

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
Dissertação será disponibilizado
somente a partir de 23/12/22.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Matheus Augusto Callegari

**Influência do sexo e do tempo sobre a remodelação cardíaca
induzida pela suplementação de vitamina D**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para a obtenção do
título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica
Médica.

Orientador: Prof. Titular Sergio Alberto Rupp de Paiva

Coorientadora: Profa. Dra. Priscila Portugal dos Santos

**Botucatu
2021**

Matheus Augusto Callegari

Influência do sexo e do tempo sobre a remodelação
cardíaca induzida pela suplementação de vitamina D

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para a obtenção do título de Mestre
em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Titular Sergio Alberto Rupp de Paiva

Coorientadora: Prof. Dra. Priscila Portugal dos Santos

Botucatu

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Callegari, Matheus Augusto.

Influência do sexo e do tempo sobre a remodelação
cardíaca induzida pela suplementação de vitamina D /
Matheus Augusto Callegari. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Sergio Alberto Rupp de Paiva

Coorientador: Priscila Portugal dos Santos

Capes: 40101002

1. Ratos Wistar. 2. Nutrição. 3. Remodelação
ventricular. 4. Suplementos nutricionais. 5. Vitamina D.

Palavras-chave: Nutrição; Rato; Remodelação cardíaca;
Vitamina D.

Dedicatória

À minha família, pelas oportunidades que me foram dadas para estudar.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Sergio Alberto Rupp de Paiva pela confiança deposita em mim durante a condução desse trabalho. Agradeço por toda atenção, respeito, amizade e por me ensinar ciência de boa qualidade.

À Profa. Dra. Priscila Portugal dos Santos pela amizade, conselhos, dedicação e atenção. Todo seu apoio foi determinante para o meu desenvolvimento durante o mestrado.

Aos professores Bertha Furlan Polegato, Leonardo Antonio Mamede Zornoff, Marcos Ferreira Minicucci e Paula Schmidt Azevedo Gaiolla por todas as contribuições ao longo do projeto e oportunidades que me foram dadas.

A todos os colegas do Laboratório de Remodelação Cardíaca e Nutrição (RECAN) por todo auxílio em experimentos, amizade e companheirismo. É uma pena que a pandemia de COVID-19 tenha interrompido nossos encontros diários. Espero que em breve possamos tomar muitos lanches da tarde juntos (com muito suco e bolo!).

À minha família, por serem minha base, me permitirem lutar pelos meus sonhos e entenderem minhas ausências ao longo desses últimos anos.

À Juliana Sartori Lunardi, por ser minha companheira de vida, apoiar minhas decisões e me estimular à novos desafios.

A todos os moradores e ex-moradores da República Paracetamal por serem minha segunda família e se fazerem presentes nos momentos mais alegres e também difíceis da minha vida.

À Fabio Manoel Lopes que muito me ensinou sobre dedicação, preparo e paixão pela excelência, aspectos que carrego em todas as minhas atividades. Hoje, mais do que nunca, consigo entender que tudo que me ensinou se aplica a todos os aspectos da vida.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) por todo auxílio prestado no desenvolvimento do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro por meio de bolsa de estudos (Processo 2019/15581-5).

*“(...) cantamos porque o rio está soando
e quando soa o rio / soa o rio
cantamos porque o cruel não tem nome
embora tenha nome seu destino*

*cantamos pela infância e porque tudo
e porque algum futuro e porque o povo
cantamos porque os sobreviventes
e nossos mortos querem que cantemos*

*cantamos porque o grito só não basta
e já não basta o pranto nem a raiva
cantamos porque cremos nessa gente
e porque venceremos a derrota (...)”*

(Por que cantamos – Mario Benedetti)

Resumo

CALLEGARI, M. A. **Influência do sexo e do tempo sobre a remodelação cardíaca induzida pela suplementação de vitamina D.** 2021. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2021.

