenciam-se para macrófagos, que englobam a LDL_{ox} e se transformam em células espumosas. O acúmulo de células espumosas forma uma lesão de camadas de gordura. Na fase final da aterosclerose, o acúmulo de lipídeos extracelular, células mortas e os detritos celulares contribuem para a formação de núcleo necrótico. As citocinas produzidas pelas células espumosas aumentam a migração e proliferação das células do músculo liso para íntima, produzindo proteínas de matriz extracelular e formação da capa fibrosa. (Adaptado de Mimura e Itoh, 2015).

Conseqüentemente, o acúmulo de células espumosas é responsável pelo desenvolvimento da deposição de camadas de gordura, ocorrendo o acúmulo de

lipídeos extracelular, células mortas e os detritos celulares que contribuem para a formação de núcleo necrótico. As citocinas desenvolvidas pelas células espumosas aumentam a migração e proliferação das células do músculo liso para camada íntima, produzindo proteínas de matriz extracelular e formação da capa fibrosa (WEBER e NOELS, 2011).

O estresse oxidativo possui um papel importante na aterogênese, pode levar a vários eventos celulares, tais como inativação de óxido nítrico (NO), modificações oxidativas de DNA e proteínas, oxidação lipídica, aumento da proliferação e apoptose de células vasculares, e aumento da expressão e ativação de genes redox-sensíveis, como o receptor para LDLox, moléculas de adesão, fatores quimiotáticos, citocinas pró-inflamatórias, metaloproteinases de matriz (CAO et al., 2019; KATTOOR et al., 2019). Apesar de todos os componentes celulares serem susceptíveis à ação das espécies reativas de oxigênio (EROS), a membrana celular se destaca em decorrência da peroxidação lipídica levando a alterações estruturais e de permeabilidade (FÖRSTERMANN et al., 2017). A oxidação dos lipídeos insaturados da membrana celular pode modular muitas vias de sinalização (SCHAFTENAAR et al., 2016).

Diversos fatores relacionados ao risco cardiovascular estão associados com o estresse oxidativo e desregulação da expressão e atividade de enzimas oxidantes e antioxidantes, incluindo hipertensão, hipercolesterolemia (MALEKMOHAMMAD et al., 2019). Desse modo, a produção acentuada de EROS está intimamente ligada com a aterosclerose por induzir uma ativação crônica do endotélio vascular e componentes do sistema imune (MARCHIO et al., 2019; YUAN et al., 2019). As EROS do endotélio vascular se originam de enzimas como NADPH oxidase, mieloperoxidase (MPO), xantina oxidase, lipoxigenases, NO sintases. Além disso, uma disfunção da cadeia respiratória mitocondrial pode ter grandes efeitos na produção de EROS (CADENAS, 2018).

Em humanos, a expressão elevada de subunidades protéicas de NADPH oxidase está associada a aumento da produção de íons superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e a severidade da aterosclerose (DRÖGE et al., 2002; VALKO et al., 2007; FORRESTER et al., 2018). Camundongos com deficiência genética de apo-E (ApoE^{-/-}) e NADPH oxidase apresentaram menor desenvolvimento de aterosclerose que os animais somente ApoE^{-/-} (BARRY-LANE et al., 2001). Outra consequência do estresse

oxidativo aumentado é a oxidação das LDL, evento crucial para o desenvolvimento da aterosclerose, como já citado anteriormente (RAY et al., 2012; CADENAS, 2018).

Dessa forma, verifica-se que o uso de terapias alternativas, associadas às terapias convencionais, talvez possa ampliar os benefícios que não são observados com a reposição hormonal (KOVAC et al., 2016; ROAIAH et al., 2017; YOSHIDA et al., 2018), visto que essas terapias alternativas podem melhorar fatores como estresse oxidativo, processo inflamatório, dislipidemia e hipertensão. Fatores esses que normalmente não são tratados com a reposição hormonal, ou mesmo, são desencadeados pelo uso do hormônio (FRIQUES et al., 2015; SANTANNA et al., 2017; BARBOZA et al., 2018).

2.4. PROBIÓTICO KEFIR

Dentre as terapias alternativas que tem sido bastante estudada, o uso de probióticos para o tratamento de doenças cardiovasculares vem ganhando grande destaque na comunidade científica (SHIBY e MISHRA, 2013; BRASIL et al., 2018). Em especial o kefir, que basicamente é composto por uma simbiose de microrganismos, tais como bactérias ácido-lácticas, bactérias ácido-acéticas e leveduras (EBNER et al., 2015), envolvidas por uma matriz polissacarídica, denominada kefirano (CHEN et al., 2015; PRADO et al., 2015).

A palavra kefir deriva do Turco, *Keif* a qual pode ser traduzida como “sentir-se bem”, sensação experimentada após ingeri-lo. Os grãos de kefir foram passados de geração em geração entre as tribos do Cáucaso, sendo estes considerados uma fonte de riqueza familiar (revisado por OZEN, 2015).

O kefir originou-se nas montanhas dos Cáucos. Os grãos de kefir, historicamente, foram considerados um presente de Alá entre o povo muçulmano do norte das montanhas (ROSA et al., 2017), e seu aspecto se assemelha ao do iogurte ou coalhada (figura 2). Tradicionalmente, os caucasianos preparavam o kefir pela fermentação do leite em sacos feitos do couro cru (ou estômago) de animais. O leite fresco era adicionado do leite fermentado e após um tempo, ocorria um acúmulo de camadas de micro-organismos embebidos em um material com proteína e polissacarídeo e, eventualmente, a formação de grãos (revisado por BENGGOA et al.,

2018). isso levou aos primeiros grãos de kefir e deu início à longa tradição de fabricação de kefir (revisado por ROSA et al., 2017).

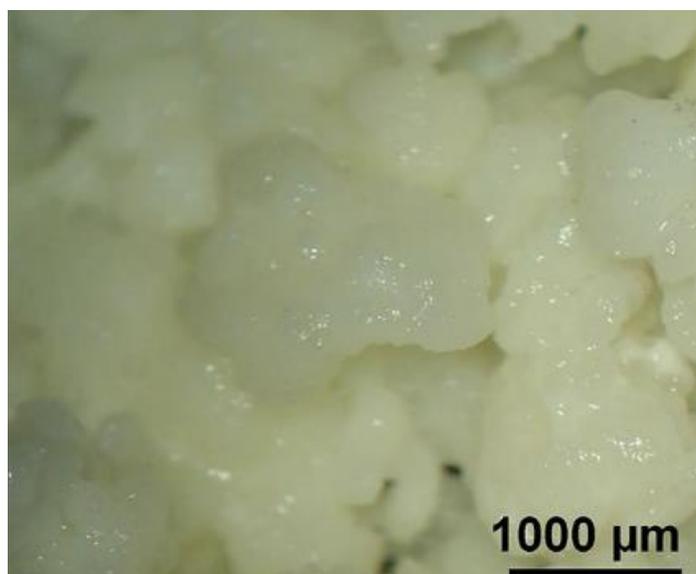


Figura 2: Grãos de kefir de leite (FRIQUES et al., 2015).

Essas sacolas eram tradicionalmente penduradas nas entradas das casas das pessoas, o que resultava na mistura de seu conteúdo quando as pessoas entravam ou saíam de casa. As sacolas também podiam ser carregadas conforme as pessoas viajavam, com a instabilidade do passeio influenciando o conteúdo (revisado por OZEN, 2015). Em (1997) Motaghi et al. reproduziram essa teoria, enchendo um saco de couro de cabra com leite pasteurizado, incubados a 24–26 °C e sendo agitado de hora em hora. Após 12 semanas, eles foram capazes de obter grãos de kefir.

Os grãos de kefir podem ser armazenados de diferentes formas, eles podem ser reservados úmidos, secos / liofilizados ou congelados (BERGMANN et al., 2010). Os grãos de kefir têm uma vida útil limitada quando deixados úmidos, pois perdem sua atividade em 8 a 10 dias com o armazenamento a 4 °C (FARAG et al., 2020). Por sua vez, a liofilização ou secagem à temperatura ambiente por 36 a 48 h permite a manutenção da atividade por 12 a 18 meses (LONDERO et al., 2012). No entanto, Garrote et al. (1997) observaram que o congelamento a -20 °C ou -80 °C era o melhor método para preservação de grãos. Além disso, eles observaram que o kefir obtido do armazenamento de grãos nessas temperaturas tinha a mesma microbiota e características de qualidade que o kefir produzido a partir de grãos de kefir não

armazenados. Portanto, se armazenados em condições favoráveis, os grãos de kefir podem permanecer estáveis por muitos anos sem perder sua atividade. O processo de reconstituição dos grãos de kefir consiste em realizar incubações sucessivas no leite, onde aos poucos se restabelecem sua estrutura e, posteriormente, novos grãos são formados (EBNER et al., 2015). A lavagem excessiva e o aproveitamento inadequado alteram a microbiota dos grãos e sua viabilidade, bem como a qualidade do produto final (PRADO et al., 2015).

Os grãos de kefir podem ser fermentados não apenas em leite, mais também em água, e dentre outros veículos, as bebidas resultantes têm demonstrado, dentre outros, efeitos anti-inflamatório e antioxidante. (HADISAPUTRO et al., 2012). Durante sua fermentação são produzidos diversos compostos bioativos, como os ácidos orgânicos, peptídeos bioativos e exopolissacarídeos (como o *kefirano*), que atuam de forma independente ou em sinergia para proporcionar benefícios à saúde humana (HAMIDA et al., 2021).

O consumo da bebida fermentada com grãos de kefir regularmente pode proporcionar atividade antibacteriana e antioxidante (CHEN et al., 2020), antitumoral (LIU et al., 2002), restauradora da microbiota intestinal (DE ALMEIDA SILVA et al., 2020), anti-inflamatória (YILMAZ et al., 2019) e a anti-hipertensiva (FRIQUES et al., 2015; BRASIL et al., 2018). Assim, seu consumo deve ser encorajado, uma vez que o mesmo é seguro, facilmente produzido em domicílio, possui baixo custo de produção, podendo ser incorporado à dieta (ROSA et al., 2017).