A deficiência de vitamina D (VitD) é considerada problema de saúde pública. Por conta disso, profissionais têm incentivado suplementação de VitD. Contudo, VitD possui curva dose-resposta bifásica na fisiopatologia cardiovascular, sendo que tanto deficiências como excessos podem ser prejudiciais. Estudo conduzido anteriormente por nosso grupo de pesquisa mostrou que a suplementação de doses excessivas não hipercalcêmicas de VitD por 2 meses em ratos Wistar machos resultou em processo de agressão ao coração por meio de estresse oxidativo (EO). O EO pode ativar diferentes vias a depender de sua intensidade e duração. Assim, é necessário definir quais as vias envolvidas no processo, bem como em que momento ocorrem o início das alterações. Outra importante questão é se se essas alterações também ocorrem no sexo feminino, visto que o metabolismo da VitD parece ser diferente entre homens e mulheres. O presente trabalho teve como objetivo avaliar se a suplementação de vitamina D leva a diferentes alterações cardíacas em ratos machos e fêmeas e se essas são dependentes do tempo. Para isso, foram utilizados 72 ratos Wistar machos e 72 ratos Wistar fêmeas pesando, aproximadamente, 250g e 200g, respectivamente. Os animais machos e fêmeas foram alocados para receber ração padrão sem e com a suplementação de VitD (+10000 UI/kg de ração) e distribuídos em grupos de acordo com o tempo de duração da suplementação (20, 40 e 60 dias). Desta maneira, foram formados 12 grupos (n=12). Após o período experimental, os animais foram eutanasiados e realizada coleta de materiais para análises. A comparação entre grupos foi feita por ANOVA de três vias levando em consideração os fatores sexo, suplementação e tempo. Houve diferença entre os sexos em relação ao peso corporal e consumo de ração que foram maiores nos animais machos. A avaliação bioquímica mostrou que a suplementação de VitD promoveu aumento de cálcio sérico de forma tempo dependente, mas que não caracterizou hipercalcemia. Os animais suplementados com VitD também apresentaram valores maiores de heme oxigenase-1 e alteração no comportamento das proteínas envolvidas na via do NF-kB e de apoptose celular. Esses dados mostram que a suplementação de vitamina D em doses excessivas leva a alterações bioquímicas e moleculares no coração provavelmente por EO de média intensidade e que o tempo de suplementação é fator importante para a observação dessas alterações.

Palavras-chave: remodelação cardíaca; nutrição; rato; NF-kB.

Abstract

CALLEGARI, M. A. **Influence of sex and time on cardiac remodeling induced by vitamin D supplementation.** 2021. 64 f. Dissertation (Masters) - Faculty of Medicine of Botucatu, São Paulo State University, Botucatu, 2021.

Vitamin D (VitD) deficiency is considered a public health problem. As a consequence, health professionals have encouraged the supplementation of VitD. However, VitD has a biphasic dose-response curve in cardiovascular pathophysiology, and deficiencies and excesses can be harmful. A previous study conducted by our research group showed that VitD supplementation in excessive doses for 2 months in male Wistar rats resulted in a process that is aggressive to the heart through oxidative stress (OS). OS can activate different pathways depending on their intensity and duration. Thus, it is necessary to define which paths are involved in the process, as well as when the changes start. Another important question is whether these changes also occur in females, as the metabolism of VitD appears to be different between both sexes. The present work aimed to evaluate whether vitamin D supplementation leads to different cardiac changes in male and female rats and whether these are time-dependent. For this, 72 male Wistar rats and 72 female Wistar rats weighing approximately 250g and 200g, respectively, were used. The animals were allocated to receive standard chow without and with VitD supplementation (+10000 UI / kg of feed) and distributed into groups according to the duration of supplementation (20, 40, and 60 days). Therefore, 12 groups were formed (n = 12). After the experimental period, the animals were euthanized and the material was collected for analysis. The comparison between groups was made by three-factor ANOVA, taking into account the factors sex, supplementation, and time. There were differences between the sexes for body weight and feed intake which were higher in male animals. The biochemical evaluation showed that VitD supplementation promoted a time-dependent increase in serum calcium, but that it did not characterize hypercalcemia. In addition, the animals also presented higher values of heme oxygenase-1 and alteration in the behavior of proteins involved in the NF- κ B pathway and cellular apoptosis. These data show that vitamin D supplementation in excessive doses leads to biochemical and molecular changes in the heart, probably due to medium OS intensity and that the supplementation time is an important factor for the observation of these changes.