Evidências apontam que o tratamento com kefir é capaz de induzir efeitos benéficos sobre a hipertensão (FRIQUES et al., 2015; BRASIL et al., 2018), o diabetes (PUNARO, et al., 2014; OSTADRAHIMI et al., 2015), a obesidade (FATHI et al., 2017; KIM et al., 2017) e a síndrome metabólica (ROSA et al., 2017), a aterosclerose em animais experimentais (UCHIDA et al., 2010; SANTANNA et al., 2017).

Recentemente De Almeida Silva., et al (2020) trataram ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) com kefir durante nove semanas e os resultados indicaram uma melhoria da integridade estrutural e funcional da parede intestinal e da proteção contra neuroinflamação nos núcleos cardiorregulatórios. Devido ao aumento das citocinas anti-inflamatórias e diminuição da resposta pró-inflamatória, infere-se que o kefir possui boa atividade também na prevenção da aterosclerose (PIMENTA et al.,

2018). Em um estudo Uchida et al. (2010) demonstraram que os grãos de kefir foram capazes de reduzir o processo inicial da aterosclerose, devido as ações antioxidantes e anti-inflamatórias. Já Santanna et al. (2017) avaliaram a fração solúvel do kefir em camundongos machos knock-out para receptor de LDL ($LDLr^{-/-}$), observando que foi capaz de diminuir a deposição lipídica na artéria aorta.

LIU et al. (2006) investigaram o efeito hipocolesterolêmico do leite de vaca e do “leite” de soja fermentados pelos grãos de kefir em hamsters. Os hamsters receberam dieta livre de colesterol ou rica em colesterol acrescidas de 10% de leite desnatado, kefir-leite, leite de soja ou kefir-leite de soja por 8 semanas (8 grupos). Houve melhora significativa do perfil lipídico dos animais com a diminuição do colesterol total sérico e hepático, dos triglicérides séricos e aumento da excreção de esteróis neutros e sais biliares.

Em um estudo mais recente Tung et al., (2020) avaliaram camundongos ApoE tratados com peptídeos kefir e observaram uma redução da deposição de lipídeos aórticos, além disso, os resultados sugeriram que os peptídeos do kefir melhoraram significativamente o desenvolvimento da lesão aterosclerótica, protegendo contra a disfunção endotelial, diminuindo o estresse oxidativo, reduzindo a deposição de lipídios aórticos, atenuando o acúmulo de macrófagos e suprimindo a resposta imune inflamatória em comparação com o grupo SHAM, resultados demonstram a redução da progressão aterosclerótica via consumo de peptídeos de kefir em camundongos ApoE, modulando as respostas das células imunes, reduzindo as EROS e LDLox.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do kefir sobre o desenvolvimento da aterosclerose em camundongos *knockout* para receptor de colesterol LDL (LDL^{-/-}) castrados, tratados ou não com testosterona.

3.2. Objetivos Específicos

Avaliar o efeito do tratamento com kefir em camundongos *knockout* para receptor de colesterol LDL (LDL^{-/-}) castrados com ou sem reposição hormonal sobre:

- As lesões ateroscleróticas;
- O perfil lipídico (colesterol total (CT), colesterol HDL (HDLC), colesterol não-HDLC e triglicerídeos)
- Os níveis aórticos de colesterol LDL oxidado;
- A atividade de enzimas do sistema redox (SOD e CATALASE);

4. Material e Métodos

4.1. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos *knockout* para receptor de colesterol LDL (LDLr^{-/-}), com peso entre 25-30 g e com oito semanas de idade. Esses animais foram fornecidos pelo Laboratório de Acompanhamento Experimental do Complexo Biopráticas – UVV. Os mesmos foram mantidos em mini-isoladores, alojados em *Rack IVC (Individually Ventilated Caging)* ©Alesco, com controle de umidade e temperatura, ciclo claro-escuro de 12h e acesso à água e comida *ad libitum* com ração normal (ração Probiotério, Moin ho Primor, S.A.).

4.2. Grupos experimentais

Os camundongos foram separados em cinco grupos experimentais (n=8 para cada grupo):

Camundongos LDLr^{-/-}:

- Submetidos a cirurgia fictícia e tratados com veículo: (SHAM)
- Castrados e tratados com veículo: (CAST)
- Castrados e tratados com Kefir e óleo de amendoim: (CAST+K)
- Castrados e tratados com leite e com Testosterona: (CAST+T)
- Castrados e tratados com Kefir e com Testosterona: (CAST+K+T)

4.3. Orquiectomia

A orquiectomia foi realizada sob anestesia, utilizando o anestésico Cetamina (11,5 mg/100g peso) e Xilazina (0,1 mg/100g peso) por via intraperitoneal (i.p.) no quadrante inferior esquerdo do abdômen, os pelos da região escrotal do camundongo foram tricotomizados, a área cirúrgica lavada com iodo, a pele do escroto aberta e o epidídimo cortado e os testículos removidos completamente, e após a ferida foi suturada. (SON et al., 2019; ALSIRAJ et al., 2019).

4.4. Preparação do kefir

Os grãos de kefir foram adicionados ao leite integral pasteurizado (FIORE) em uma proporção de 5% e o preparado mantido em temperatura ambiente (23 ° C). Após 24 h, esta mistura foi filtrada por meio de uma peneira de polietileno e o produto filtrado foi refrigerado (4° C) para permitir o crescimento das leveduras por 24 h (BRASIL et al., 2018). Após a conclusão deste processo, o kefir estava totalmente preparado para administração. A bebida de kefir era preparada diariamente para a administração aos animais. Os grãos de kefir foram doados pela Dra. Célia Luciade Luces Fortes Ferreira do Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil

4.5. Tratamento

Os tratamentos foram iniciados duas semanas após o procedimento cirúrgico (orquiectomia e cirurgia fictícia) (ALSIRAJ et al., 2019) e mantidos durante o período de oito semanas (MEIRELES et al., 2013). Os camundongos tratados com kefir receberam a bebida (0,3 mL / 100g de peso animal) (BRASIL et al., 2018), por via oral (gavagem), os camundongos tratados com veículo receberam, diariamente, leite por gavagem na mesma dose do grupo que recebeu kefir. Os grupos tratados com reposição hormonal receberam cipionato de testosterona 200mg/mL (Deposteron®, EMS Sigma Pharma Ltda) diluído com óleo de amendoim para concentração intermediária (1.5 mg/mL), em uma dose quinzenal de 0.1 mL/10 g, via intramuscular (MEIRELES et al., 2013) e os animais que não receberam testosterona, receberam veículo na mesma dose.

4.6. Protocolo experimental

Após oito semanas de tratamento, os camundongos castrados e/ou submetidos à cirurgia fictícia foram eutanasiados com tiopental sódico, 100 mg / kg; (Thiopentax®, Cristália, São Paulo), via intraperitoneal. As amostras de sangue foram coletadas para análises bioquímicas e, em seguida, foi realizada a extração da aorta total e dividida entre aorta torácica para quantificação de deposição lipídica por “*en face*” e a aorta abdominal para determinação de LDL oxidada, atividade das enzimas de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

4.7. Coleta de sangue e perfusão

As amostras de sangue foram coletadas por meio de punção cardíaca, com seringa de 1 mL e agulha de insulina. As amostras foram transferidas para tubos secos e centrifugados a 3000 rpm, por 10 min, em seguida o soro separado e armazenado a -20°C. Ao final da coleta de sangue, o animal recebeu perfusão com tampão fosfato PBS (pH 7,4) por meio do ventrículo esquerdo para total retirada do sangue remanescente.

4.8. Dosagens bioquímicas

As dosagens de colesterol total, colesterol HDL, triglicerídeos foram realizadas nas amostras do soro sanguíneo, utilizando *kits* comerciais (BIOCLIN, Rio de Janeiro, Brasil), seguindo as instruções do fabricante, por meio do ensaio colorimétrico. A determinação do colesterol LDL foi realizada por meio da equação de Friedewald (Friedewald, 1972): $LDL = \text{Colesterol Total} - HDL - (\text{Triglicerídeos}/5)$. (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972).

4.9. Detecção de LDL oxidada

A determinação de LDL oxidada foi realizada nas amostras da aorta abdominal, utilizando kit ELISA (Elabscience, WuHan, China, E-EL-M0066), de acordo com as instruções do fabricante. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Filter Max F3/F5 Multi-Mode Microplate Readers) em 450 nm com resultados expressos em U/L.

4.10. Análise da deposição lipídica vascular

As amostras previamente submetidas à preparação “*en face*” formam destinadas para a observação de deposição lipídica, por meio de coloração com o marcador de lipídeos *Oil-Red* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Todas as amostras foram submersas em solução alcoólica com *Oil-Red* por um minuto 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 e posteriormente digitalizadas para análise morfométrica pelo software “Image J” (domínio público – National Institute of Health, USA). (PAIGEN et al., 1987)

4.11. Ensaio de superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi realizada em amostra do homogenato da aorta abdominal pelo método de Misra e Fradovich (1972). O meio de reação foi composto de 1,0 ml de tampão de carbonato (0,2 M, pH 10,2), KCl 0,8 ml (0,015 M), 40 µl de homogenato e água de modo a atingir o volume final de 3,0 ml. A reação foi iniciada pela adição de 0,2 ml de epinefrina (0,025 M). A alteração na absorbância foi registrada a 480nm em intervalos de 15 segundos durante um minuto a 25 °C. A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A reação consiste na inibição da auto oxidação da epinefrina em adenocromo, na presença de SOD. Uma atividade da enzima é definida como a quantidade de enzima que provoca 50% de inibição da auto oxidação de epinefrina. Os resultados foram expressos como Unidade de SOD/mg de proteína,

4.12. Ensaio da Catalase (CAT)

A determinação da atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada no homogenato da aorta abdominal de acordo com o descrito por Aebi (1984) com modificações. As amostras foram preparadas e acondicionadas em banho de gelo até o momento do ensaio. Numa cubeta de quartzo foram adicionados 2mL de tampão fosfato (0,050 M, pH 7,4) e 60 µl da amostra, a reação se inicia pela ação de 40 µl de peróxido de oxigênio (H₂O₂) (0,066 M em tampão de fosfato). As absorbâncias em 240 nm foram registradas a cada 15 segundos, pelo intervalo de 1 minuto. A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome metade do H₂O₂ em um minuto a 25°C. Os resultados foram expressos como Coeficiente de extinção do peróxido por minuto ($\Delta E \cdot \text{min}/\text{mg}$ proteína).

4.13. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média, mais ou menos o erro padrão da média (E.P.M.), submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA). A diferença entre as médias foi determinada por teste *post-hoc* de Tukey, ajustado para múltiplas comparações, com significância aceita acima de 5% ($p < 0,05$).

5. Resultados

Na figura 3 estão expressos os dados da análise *en face* de aorta torácica de camundongos *knockout* para o receptor LDL dos diferentes grupos experimentais. Como esperado, o grupo CAST teve um aumento significativo na área de lesão em relação ao grupo SHAM. A área de lesão foi menor nos grupos CAST+K e CAST+T, quando comparado ao grupo CAST e a associação dos tratamentos CAST+K+T teve uma redução na área de lesão quando comparado com os grupos CAST+K, e CAST+T (SHAM: $0,8092 \pm 0,1707$; CAST: $4,051 \pm 0,5068$; CAST+K: $1,527 \pm 0,3157$; CAST+T: $1,645 \pm 0,1993$; CAST+K+T: $0,6205 \pm 0,0782$).

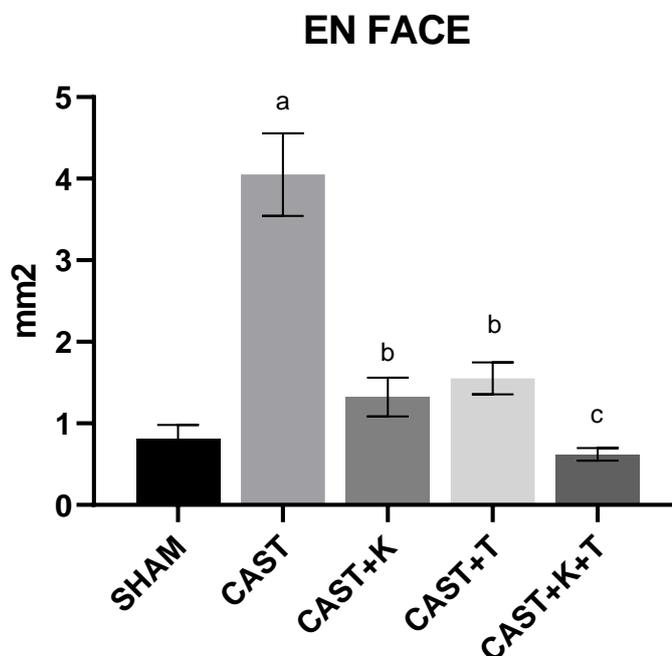


Figura 3: Dados da análise de deposição lipídica (*en face*) (mm^2) dos animais do grupo controle com cirurgia fictícia (SHAM), castrados (CAST), castrados que receberam Kefir (CAST+K), castrados que receberam reposição com testosterona (CAST+T) e castrados que receberam kefir e reposição com testosterona (CAST+K+T). Dados expressos como média \pm EPM. ^a $p \leq 0,01$ em relação ao grupo SHAM; ^b $p \leq 0,01$ em relação ao grupo CAST; ^c $p \leq 0,01$ em relação ao grupo CAST+T.

Na figura 4 analisamos a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDLox) na aorta de camundongos *knockout* para o receptor LDL, onde o grupo CAST apresentou maior oxidação de lipoproteínas quando comparado ao grupo controle SHAM, já o grupo CAST+K teve uma menor oxidação de lipoproteínas em comparação ao grupo

CAST. A oxidação de lipoproteínas também foi menor no grupo CAST+K+T quando comparado ao CAST+T (SHAM: $0,058 \pm 0,0039$; CAST: $0,0878 \pm 0,0074$; CAST+K: $0,0623 \pm 0,0024$; CAST+T: $0,0741 \pm 0,0081$; CAST+K+T: $0,0653 \pm 0,0018$).

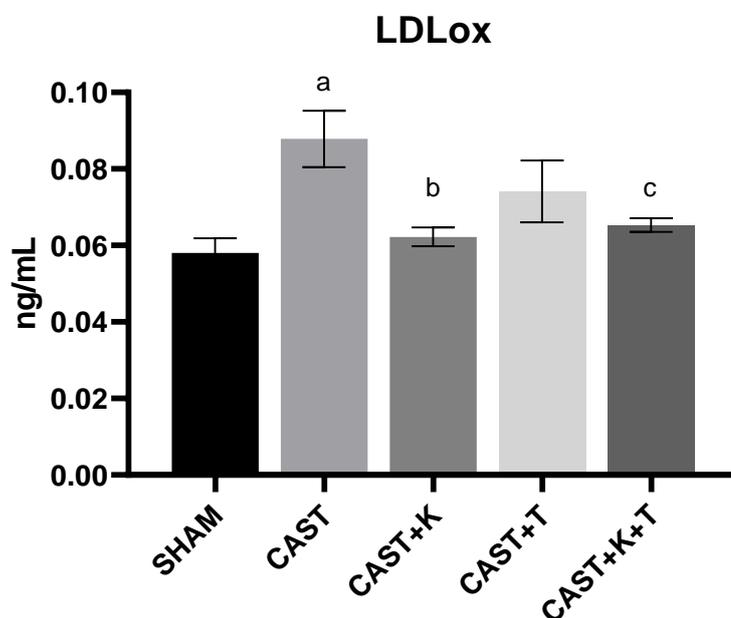


Figura 4: Dados da análise da oxidação de LDL (LDLox) (ng/mL) dos animais do grupo controle com cirurgia fictícia (SHAM), castrados (CAST), castrados que receberam Kefir (CAST+K), castrados que receberam reposição com testosterona (CAST+T) e castrados que receberam kefir e reposição com testosterona (CAST+K+T). Dados expressos como média \pm EPM. ^a $p \leq 0,01$ em relação ao grupo SHAM; ^b $p \leq 0,01$ em relação ao grupo CAST; ^c $p \leq 0,01$ em relação ao grupo CAST+T.

Na figura 5 estão representadas a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (A) e catalase (CAT) (B) nas aortas de camundongos knockout para o receptor LDL. A atividade da SOD teve uma menor expressão nos grupos CAST em comparação com os animais SHAM, a qual foi a aumentada nos grupos castrados e que receberam algum tipo de tratamento. Além disso, o grupo CAST+K+T apresentou atividade aumentada em relação aos demais grupos tratados (CAST+K, CAST+T (SHAM: $13,6600 \pm 1,1180$; CAST: $8,0670 \pm 0,7417$; CAST+K: $15,3900 \pm 0,5335$; CAST+T: $13,3500 \pm 0,4900$; CAST+K+T: $19,2400 \pm 1,5610$). Em relação a enzima CAT, não houve diferença na sua atividade entre os grupos experimentais (SHAM: $5,7820 \pm 2,1860$; CAST: $8,1160 \pm 1,7640$; CAST+K: $24,6100 \pm 5,6320$; CAST+T: $12,8700 \pm 3,1660$; CAST+K+T: $26,1700 \pm 5,0940$).

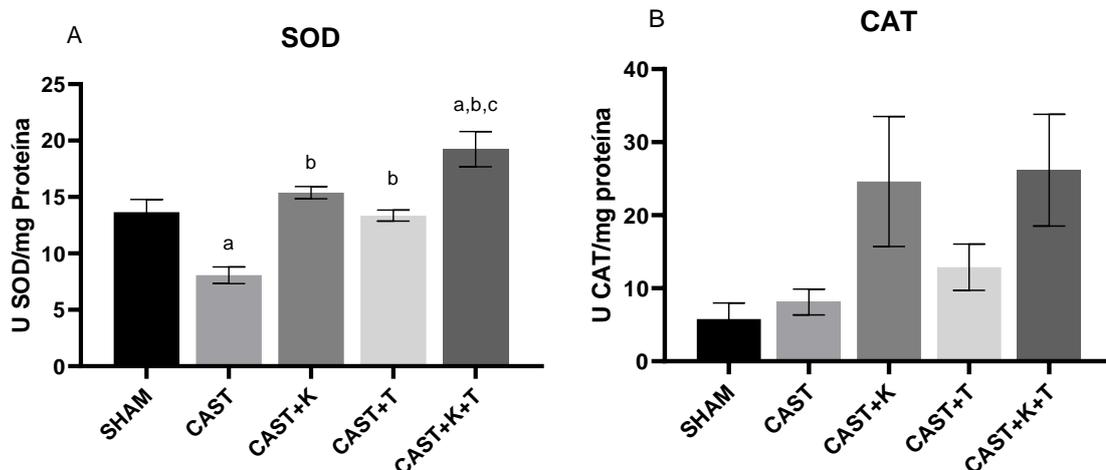


Figura 5: Dados da análise da enzima superóxido dismutase (SOD) (A) e catalase (CAT) (B) dos animais do grupo controle com cirurgia fictícia (SHAM), castrados (CAST), castrados que receberam Kefir (CAST+K), castrados que receberam reposição com testosterona (CAST+T) e castrados que receberam kefir e reposição com testosterona (CAST+K+T). Dados expressos como média \pm EPM. ^a $p \leq 0,01$ em relação ao grupo SHAM; ^b $p \leq 0,01$ em relação ao grupo CAST; ^c $p \leq 0,01$ em relação ao grupo CAST+T.