Keywords: cardiac remodeling; nutrition; mouse; NF- κ B.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
2. HIPÓTESES.....	12
3. OBJETIVOS.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Delineamento Experimental	13
4.2. Preparo das rações.....	14
4.3. Doses de vitamina D utilizadas.....	14
4.4. Coleta de material biológico	15
4.5. Determinação sérica de Cálcio e Fósforo séricos.....	16
4.6. Atividade de tiorredoxina.....	16
4.7. Determinação do malondialdeído (MDA)	17
4.8. Determinação da expressão proteica por Western blot.....	17
4.9. Análise estatística.....	20
5. RESULTADOS.....	21
5.1. Peso corporal dos animais, consumo diário de ração, cálcio sérico e fósforo sérico	21
5.2. Estudo morfométrico do coração	27
5.3. Determinação do malondialdeído (MDA)	29
5.4. Determinação da atividade da tiorredoxina (Trx).....	31
5.5. Análise de expressão das proteínas da via HO-1, GPx-1 e Keap-1/Nrf-2	34
5.5. Análise de expressão das proteínas da via do Fator Nuclear Kappa B.....	37
5.6. Análise de expressão de proteínas das vias apoptóticas BAX, Bcl-2 e AIF.....	45
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO	55
8. REFERÊNCIAS.....	56

8. REFERÊNCIAS

1. MARTINI, Ligia; PETERS, Barbara Santarosa Emo (Org.). **Cálcio e Vitamina D - Fisiologia, Nutrição e Doenças Associadas**. São Paulo: Manole, 2017. 336 p.
2. CHEN, Tai C. et al. Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 460, n. 2, p. 213-217, 2007.
3. LIPS, Paul. Vitamin D physiology. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 92, n. 1, p. 4-8, 2006.
4. ZEHNDER, Daniel et al. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 2, p. 888-894, 2001
5. CHRISTAKOS, Sylvia et al. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. **Physiological reviews**, v. 96, n. 1, p. 365-408, 2015.
6. PIKE, J. Wesley et al. Genomic Determinants of Vitamin D-Regulated Gene Expression. **Vitamin D Hormone**, v. 100, p. 21-44, 2016.
7. CARLBERG, Carsten. Nutrigenomics of Vitamin D. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 676, 21 mar. 2019.
8. CHRISTAKOS, Sylvia et al. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. **Physiological reviews**, v. 96, n. 1, p. 365-408, 2015.
9. LIPS, Paul; VAN SCHOOR, Natasja M. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. **Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism**, v. 25, n. 4, p. 585-591, 2011.
10. PALACIOS, Cristina; GONZALEZ, Lilliana. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 144, p. 138-145, 2014.
11. WACKER, Matthias; HOLICK, Michael F. Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. **Dermato-endocrinology**, v. 5, n. 1, p. 51-108, 2013.
12. HOLICK, Michael F. Vitamin D deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 3, p. 266-281, 2007.
13. PEREIRA-SANTOS, M. et al. Obesity and vitamin D deficiency: a systematic review and meta-analysis. **Obesity reviews**, v. 16, n. 4, p. 341-349, 2015.

14. ROSS, A. Catharine et al. The 2011 Report on Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 1, p. 53-58, jan. 2011.
15. HOLICK, Michael F et al.. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911-1930, jul. 2011.
16. PIUDOWSKI, Paweł et al. Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in Central Europe — recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency. **Endokrynologia Polska**, v. 64, n. 4, p. 319-327, 4 set. 2013.
17. GERMAN NUTRITION SOCIETY. **New Reference Values for Vitamin D. Annals Of Nutrition And Metabolism**, v. 60, n. 4, p. 241-246, 2012.
18. ZITTERMANN, Armin; SCHLEITHOFF, Stefanie S.; KOERFER, Reiner. Vitamin D and vascular calcification. **Current opinion in lipidology**, v. 18, n. 1, p. 41-46, 2007.
19. SUNG, Ki-Chul et al. High levels of serum vitamin D are associated with a decreased risk of metabolic diseases in both men and women, but an increased risk for coronary artery calcification in Korean men. **Cardiovascular diabetology**, v. 15, n. 1, p. 112, 2016.
20. AZEVEDO, Paula S. et al. Cardiac remodeling: concepts, clinical impact, pathophysiological mechanisms and pharmacologic treatment. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 106, n. 1, p. 62-69, 2016.
21. SANTOS, Priscila Portugal dos. **Influência da Suplementação da Ração com Diferentes Doses de Vitamina D sobre a Proteína de Interação com a Tiorredoxina (TXNIP) no Coração e suas Vias de Sinalização**. 2015. 106 f. Tese (Doutorado) - Curso de Fisiopatologia em Clínica Médica, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 2015.
22. LUSHCHAK, Volodymyr I.. Adaptive response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 175-190, mar. 2011.
23. REDZA-DUTORDOIR, Maureen; AVERILL-BATES, Diana A.. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977-2992, dez. 2016.
24. MITHAL, Ambrish et al. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. **Osteoporosis international**, v. 20, n. 11, p. 1807-1820, 2009.