A Figura 6 apresenta os dados de ganho de peso dos animais experimentais. Como esperado o grupo CAST teve um maior ganho de peso quando comparado com os animais SHAM, e os grupos CAST+K, CAST+T e CAST+K+T apresentação um menor ganho de peso quando comparado ao grupo que realizou a cirurgia de castração (CAST) (SHAM: $7,5710 \pm 0,6851$; CAST: $12,7500 \pm 0,7500$; CAST+ K: $7,8330 \pm 0,4014$; CAST+T: $7,0000 \pm 0,0500$; CAST+K+T: $6,3000 \pm 0,6839$).

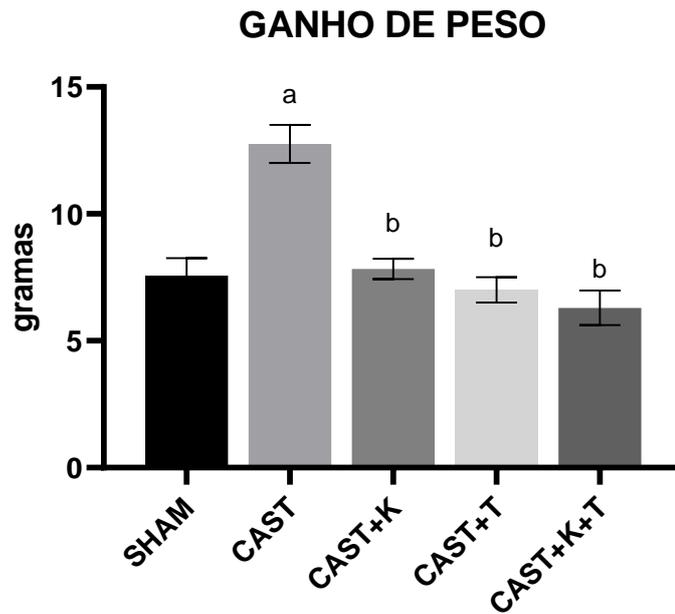


Figura 6: Dados de ganho de peso (g) dos animais do grupo controle com cirurgia fictícia (SHAM), castrados (CAST), castrados que receberam Kefir (CAST+K), castrados que receberam reposição com testosterona (CAST+T) e castrados que receberam kefir e reposição com testosterona (CAST+K+T). Dados expressos como média \pm EPM. ^a $p \leq 0,01$ em relação ao grupo SHAM; ^b $p \leq 0,01$ em relação ao grupo CAST.

Na tabela 1 estão apresentados os resultados dos parâmetros bioquímicos relacionados ao perfil lipídico dos grupos SHAM, CAST, CAST+K, CAST+T e CAST+K+T. Não houve diferença em nenhum desses parâmetros nos animais estudados.

Tabela 1: Dados de perfil lipídico dos animais do grupo controle com cirurgia fictícia (SHAM), castrados (CAST), castrados que receberam Kefir (CAST+K), castrados que receberam reposição com testosterona (CAST+T) e castrados que receberam kefir e testosterona (CAST+K+T). Dados expressos como média \pm EPM.

PARÂMETRO	GRUPOS				
	SHAM	CAST	CAST+K	CAST+T	CAST+K+T
COLESTEROL TOTAL	255 \pm 23	253 \pm 14	242 \pm 15	287 \pm 41	276 \pm 57
TRIGLICERÍDEOS	115 \pm 25	97 \pm 14	99 \pm 17	135 \pm 24	152 \pm 23
HDL	75 \pm 12	77 \pm 11	77 \pm 14	81 \pm 39	75 \pm 18
LDL	49 \pm 16	38 \pm 60	53 \pm 70	79 \pm 17	48 \pm 20
NÃO-HDL	147 \pm 36	148 \pm 28	145 \pm 53	143 \pm 53	143 \pm 61

6. Discussão

Camundongos nocautes para receptor de LDL têm sido utilizados como modelo para investigar os mecanismos envolvidos no processo da aterosclerose (FRIQUES et al., 2015; SANTANNA et al., 2017; BARBOZA et al., 2018). Esse modelo é caracterizado por sofrer um silenciamento do gene que codifica LDL receptor e apresentar níveis de colesterol no plasma aumentados, quando tratados com dieta hipercolesterolêmica desenvolvem aterosclerose (MILASAN et al., 2019; EL GOLLI-BENNOUR et al., 2019; LU et al., 2020). Nossos resultados indicam que a orquiectomia promoveu o desenvolvimento significativo $p \leq 0,01$ na área de lesão aterosclerótica nos animais castrados em comparação aos demais grupos. igualmente aos nossos achados Alsiraj et al., (2019) demonstraram que o procedimento de orquiectomia independente da dieta hiperlipídica foi responsável por desenvolver um aumento na placa de aterosclerose em camundongos nocautes para receptor de LDL. Trazendo indícios da influência da testosterona no metabolismo dos lípidos e do colesterol, que ainda precisa ser investigada.

O aumento do colesterol total e da fração LDL são fatores associados ao maior risco de aterosclerose e de doença coronariana (KASSI et al., 2013; WOLF et al., 2019). No entanto, em nossa pesquisa, não foram encontradas diferenças significativas entre os resultados do perfil lipídico, apesar da testosterona ser sintetizada a partir do colesterol através de cadeias enzimáticas dentro das células de Leydig, localizadas no interstício do testículo maduro, o colesterol utilizado para a síntese de testosterona pode ser obtido através de ésteres de colesterol armazenados na matriz intracelular ou a partir de lipoproteínas de baixa densidade colesterol extracelular. Considerando que a testosterona é produzida nos testículos e nas adrenais, é necessário esclarecer se a glândula adrenal assume papel compensatório endócrino após orquiectomia, no entanto, apenas esses dados são insuficientes para estabelecer uma relação definitiva entre o hipogonadismo masculino e a aterosclerose (LIU et al., 2016; AUERBACH et al., 2020).

O uso crônico tanto do kefir quanto da reposição hormonal demonstraram uma diminuição significativa no desenvolvimento da placa de aterosclerose, comparado ao grupo castrado, além disso, a associação entre kefir e reposição hormonal com testosterona determinou uma redução mais acentuada da deposição lipídica no arco

da aorta dos animais LDL^{-/-}. Wilhelmson et al., (2018) avaliou a castração pré-puberal de camundongos machos apoE, após 11 semanas do procedimento de orquiectomia, os animais castrados aumentaram a aterosclerose em comparação aos demais grupos reafirmando nossos achados de que a testosterona protege contra a aterosclerose em camundongos machos, nossos resultados foram significativos sobre o desenvolvimento da placa de aterosclerose e são independentes de alterações no perfil lipídico dos animais, reforçando a importante ação do kefir sobre o estresse oxidativo. A Formação das LDL oxidadas exerce uma função importante no processo inflamatório de formação da placa, reforçam o papel do estresse oxidativo na aterosclerose, as espécies reativas de oxigênio liberadas pelos macrófagos sobre ox-LDL formam moléculas hiper oxidadas, causando sua transformação em células espumosas que, associadas aos leucócitos, formam camadas de gordura arteriais, secretam fatores de crescimento que induzem a migração e proliferação das células de musculo liso para a camada intima. Em um estudo recente Tung et al., (2020) demonstraram uma redução da deposição de lipídeos aórticos em camundongos ApoE, tratados com administração oral de peptídeos kefir e, além disso, os resultados sugeriram que os peptídeos do kefir desempenham um papel na prevenção da aterosclerose, modulando as respostas das células imunes, reduzindo as produções de espécies reativas de oxigênios (EROs) e LDLox.

Dessa forma, os achados observados nos animais tratados com kefir do presente estudo, demonstram uma importante redução na expressão de LDLox, a oxidação de lipoproteínas foi menor no grupo CAST+K+T quando comparado ao CAST+T, reforçando a interação do kefir na redução dessa expressão, as LDLox seriam fagocitadas para formar as células espumosas no processo aterosclerótico, reforçando que a redução da LDLox desempenha um papel importante na redução da formação da placa de aterosclerose. Nossos resultados também se sustentam nos resultados de Mitra et al., (2011) que afirmou que LDLox está presente em todas as etapas da aterosclerose, provocado pelo estado pró-oxidante, desde o início até os eventos trombóticos agudos, a LDLox também é responsável pela ruptura da capa fibrosa e formação de coágulo de plaquetas em artérias estreitadas, resultando em síndromes clínicas de isquemia tecidual.

O estresse oxidativo também contribui para aumento na oxidação de LDLs, formando as LDLs oxidadas, que desempenham um importante papel na iniciação e

progressão da aterosclerose. A oxidação de LDL leva à formação de epítomos, como resultado da decomposição oxidativa dos ácidos graxos. Filete et al., (2020) demonstraram que homens com baixos níveis de testosterona apresentaram maior oxidação de LDL, o que pode predizer um alto risco aterosclerótico. Como o Kefir possui ação antioxidante já observada na literatura, se esperava uma diminuição na oxidação de LDL nos grupos tratados com kefir (FRIQUES et al., 2015; SANTANNA et al., 2017; BARBOZA et al., 2018).

De acordo com os resultados obtidos, o tratamento com a kefir associado a terapia de reposição hormonal também foi capaz de melhorar a expressão da enzima superóxido dismutase (SOD), que é responsável por constituir os sistemas de defesa do organismo contra os radicais superóxido e são rapidamente induzidas em algumas condições como a exposição ao estresse oxidativo, e sua atividade pode aumentar para compensar a excessiva produção de radicais superóxido, o aumento observado na atividade da enzima sugere uma resposta adaptativa do organismo no combate aos possíveis danos determinados pelos radicais livres de oxigênio. corroborando com o estudo de El Golli-Bennour et al (2019) que o tratamento com Kefir restaurou as atividades da SOD e catalase, entretanto, em nosso tratamento não foi observado alterações da enzima catalase, esses dados estão de acordo com a pesquisa realizada por Lu., et al (2020).