25. YOUSEFZADEH, Pegah; SHAPSES, Sue A.; WANG, Xiangbing. Vitamin D binding protein impact on 25-hydroxyvitamin D levels under different physiologic and pathologic conditions. **International journal of endocrinology**, v. 2014, 2014.
26. LAGUNOVA, Zoya et al. The dependency of vitamin D status on body mass index, gender, age and season. **Anticancer research**, v. 29, n. 9, p. 3713-3720, 2009.
27. SAKI, Forough et al. Effect of prolactin and estrogen on the serum level of 1,25-dihydroxy vitamin D and FGF23 in female rats. **Archives Of Gynecology And Obstetrics**, v. 302, n. 1, p. 265-271, 14 maio 2020.
28. CARRELLI, Angela et al. Vitamin D storage in adipose tissue of obese and normal weight women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 2, p. 237-242, 2017.
29. GAUGRIS, S et al. Vitamin D inadequacy among post-menopausal women: a systematic review. **Qjm: An International Journal of Medicine**, [S.L.], v. 98, n. 9, p. 667-676, 8 jul. 2005.
30. GOZZER, Pamela et al. Comportamento de ratos Wistar: importância do enriquecimento ambiental. **Saúde em Revista**, v. 17, n. 48, p. 69-77.
31. DEL VALLE, Heather B. et al. (Ed.). **Dietary reference intakes for calcium and vitamin D**. National Academies Press, 2011.
32. HRUBEC, Zdenek; NEEL, James V. The National Academy of Sciences--National Research Council Twin Registry: ten years of operation. **Progress in clinical and biological research**, v. 24, p. 153-172, 1978.
33. SHEPARD, Richard M.; DELUCA, Hector F. Plasma concentrations of vitamin D3 and its metabolites in the rat as influenced by vitamin D3 or 25-hydroxyvitamin D3 intakes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 202, n. 1, p. 43-53, 1980.
34. DOS SANTOS, Priscila Portugal et al. Vitamin D induces increased systolic arterial pressure via vascular reactivity and mechanical properties. **PLoSOne**, v. 9, n. 6, p. e98895, 2014.
35. ARNÉR, Elias SJ; HOLMGREN, Arne. Measurement of thioredoxin and thioredoxin reductase. **Current protocols in toxicology**, v. 24, n. 1, p. 7.4. 1-7.4. 14, 2005.
36. BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