Em resumo, os resultados do perfil lipídico sérico dos camundongos obtidos no presente trabalho, não apresentaram diferença significativa entre os grupos, se assemelhando aos resultados de Santanna et al. (2017), que não observou alterações no perfil lipídico após tratamento com fração solúvel de Kefir, mas com redução da deposição lipídica em aorta, Outro fator importante a se levar em consideração foi a ausência do tratamento com à dieta aterogênica observada em estudos com o mesmo modelo animal, demonstrando a influência da dieta aterogênica sobre a modificação genética desses camundongos no desenvolvimento de hipercolesterolemia o que corrobora com a maioria dos estudos encontrados na literatura. (MILASAN et al., 2019; EL GOLLI-BENNOUR et al., 2019; LU et al., 2020)

7. Conclusão

Em conclusão presente estudo demonstrou que o tratamento dos camundongos castrados tratados com kefir obtiveram menor deposição lipídica na aorta, diminuição da expressão de LDL oxidado e uma melhora na atividade da SOD e seus resultados são expressivamente melhorados quando associado ao uso do tratamento com reposição hormonal. No entanto, mais estudos são necessários para aprofundar investigar os mecanismos responsáveis por essa associação.

8. Referências

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3. PMID: 6727660.

Agretti P, Pelosini C, Bianchi L, Grosso AD, Saba A, Canale D, Sessa MR. Importance of total and measured free testosterone in diagnosis of male hypogonadism: immunoassay versus mass spectrometry in a population of healthy young/middle-aged blood donors. *J Endocrinol Invest.* 2021 Feb;44(2):321-326. doi: 10.1007/s40618-020-01304-7. Epub 2020 May 30. PMID: 32474765.

AlSiraj Y, Chen X, Thatcher SE, Temel RE, Cai L, Blalock E, Katz W, Ali HM, Petriello M, Deng P, Morris AJ, Wang X, Lusic AJ, Arnold AP, Reue K, Thompson K, Tso P, Cassis LA. XX sex chromosome complement promotes atherosclerosis in mice. *Nat Commun.* 2019 Jun 14;10(1):2631. doi: 10.1038/s41467-019-10462-z. PMID: 31201301; PMCID: PMC6643208.

Araujo AB, Esche GR, Kupelian V, O'Donnell AB, Travison TG, Williams RE, Clark RV, McKinlay JB. Prevalence of symptomatic androgen deficiency in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Nov;92(11):4241-7. doi: 10.1210/jc.2007-1245. Epub 2007 Aug 14. PMID: 17698901.

Atlantis E, Martin SA, Haren MT, O'Loughlin PD, Taylor AW, Anand-Ivell R, Ivell R, Wittert GA; Members of the Florey Adelaide Male Ageing Study. Demographic, physical and lifestyle factors associated with androgen status: the Florey Adelaide Male Ageing Study (FAMAS). *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009 Aug;71(2):261-72. doi: 10.1111/j.1365-2265.2008.03463.x. Epub 2008 Oct 26. PMID: 19178527.

Auerbach JM, Khera M. Hypogonadism management and cardiovascular health. *Postgrad Med.* 2020 Dec;132(sup4):35-41. doi: 10.1080/00325481.2020.1805917. Epub 2020 Oct 19. PMID: 32799602.

Barboza KRM, Coco LZ, Alves GM, Peters B, Vasquez EC, Pereira TMC, Meyrelles SS, Campagnaro BP. Gastroprotective effect of oral kefir on indomethacin-induced acute gastric lesions in mice: Impact on oxidative stress. *Life Sci.* 2018 Sep 15;209:370-376. doi: 10.1016/j.lfs.2018.08.035. Epub 2018 Aug 16. PMID: 30120965.

Barnouin Y, Armamento-Villareal R, Celli A, Jiang B, Paudyal A, Nambi V, Bryant MS, Marcelli M, Garcia JM, Qualls C, Villareal DT. Testosterone Replacement Therapy added to Intensive Lifestyle Intervention in Older Men with Obesity and Hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020 Dec 22:dga917. doi: 10.1210/clinem/dga917. Epub ahead of print. PMID: 33351921.

Barry-Lane PA, Patterson C, van der Merwe M, Hu Z, Holland SM, Yeh ET, Runge MS. p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice. *J Clin Invest.* 2001 Nov;108(10):1513-22. doi: 10.1172/JCI11927. PMID: 11714743; PMCID: PMC209414.

Basaria S, Harman SM, Travison TG, Hodis H, Tsitouras P, Budoff M, Pencina KM, Vita J, Dzekov C, Mazer NA, Coviello AD, Knapp PE, Hally K, Pinjic E, Yan M, Storer TW, Bhasin S. Effects of Testosterone Administration for 3 Years on Subclinical

Atherosclerosis Progression in Older Men With Low or Low-Normal Testosterone Levels: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2015 Aug 11;314(6):570-81. doi: 10.1001/jama.2015.8881. PMID: 26262795.

Basaria S. Male hypogonadism. *Lancet*. 2014 Apr 5;383(9924):1250-63. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61126-5. Epub 2013 Oct 10. PMID: 24119423.

Bengoa AA, Iraporda C, Garrote GL, Abraham AG. Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *J Appl Microbiol*. 2019 Mar;126(3):686-700. doi: 10.1111/jam.14107. Epub 2018 Oct 18. PMID: 30218595.

BERGMANN, Rafaela Strada de Oliveira et al. Microbial profile of a kefir sample preparations: grains in natura and lyophilized and fermented suspension. *Food Science and Technology*, v. 30, n. 4, p. 1022-1026, 2010.

Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, Montori VM; Task Force, Endocrine Society. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Jun;95(6):2536-59. doi: 10.1210/jc.2009-2354. PMID: 20525905.

Bhasin S, Parker RA, Sattler F, Haubrich R, Alston B, Umbleja T, Shikuma CM; AIDS Clinical Trials Group Protocol A5079 Study Team. Effects of testosterone supplementation on whole body and regional fat mass and distribution in human immunodeficiency virus-infected men with abdominal obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Mar;92(3):1049-57. doi: 10.1210/jc.2006-2060. Epub 2006 Dec 12. PMID: 17164307.

Bianchi VE. The Anti-Inflammatory Effects of Testosterone. *J Endocr Soc*. 2018 Oct 22;3(1):91-107. doi: 10.1210/js.2018-00186. PMID: 30582096; PMCID: PMC6299269.

Boden WE, Miller MG, McBride R, Harvey C, Snabes MC, Schmidt J, McGovern ME, Fleg JL, Desvigne-Nickens P, Anderson T, Kashyap M, Probstfield JL. Testosterone concentrations and risk of cardiovascular events in androgen-deficient men with atherosclerotic cardiovascular disease. *Am Heart J*. 2020 Jun;224:65-76. doi: 10.1016/j.ahj.2020.03.016. Epub 2020 Mar 20. PMID: 32335402.

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 Nov;151(11):5428-37. doi: 10.1210/en.2010-0663. Epub 2010 Sep 22. PMID: 20861231.

Brasil GA, Silva-Cutini MA, Moraes FSA, Pereira TMC, Vasquez EC, Lenz D, Bissoli NS, Endringer DC, de Lima EM, Biancardi VC, Maia JF, de Andrade TU. The benefits of soluble non-bacterial fraction of kefir on blood pressure and cardiac hypertrophy in hypertensive rats are mediated by an increase in baroreflex sensitivity and decrease in angiotensin-converting enzyme activity. *Nutrition*. 2018 Jul-Aug;51-52:66-72. doi: 10.1016/j.nut.2017.12.007. Epub 2018 Feb 7. PMID: 29605766.

Budoff MJ, Ellenberg SS, Lewis CE, Mohler ER 3rd, Wenger NK, Bhasin S, Barrett-Connor E, Swerdloff RS, Stephens-Shields A, Cauley JA, Crandall JP, Cunningham GR, Ensrud KE, Gill TM, Matsumoto AM, Molitch ME, Nakanishi R, Nezarat N, Matsumoto S, Hou X, Basaria S, Diem SJ, Wang C, Cifelli D, Snyder PJ. Testosterone Treatment and Coronary Artery Plaque Volume in Older Men With Low Testosterone. *JAMA*. 2017 Feb 21;317(7):708-716. doi: 10.1001/jama.2016.21043. PMID: 28241355; PMCID: PMC5465430.

Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2018 Sep;1859(9):940-950. doi: 10.1016/j.bbabi.2018.05.019. Epub 2018 May 31. PMID: 29859845.

Cao H, Jia Q, Yan L, Chen C, Xing S, Shen D. Quercetin Suppresses the Progression of Atherosclerosis by Regulating MST1-Mediated Autophagy in ox-LDL-Induced RAW264.7 Macrophage Foam Cells. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 3;20(23):6093. doi: 10.3390/ijms20236093. PMID: 31816893; PMCID: PMC6928812.

Carrageta DF, Oliveira PF, Alves MG, Monteiro MP. Obesity and male hypogonadism: Tales of a vicious cycle. *Obes Rev*. 2019 Aug;20(8):1148-1158. doi: 10.1111/obr.12863. Epub 2019 Apr 29. PMID: 31035310.

Casquero AC, Berti JA, Salerno AG, Bighetti EJ, Cazita PM, Ketelhuth DF, Gidlund M, Oliveira HC. Atherosclerosis is enhanced by testosterone deficiency and attenuated by CETP expression in transgenic mice. *J Lipid Res*. 2006 Jul;47(7):1526-34. doi: 10.1194/jlr.M600135-JLR200. Epub 2006 Apr 7. PMID: 16603720.

Chen YH, Chen HL, Fan HC, Tung YT, Kuo CW, Tu MY, Chen CM. Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antifibrotic Effects of Kefir Peptides on Salt-Induced Renal Vascular Damage and Dysfunction in Aged Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Aug 26;9(9):790. doi: 10.3390/antiox9090790. PMID: 32858955; PMCID: PMC7555286.

Chen Z, Shi J, Yang X, Nan B, Liu Y, Wang Z. 2015. Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. *Int. Dairy J*, v. 43, p. 15–21.

Chrysant SG, Chrysant GS. Cardiovascular benefits and risks of testosterone replacement therapy in older men with low testosterone. *Hosp Pract (1995)*. 2018 Apr;46(2):47-55. doi: 10.1080/21548331.2018.1445405. Epub 2018 Mar 1. PMID: 29478348.

Corona G, Rastrelli G, Vignozzi L, Mannucci E, Maggi M. How to recognize late-onset hypogonadism in men with sexual dysfunction. *Asian J Androl*. 2012 Mar;14(2):251-9. doi: 10.1038/aja.2011.138. Epub 2012 Jan 30. PMID: 22286862; PMCID: PMC3735094.

Dalmaso C, Patil CN, Yanes Cardozo LL, Romero DG, Maranon RO. Cardiovascular and Metabolic Consequences of Testosterone Supplements in Young and Old Male Spontaneously Hypertensive Rats: Implications for Testosterone Supplements in Men. *J Am Heart Assoc*. 2017 Oct 17;6(10):e007074. doi: 10.1161/JAHA.117.007074. PMID: 29042425; PMCID: PMC5721890

de Almeida Silva M, Mowry FE, Peaden SC, Andrade TU, Biancardi VC. Kefir ameliorates hypertension via gut-brain mechanisms in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem*. 2020 Mar;77:108318. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.108318. Epub 2019 Dec 12. PMID: 31923755.

Deng L, Fu D, Zhu L, Huang J, Ling Y, Cai Z. Testosterone deficiency accelerates early stage atherosclerosis in miniature pigs fed a high-fat and high-cholesterol diet: urine ¹H NMR metabolomics targeted analysis. *Mol Cell Biochem*. 2020 Nov 23. doi: 10.1007/s11010-020-03987-1. Epub ahead of print. PMID: 33226572.

Dohle GR, Dinkelman-Smit M. Re: risk of myocardial infarction in older men receiving testosterone therapy. *Eur Urol*. 2015 Oct;68(4):739-40. doi: 10.1016/j.eururo.2015.06.035. PMID: 26334123.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002 Jan;82(1):47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001. PMID: 11773609.

Ebner J, Aşçı Arslan A, Fedorova M, Hoffmann R, Küçükçetin A, Pischetsrieder M. Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains. *J Proteomics*. 2015 Mar 18;117:41-57. doi: 10.1016/j.jprot.2015.01.005. Epub 2015 Jan 19. PMID: 25613046.

El Golli-Bennour E, Timoumi R, Annaibi E, Mokni M, Omezzine A, Bacha H, Abid-Essefi S. Protective effects of kefir against deltamethrin-induced hepatotoxicity in rats. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019 Jun;26(18):18856-18865. doi: 10.1007/s11356-019-05253-4. Epub 2019 May 7. PMID: 31062243.

Fàbregues F, Solernou R, Ferreri J, Guimerá M, Peralta S, Casals G, Peñarrubia J, Creus M, Manau D. Comparison of GnRH agonist versus luteal estradiol GnRH antagonist protocol using transdermal testosterone in poor responders. *JBRA Assist Reprod*. 2019 Apr 30;23(2):130-136. doi: 10.5935/1518-0557.20180090. PMID: 30614665; PMCID: PMC6501741.

FARAG MA, JOMAA SA, EL-WAHED AA, EL-SEEDI AHR. The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety. *Nutrients*. 2020 Jan 28;12(2):346. doi: 10.3390/nu12020346. PMID: 32013044; PMCID: PMC7071183.

Fathi Y, Ghodrati N, Zibaeenezhad MJ, Faghieh S. Kefir drink causes a significant yet similar improvement in serum lipid profile, compared with low-fat milk, in a dairy-rich diet in overweight or obese premenopausal women: A randomized controlled trial. *J Clin Lipidol*. 2017 Jan-Feb;11(1):136-146. doi: 10.1016/j.jacl.2016.10.016. Epub 2016 Nov 9. PMID: 28391880.

Fernández-Balsells MM, Murad MH, Lane M, Lampropulos JF, Albuquerque F, Mullan RJ, Agrwal N, Elamin MB, Gallegos-Orozco JF, Wang AT, Erwin PJ, Bhasin S, Montori VM. Clinical review 1: Adverse effects of testosterone therapy in adult men: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Jun;95(6):2560-75. doi: 10.1210/jc.2009-2575. PMID: 20525906.

Finkelstein JS, Lee H, Burnett-Bowie SA, Pallais JC, Yu EW, Borges LF, Jones BF, Barry CV, Wulczyn KE, Thomas BJ, Leder BZ. Gonadal steroids and body

composition, strength, and sexual function in men. *N Engl J Med.* 2013 Sep 12;369(11):1011-22. doi: 10.1056/NEJMoa1206168. PMID: 24024838; PMCID: PMC4142768.

Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griending KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res.* 2018 Mar 16;122(6):877-902. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311401. PMID: 29700084; PMCID: PMC5926825.

Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2017 Feb 17;120(4):713-735. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309326. PMID: 28209797.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972 Jun;18(6):499-502. PMID: 4337382.

Frigues AG, Arpini CM, Kalil IC, Gava AL, Leal MA, Porto ML, Nogueira BV, Dias AT, Andrade TU, Pereira TM, Meyrelles SS, Campagnaro BP, Vasquez EC. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Transl Med.* 2015 Dec 30;13:390. doi: 10.1186/s12967-015-0759-7. PMID: 26715471; PMCID: PMC4696190.

Gagliano-Jucá T, Basaria S. Testosterone replacement therapy and cardiovascular risk. *Nat Rev Cardiol.* 2019 Sep;16(9):555-574. doi: 10.1038/s41569-019-0211-4. PMID: 31123340.

Grossmann M, Ng Tang Fui M, Cheung AS. Late-onset hypogonadism: metabolic impact. *Andrology.* 2020 Nov;8(6):1519-1529. doi: 10.1111/andr.12705. Epub 2019 Sep 25. PMID: 31502758.

Güven A, Güven A, Gülmez M. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003 Oct;50(8):412-6. doi: 10.1046/j.1439-0450.2003.00693.x. PMID: 14633213.

Hamida RS, Shami A, Ali MA, Almohawes ZN, Mohammed AE, Bin-Meferij MM. Kefir: A protective dietary supplementation against viral infection. *Biomed Pharmacother.* 2021 Jan;133:110974. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110974. Epub 2020 Nov 11. PMID: 33186795; PMCID: PMC7655491.

Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res.* 2016 Feb 19;118(4):535-46. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307611. PMID: 26892956.

Iannantuoni F, Salazar JD, Martinez de Marañón A, Bañuls C, López-Domènech S, Rocha M, Hurtado-Murillo F, Morillas C, Gómez-Balaguer M, Víctor VM. Testosterone administration increases leukocyte-endothelium interactions and inflammation in transgender men. *Fertil Steril.* 2020 Oct 5:S0015-0282(20)30722-6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.08.002. Epub ahead of print. PMID: 33032814.

Iglesias P, Prado F, Ridruejo E, Muñoz A, Macías MC, Guerrero MT, Tajada P, García-Arévalo C, Díez JJ. Hypogonadism and Mortality in Aged Hospitalized Male Patients: A 5-Year Prospective Observational Study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2015 Nov;123(10):589-93. doi: 10.1055/s-0035-1564119. Epub 2015 Nov 24. PMID: 26600053.

Kassi E, Adamopoulos C, Basdra EK, Papavassiliou AG. Role of vitamin D in atherosclerosis. *Circulation*. 2013 Dec 3;128(23):2517-31. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002654. PMID: 24297817.

Kattoor AJ, Kanuri SH, Mehta JL. Role of Ox-LDL and LOX-1 in Atherogenesis. *Curr Med Chem*. 2019;26(9):1693-1700. doi: 10.2174/0929867325666180508100950. PMID: 29737246.

Keevil BG, Adaway J. Assessment of free testosterone concentration. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2019 Jun;190:207-211. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.04.008. Epub 2019 Apr 7. PMID: 30970279.

Kelly DM, Jones TH. Testosterone and obesity. *Obes Rev*. 2015 Jul;16(7):581-606. doi: 10.1111/obr.12282. Epub 2015 May 15. PMID: 25982085.

Khosravi M, Poursaleh A, Ghasempour G, Farhad S, Najafi M. The effects of oxidative stress on the development of atherosclerosis. *Biol Chem*. 2019 May 27;400(6):711-732. doi: 10.1515/hsz-2018-0397. PMID: 30864421.

Kim DH, Kim H, Jeong D, Kang IB, Chon JW, Kim HS, Song KY, Seo KH. Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers. *J Nutr Biochem*. 2017 Jun;44:35-43. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.02.014. Epub 2017 Mar 4. PMID: 28384519.

Kloner RA, Carson C 3rd, Dobs A, Kopecky S, Mohler ER 3rd. Testosterone and Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Feb 9;67(5):545-57. doi: 10.1016/j.jacc.2015.12.005. PMID: 26846952.

Koskenniemi JJ, Virtanen HE, Toppari J. Testicular growth and development in puberty. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2017 Jun;24(3):215-224. doi: 10.1097/MED.0000000000000339. PMID: 28248755.

Kovac JR, Pan M, Arent S, Lipshultz LI. Dietary Adjuncts for Improving Testosterone Levels in Hypogonadal Males. *Am J Mens Health*. 2016 Nov;10(6):NP109-NP117. doi: 10.1177/1557988315598554. Epub 2015 Aug 13. PMID: 26272885.

Kwong JCC, Krakowsky Y, Grober E. Testosterone Deficiency: A Review and Comparison of Current Guidelines. *J Sex Med*. 2019 Jun;16(6):812-820. doi: 10.1016/j.jsxm.2019.03.262. Epub 2019 May 9. PMID: 31080101.