37. KHOSCHSORUR, Gholan Ali. et al. Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of malondialdehyde, and application of the method to different biological materials. **Chromatographia**, v. 52, n. 3-4, p. 181-184, 2000.
38. NIELSEN, Flemming et al. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. **Clinical chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1209-1214, 1997.
39. GREEN, Douglas R.; REED, John C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, p. 1309-1312, 1998.
40. SLOB, A.Koos; BOSCH, Jacob J. van Der Werff Ten. Sex differences in body growth in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 14, n. 3, p. 353-361, 1975.
41. CLINE, Jill. Calcium and Vitamin D Metabolism, Deficiency, and Excess. **Topics In Companion Animal Medicine**, v. 27, n. 4, p. 159-164, 2012.
42. JORDE, Rolf; SUNDSFJORD, Johan; FITZGERALD, Patrick; BØNAA, Kaare H.. Serum Calcium and Cardiovascular Risk Factors and Diseases. **Hypertension**, v. 34, n. 3, p. 484-490, 1999.
43. ROBERTS, William C.; WALLER, Bruce F.. Effect of chronic hypercalcemia on the heart. An analysis of 18 necropsy patients. **The American Journal Of Medicine**, v. 71, n. 3, p. 371-384, 1981.
44. ROMÁN-GARCÍA, Pablo et al. High phosphorus diet induces vascular calcification, a related decrease in bone mass and changes in the aortic gene expression. **Bone**, v. 46, n. 1, p. 121-128, 2010.
45. HRUSKA, Keith et al. Cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: does phosphate qualify?. **Kidney International**, v. 79, p. 9-13, 2011.
46. SHIMADA, Takashi et al. FGF-23 Is a Potent Regulator of Vitamin D Metabolism and Phosphate Homeostasis. **Journal Of Bone And Mineral Research**, v. 19, n. 3, p. 429-435, 2003.
47. SIES, Helmut; BERNDT, Carsten; JONES, Dean P. Oxidative stress. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 715-748, 2017.
48. AYALA, Antonio; MUÑOZ, Mario F.; ARGÜELLES, Sandro. Lipid Peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1-31, 2014.
49. GROTTTO, Denise et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 169-174, 2009.

50. COSTA, Nara Aline et al. Protein carbonyl concentration as a biomarker for development and mortality in sepsis-induced acute kidney injury. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 1, 25 jan. 2018.
51. Figueiredo, Amanda de Menezes. **Participação do fator de crescimento de fibroblastos-23 (FGF-23) no estresse oxidativo, no metabolismo energético, alterações morfológicas e funcionais cardíacas associadas à suplementação de vitamina D em ratos**. 2020. 106 f. Tese (Doutorado) - Curso de Fisiopatologia em Clínica Médica, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2020.
52. WATSON, W. H.. Thioredoxin and Its Role in Toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 78, n. 1, p. 3-14, 2004.
53. DAS, Kumuda C.; LEWIS-MOLOCK, Yvette; WHITE, Carl W. Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 17, n. 6, p. 713-726, 1997.
54. IÑARREA, Pedro et al. Mitochondrial respiratory chain and thioredoxin reductase regulate intermembrane Cu, Zn-superoxide dismutase activity: implications for mitochondrial energy metabolism and apoptosis. **Biochemical Journal**, v. 405, n. 1, p. 173-179, 2007.
55. SATTA, Sandro et al. The Role of Nrf2 in Cardiovascular Function and Disease. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity** v. 2017, p. 1-18, 2017.
56. KARIN, Michael. How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6867-6874, 1999.
57. CHRISTIAN, Frank; SMITH, Emma L.; CARMODY, Ruaidhrí J. The regulation of NF- κ B subunits by phosphorylation. **Cells**, v. 5, n. 1, p. 12, 2016.
58. JADHAV, Ashok; TORLAKOVIC, Emina; NDISANG, Joseph Fomusi. Interaction among heme oxygenase, nuclear factor- κ B, and transcription activating factors in cardiac hypertrophy in hypertension. **Hypertension**, v. 52, n. 5, p. 910-917, 2008.
59. CZIBIK, Gabor et al. Heme oxygenase-1: an emerging therapeutic target to curb cardiac pathology. **Basic Research In Cardiology**, v. 109, n. 6, p. 327-345, 2014.
60. WANG, Guangwu et al. Cardioprotective and anti-apoptotic effects of heme oxygenase-1 in the failing heart. **Circulation**, v. 121, n. 17, p. 1912, 2010.
61. ARAUJO, Jesus A.; ZHANG, Min; YIN, Fen. Heme Oxygenase-1, Oxidation, Inflammation, and Atherosclerosis. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 3, p. 0-1, 2012.
62. ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

63. GUSTAFSSON, Åsa B.; GOTTLIEB, Roberta A.. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. **American Journal Of Physiology-Cell Physiology**, v. 292, n. 1, p. 45-51, 2007.
64. RAISOVA, Monika et al. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. **Journal of investigative dermatology**, v. 117, n. 2, p. 333-340, 2001.
65. CLAYTON, Janine Austin. Studying both sexes: a guiding principle for biomedicine. **The Faseb Journal**, v. 30, n. 2, p. 519-524, 2015.
66. CLAYTON, Janine A.; COLLINS, Francis S.. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 282-283, 2014.