Leite AM, Leite DC, Del Aguila EM, Alvares TS, Peixoto RS, Miguel MA, Silva JT, Paschoalin VM. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *J Dairy Sci*. 2013 Jul;96(7):4149-59. doi: 10.3168/jds.2012-6263. Epub 2013 Apr 28. PMID: 23628252.

Levy S, Arguello M, Macki M, Rao SD. Pituitary Dysfunction Among Men Presenting with Hypogonadism. *Curr Urol Rep*. 2019 Nov 16;20(11):78. doi: 10.1007/s11934-019-0935-z. PMID: 31734886.

Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, Tokgözoğlu L, Lewis EF. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Aug 16;5(1):56. doi: 10.1038/s41572-019-0106-z. PMID: 31420554.

Liu JR, Wang SY, Lin YY, Lin CW. Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. *Nutr Cancer*. 2002;44(2):183-7. doi: 10.1207/S15327914NC4402_10. PMID: 12734066.

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 Jan 15;469(3):456-62. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.064. Epub 2015 Nov 22. PMID: 26592663.

LONDERO A, HAMET MF, DE ANTONI GL, GARROTE GL, ABRAHAM AG. Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterisation. *J Dairy Res*. 2012 Aug;79(3):262-71. doi: 10.1017/S0022029912000179. Epub 2012 Apr 17. PMID: 22717048.

Lu Y, Sun Y, Jiang Z, Zhang D, Lin H, Qu Y, Shang C, Zhao M, Cui X. Guanxinshutong Alleviates Atherosclerosis by Suppressing Oxidative Stress and Proinflammation in ApoE^{-/-} Mice. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2020 Sep 16;2020:1219371. doi: 10.1155/2020/1219371. PMID: 33014098; PMCID: PMC7519182.

Maggio M, Basaria S, Ceda GP, Ble A, Ling SM, Bandinelli S, Valenti G, Ferrucci L. The relationship between testosterone and molecular markers of inflammation in older men. *J Endocrinol Invest*. 2005;28(11 Suppl Proceedings):116-9. PMID: 16760639.

Malekmohammad K, Sewell RDE, Rafieian-Kopaei M. Antioxidants and Atherosclerosis: Mechanistic Aspects. *Biomolecules*. 2019 Jul 25;9(8):301. doi: 10.3390/biom9080301. PMID: 31349600; PMCID: PMC6722928.

Marcelli M, Mediwala SN. Male hypogonadism: a review. *J Investig Med*. 2020 Feb;68(2):335-356. doi: 10.1136/jim-2019-001233. Epub 2020 Jan 27. PMID: 31988219.

Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD. Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Jul 1;2019:8563845. doi: 10.1155/2019/8563845. PMID: 31354915; PMCID: PMC6636482.

McBride JA, Carson CC, Coward RM. Diagnosis and management of testosterone deficiency. *Asian J Androl*. 2015 Mar-Apr;17(2):177-86. doi: 10.4103/1008-682X.143317. PMID: 25532575; PMCID: PMC4650468.

Meireles JR, Oliveira SV, Costa-Neto AO, Cerqueira EM. Genotoxic and cytotoxic effects of testosterone cypionate (deposteron®). *Mutat Res*. 2013 May 15;753(2):72-5. doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.02.003. Epub 2013 Mar 7. PMID: 23474392.

Milasan A, Smaani A, Martel C. Early rescue of lymphatic function limits atherosclerosis progression in Ldlr^{-/-} mice. *Atherosclerosis*. 2019 Apr;283:106-119. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.01.031. Epub 2019 Jan 31. PMID: 30851674.

Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972 May 25;247(10):3170-5. PMID: 4623845.

Mitra S, Deshmukh A, Sachdeva R, Lu J, Mehta JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy. *Am J Med Sci*. 2011 Aug;342(2):135-42. doi: 10.1097/MAJ.0b013e318224a147. PMID: 21747278

Mohamad NV, Wong SK, Wan Hasan WN, Jolly JJ, Nur-Farhana MF, Ima-Nirwana S, Chin KY. The relationship between circulating testosterone and inflammatory cytokines in men. *Aging Male*. 2019 Jun;22(2):129-140. doi: 10.1080/13685538.2018.1482487. Epub 2018 Jun 21. PMID: 29925283.

Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 2011 Apr 29;145(3):341-55. doi: 10.1016/j.cell.2011.04.005. PMID: 21529710; PMCID: PMC3111065.

Motaghi, M., Mazaheri, M., Moazami, N., Farkhondeh, A., Fooladi, M. H., & Goltapeh, E. M. Kefir production in Iran. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Epub 1997

Mulligan T, Frick MF, Zuraw QC, Stemhagen A, McWhirter C. Prevalence of hypogonadism in males aged at least 45 years: the HIM study. *Int J Clin Pract*. 2006 Jul;60(7):762-9. doi: 10.1111/j.1742-1241.2006.00992.x. PMID: 16846397; PMCID: PMC1569444.

Nieschlag E, Nieschlag S. ENDOCRINE HISTORY: The history of discovery, synthesis and development of testosterone for clinical use. *Eur J Endocrinol*. 2019 Jun 1;180(6):R201-R212. doi: 10.1530/EJE-19-0071. PMID: 30959485

Ostadrahimi A, Taghizadeh A, Mobasseri M, Farrin N, Payahoo L, Beyramalipoor Gheslaghi Z, Vahedjabbari M. Effect of probiotic fermented milk (kefir) on glycemic control and lipid profile in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Iran J Public Health*. 2015 Feb;44(2):228-37. PMID: 25905057; PMCID: PMC4401881.

Ozen M, Dinleyici EC. The history of probiotics: the untold story. *Benef Microbes*. 2015;6(2):159-65. doi: 10.3920/BM2014.0103. PMID: 25576593.

Pastuszak AW, Gomez LP, Scovell JM, Khara M, Lamb DJ, Lipshultz LI. Comparison of the Effects of Testosterone Gels, Injections, and Pellets on Serum Hormones, Erythrocytosis, Lipids, and Prostate-Specific Antigen. *Sex Med*. 2015 Sep;3(3):165-73. doi: 10.1002/sm2.76. Epub 2015 Aug 12. PMID: 26468380; PMCID: PMC4599554.

Punaro GR, Maciel FR, Rodrigues AM, Rogero MM, Bogsan CS, Oliveira MN, Ihara SS, Araujo SR, Sanches TR, Andrade LC, Higa EM. Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. Nitric

Oxide. 2014 Feb 15;37:53-60. doi: 10.1016/j.niox.2013.12.012. Epub 2014 Jan 6. PMID: 24406684.

Rastrelli G, Corona G, Maggi M. Testosterone and sexual function in men. *Maturitas*. 2018 Jun;112:46-52. doi: 10.1016/j.maturitas.2018.04.004. Epub 2018 Apr 6. PMID: 29704917.

Rastrelli G, Corona G, Tarocchi M, Mannucci E, Maggi M. How to define hypogonadism? Results from a population of men consulting for sexual dysfunction. *J Endocrinol Invest*. 2016 Apr;39(4):473-84. doi: 10.1007/s40618-015-0425-1. Epub 2016 Jan 5. PMID: 26733213.

Rastrelli G, Filippi S, Sforza A, Maggi M, Corona G. Metabolic Syndrome in Male Hypogonadism. *Front Horm Res*. 2018;49:131-155. doi: 10.1159/000485999. Epub 2018 May 24. PMID: 29895018.

Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012 May;24(5):981-90. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008. Epub 2012 Jan 20. PMID: 22286106; PMCID: PMC3454471.

Rey RA, Grinspon RP, Gottlieb S, Pasqualini T, Knoblovits P, Aszpis S, Pacenza N, Stewart Usher J, Bergadá I, Campo SM. Male hypogonadism: an extended classification based on a developmental, endocrine physiology-based approach. *Andrology*. 2013 Jan;1(1):3-16. doi: 10.1111/j.2047-2927.2012.00008.x. Epub 2012 Oct 9. PMID: 23258624.

Rezanezhad B, Borgquist R, Willenheimer R, Elzanaty S. The Association between Serum Testosterone and Risk Factors for Atherosclerosis. *Curr Urol*. 2019 Oct;13(2):101-106. doi: 10.1159/000499285. Epub 2019 Oct 1. PMID: 31768177; PMCID: PMC6873033.

Roayah MF, Elkhayat YI, Abd El Salam MA, Din SFG. Prospective Analysis on the Effect of Botanical Medicine (*Tribulus terrestris*) on Serum Testosterone Level and Semen Parameters in Males with Unexplained Infertility. *J Diet Suppl*. 2017 Jan 2;14(1):25-31. doi: 10.1080/19390211.2016.1188193. Epub 2016 Jun 23. Erratum in: *J Diet Suppl*. 2018 Nov 2;15(6):1014. PMID: 27337519.

Rodrigues KL, Carvalho JC, Schneedorf JM. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. *Inflammopharmacology*. 2005;13(5-6):485-92. doi: 10.1163/156856005774649395. PMID: 16280101.

Rosa DD, Dias MMS, Grześkowiak ŁM, Reis SA, Conceição LL, Peluzio MDCG. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr Res Rev*. 2017 Jun;30(1):82-96. doi: 10.1017/S0954422416000275. Epub 2017 Feb 22. PMID: 28222814.

Salonia A, Rastrelli G, Hackett G, Seminara SB, Huhtaniemi IT, Rey RA, Hellstrom WJG, Palmert MR, Corona G, Dohle GR, Khera M, Chan YM, Maggi M. Paediatric and adult-onset male hypogonadism. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 May 30;5(1):38. doi: 10.1038/s41572-019-0087-y. PMID: 31147553; PMCID: PMC6944317.

Samipoor F, Pakseresht S, Rezasoltani P, Mehrdad M. The association between hypogonadism symptoms with serum testosterone, FSH and LH in men. *Aging Male*. 2018 Mar;21(1):1-8. doi: 10.1080/13685538.2017.1382468. Epub 2017 Oct 6. PMID: 28984502.

Santanna AF, Filete PF, Lima EM, Porto ML, Meyrelles SS, Vasquez EC, Endringer DC, Lenz D, Abdalla DSP, Pereira TMC, Andrade TU. Chronic administration of the soluble, nonbacterial fraction of kefir attenuates lipid deposition in LDLr^{-/-} mice. *Nutrition*. 2017 Mar;35:100-105. doi: 10.1016/j.nut.2016.11.001. Epub 2016 Nov 22. PMID: 28241975.

Schaftenaar F, Frodermann V, Kuiper J, Lutgens E. Atherosclerosis: the interplay between lipids and immune cells. *Curr Opin Lipidol*. 2016 Jun;27(3):209-15. doi: 10.1097/MOL.0000000000000302. PMID: 27031276

Schaftenaar F, Frodermann V, Kuiper J, Lutgens E. Atherosclerosis: the interplay between lipids and immune cells. *Curr Opin Lipidol*. 2016 Jun;27(3):209-15. doi: 10.1097/MOL.0000000000000302. PMID: 27031276.

Shiby VK, Mishra HN. Fermented milks and milk products as functional foods--a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013;53(5):482-96. doi: 10.1080/10408398.2010.547398. PMID: 23391015.

Son BK, Kojima T, Ogawa S, Akishita M. Testosterone inhibits aneurysm formation and vascular inflammation in male mice. *J Endocrinol*. 2019 Jun 1;241(3):307-317. doi: 10.1530/JOE-18-0646. PMID: 31018175.

Spitzer M, Huang G, Basaria S, Travison TG, Bhasin S. Risks and benefits of testosterone therapy in older men. *Nat Rev Endocrinol*. 2013 Jul;9(7):414-24. doi: 10.1038/nrendo.2013.73. Epub 2013 Apr 16. PMID: 23591366.

Surampudi PN, Wang C, Swerdloff R. Hypogonadism in the aging male diagnosis, potential benefits, and risks of testosterone replacement therapy. *Int J Endocrinol*. 2012;2012:625434. doi: 10.1155/2012/625434. Epub 2012 Mar 14. PMID: 22505891; PMCID: PMC3312212.

Taghavi-Moghadam PL, Butcher MJ, Galkina EV. The dynamic lives of macrophage and dendritic cell subsets in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2014 Jun;1319(1):19-37. doi: 10.1111/nyas.12392. Epub 2014 Mar 14. PMID: 24628328; PMCID: PMC4101092.

Tung MC, Lan YW, Li HH, Chen HL, Chen SY, Chen YH, Lin CC, Tu MY, Chen CM. Kefir peptides alleviate high-fat diet-induced atherosclerosis by attenuating macrophage accumulation and oxidative stress in ApoE knockout mice. *Sci Rep*. 2020 May 29;10(1):8802. doi: 10.1038/s41598-020-65782-8. PMID: 32472055; PMCID: PMC7260220.

Tung YT, Chen HL, Wu HS, Ho MH, Chong KY, Chen CM. Kefir Peptides Prevent Hyperlipidemia and Obesity in High-Fat-Diet-Induced Obese Rats via Lipid Metabolism Modulation. *Mol Nutr Food Res*. 2018 Feb;62(3). doi: 10.1002/mnfr.201700505. Epub 2018 Jan 2. PMID: 29178253.

Uchida M, Ishii I, Inoue C, Akisato Y, Watanabe K, Hosoyama S, Toida T, Ariyoshi N, Kitada M. Kefiran reduces atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet. *J Atheroscler Thromb*. 2010 Sep 30;17(9):980-8. doi: 10.5551/jat.4812. Epub 2010 Jun 11. PMID: 20543518.

Usman TO, Olatunji LA. Late gestational testosterone exposure causes glucose deregulation and elevated cardiac VCAM-1 and DPP-4 activity in rats. *Arch Physiol Biochem*. 2019 Aug 7:1-8. doi: 10.1080/13813455.2019.1650068. Epub ahead of print. PMID: 31387411.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001. Epub 2006 Aug 4. PMID: 16978905.

Velho I, Figuera TM, Ziegelmann PK, Spritzer PM. Effects of testosterone therapy on BMI, blood pressure, and laboratory profile of transgender men: a systematic review. *Andrology*. 2017 Sep;5(5):881-888. doi: 10.1111/andr.12382. Epub 2017 Jul 14. PMID: 28709177.

Vigen R, O'Donnell CI, Barón AE, Grunwald GK, Maddox TM, Bradley SM, Barqawi A, Woning G, Wierman ME, Plomondon ME, Rumsfeld JS, Ho PM. Association of testosterone therapy with mortality, myocardial infarction, and stroke in men with low testosterone levels. *JAMA*. 2013 Nov 6;310(17):1829-36. doi: 10.1001/jama.2013.280386. Erratum in: *JAMA*. 2014 Mar 5;311(9):967. PMID: 24193080.

Wang C, Jackson G, Jones TH, Matsumoto AM, Nehra A, Perelman MA, Swerdloff RS, Traish A, Zitzmann M, Cunningham G. Low testosterone associated with obesity and the metabolic syndrome contributes to sexual dysfunction and cardiovascular disease risk in men with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2011 Jul;34(7):1669-75. doi: 10.2337/dc10-2339. PMID: 21709300; PMCID: PMC3120209.

Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011 Nov 7;17(11):1410-22. doi: 10.1038/nm.2538. PMID: 22064431.

Wilhelmson AS, Lantero Rodriguez M, Svedlund Eriksson E, Johansson I, Fogelstrand P, Stubelius A, Lindgren S, Fagman JB, Hansson GK, Carlsten H, Karlsson MCI, Ekwall O, Tivesten Å. Testosterone Protects Against Atherosclerosis in Male Mice by Targeting Thymic Epithelial Cells-Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018 Jul;38(7):1519-1527. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311252. Epub 2018 May 31. PMID: 29853568; PMCID: PMC6039408.

Wolf D, Ley K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2019 Jan 18;124(2):315-327. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313591. PMID: 30653442; PMCID: PMC6342482.

Wu FC, Tajar A, Beynon JM, Pye SR, Silman AJ, Finn JD, O'Neill TW, Bartfai G, Casanueva FF, Forti G, Giwercman A, Han TS, Kula K, Lean ME, Pendleton N, Punab M, Boonen S, Vanderschueren D, Labrie F, Huhtaniemi IT; EMAS Group. Identification of late-onset hypogonadism in middle-aged and elderly men. *N Engl J Med*. 2010 Jul 8;363(2):123-35. doi: 10.1056/NEJMoa0911101. Epub 2010 Jun 16. PMID: 20554979.

Xu H, Jiang J, Chen W, Li W, Chen Z. Vascular Macrophages in Atherosclerosis. *J Immunol Res*. 2019 Dec 1;2019:4354786. doi: 10.1155/2019/4354786. PMID: 31886303; PMCID: PMC6914912.

Yang S, Yuan HQ, Hao YM, Ren Z, Qu SL, Liu LS, Wei DH, Tang ZH, Zhang JF, Jiang ZS. Macrophage polarization in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2020 Feb;501:142-146. doi: 10.1016/j.cca.2019.10.034. Epub 2019 Nov 12. PMID: 31730809.

Yılmaz İ, Dolar ME, Özpınar H. Effect of administering kefir on the changes in fecal microbiota and symptoms of inflammatory bowel disease: A randomized controlled trial. *Turk J Gastroenterol*. 2019 Mar;30(3):242-253. doi: 10.5152/tjg.2018.18227. PMID: 30662004; PMCID: PMC6428516.

Yoshida K, Ohta Y, Kawate N, Takahashi M, Inaba T, Hatoya S, Morii H, Takahashi K, Ito M, Tamada H. Long-term feeding of hydroalcoholic extract powder of *Lepidium meyenii* (maca) enhances the steroidogenic ability of Leydig cells to alleviate its decline with ageing in male rats. *Andrologia*. 2018 Feb;50(1). doi: 10.1111/and.12803. Epub 2017 Mar 10. PMID: 28295471.

Yuan T, Yang T, Chen H, Fu D, Hu Y, Wang J, Yuan Q, Yu H, Xu W, Xie X. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Redox Biol*. 2019 Jan;20:247-260. doi: 10.1016/j.redox.2018.09.025. Epub 2018 Oct 19. PMID: 30384259; PMCID: PMC6205410.

Zheng R, Cao L, Cao W, Chu X, Hu Y, Zhang H, Xu J, Sun H, Bao W, Liu K, Liu C. Risk Factors for Hypogonadism in Male Patients with Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res*. 2016;2016:5162167. doi: 10.1155/2016/5162167. Epub 2016 Feb 23. PMID: 27006953; PMCID: PMC4781970.

9. Anexo



Universidade Vila Velha Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UVV)

PARECER DO RELATOR

Parecer Nº. **554-2019**

Pesquisador (a) Responsável: **Tadeu Uggere de Andrade**

Tipo de Pesquisa: **Pesquisa**

Instituição onde será desenvolvido: **Universidade Vila Velha**

Situação: **APROVADO**

Ao analisar o projeto de pesquisa: “**Avaliação do efeito do Kefir sobre o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em camundongos orquiectomizados Knockout para receptores de LDL (LDLr^{-/-})**”, tendo como pesquisador(a) responsável **Tadeu Uggere de Andrade** e considero que o projeto se encontra adequado e satisfatoriamente de acordo com as exigências das Resoluções que regem esse Comitê. A duração do projeto é de **01/12/2019 a 01/03/2021**. Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, sou de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO, com uso previsto de 60 (sessenta) camundongos Knockouts (rLDL (LDL^{-/-}))**, pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais da Normas de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão na Universidade Vila Velha.

Vila Velha, 21 de novembro de 2019.

Prof. Moacir Carretta Júnior
Coordenador do CEUA-UVV

Universidade Vila Velha

Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha-ES, CEP.: 29102-770
E-mail: joao.rossi@uvv.br